



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 501**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01) **C07K 14/00** (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01) **A61K 38/16** (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01) **C07K 14/575** (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01952155 .8**

96 Fecha de presentación : **15.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1294746**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54

Título: **Conjugados peptídicos modificados en los extremos N y/o C con cadenas pépticas cortas cargadas.**

30

Prioridad: **16.06.2000 DK 2000 00944**
05.10.2000 DK 2000 01485
06.12.2000 US 251671 P
13.06.2001 PCT/US01/41008

73

Titular/es: **SERODUS ASA**
Gaustadalléen 21
0349 Oslo, NO

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

72

Inventor/es: **Larsen, Bjarne, Due;**
Petersen, Jorgen, Soberg;
Kapusta, Daniel, R. y
Harlow, Kenneth, William

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 365 501 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados peptídicos modificados en los extremos N y/o C con cadenas peptídicas cortas cargadas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a nuevos conjugados peptídicos con actividades farmacológicas interesantes, a un procedimiento para la preparación de los nuevos conjugados peptídicos, a composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados peptídicos y al uso de los conjugados peptídicos para la preparación de un medicamento.

ANTECEDENTES

[0002] El péptido endógeno de tipo opioide nociceptina (también denominado orfanina FQ) se describió primeramente en el sistema nervioso central y la mayor parte de la investigación en este campo se ha centrado en los efectos en el SNC. La nociceptina se une a un receptor específico, denominado receptor similar a receptores de opioides uno (ORL1) con mucha mayor afinidad que a los tres subtipos clásicos de receptores de opioides. Los efectos de la nociceptina en el SNC incluyen: hiperalgesia/hipoalgesia, estimulación del apetito y punzadas, aumento (en dosis bajas) o disminución (en dosis altas) de la locomoción, trastornos del aprendizaje y disforia. Sin embargo, la nociceptina también ejerce efectos importantes fuera del SNC. Así, dosis bajas de nociceptina aumentan la excreción renal de agua y disminuyen la excreción urinaria de sodio (es decir, produce una diuresis acuosa selectiva), lo que hace que este compuesto sea interesante para el tratamiento de la hiponatremia (Daniel R. Kapusta, Life Science, 60: 15-21, 1997) (patente de los EE. UU. n° 5.840.696). Si se administra por vía central (i.c.v.) o por vía periférica a dosis altas (bolos o infusión i.v.), la nociceptina disminuye la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y la actividad nerviosa simpática periférica.

[0003] Dooley y col. (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 283(2): 735-741, 1997) han demostrado que un hexapéptido cargado positivamente con la secuencia de aminoácidos Ac-RYY(RK)(WI)(RK)-NH₂, en la que los paréntesis muestran la variación permitida de restos aminoácidos, actúa como agonista parcial del receptor de la nociceptina ORL1. Dicho hexapéptido se identificó a partir de una biblioteca combinatoria de péptidos y la secuencia es única, sin homología ni similitud con el heptadecapéptido nociceptina. Sin embargo, dicho hexapéptido es demasiado inestable para producir un medicamento satisfactorio.

[0004] El documento WO 99/44627 desvela el uso de hexapéptidos, incluidos los hexapéptidos descubiertos por Dooley y col. para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las afecciones siguientes: migraña, diabetes del tipo II, choque séptico, inflamaciones y trastornos vasomotores. Se demuestra que el hexapéptido Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ inhibe la respuesta depresora a la estimulación de la médula espinal.

[0005] El documento WO 99/46283 expone el uso de una secuencia peptídica flanqueante de 4-20 restos aminoácidos para la estabilización de péptidos farmacológicamente activos contra la hidrólisis enzimática. Los péptidos estabilizantes preferidos son secuencias de polilisina cargadas positivamente y la nociceptina se menciona entre los péptidos activos que se estabilizan de este modo contra la hidrólisis enzimática.

[0006] Considerando que se espera que los agonistas de ORL1, incluido el hexapéptido descubierto por Dooley y col., así como los verdaderos análogos de nociceptina, tengan graves efectos secundarios en el SNC si se exponen al cerebro, lo que se observa a niveles de dosificación mayores que los requeridos para provocar diuresis acuosa en ratas, un objetivo principal de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados peptídicos con la actividad de tipo nociceptina de dicho hexapéptido o con actividad de unión al receptor ORL1, pero que actúen selectivamente fuera del SNC. Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados peptídicos con la actividad de tipo nociceptina de dicho hexapéptido o con actividad de unión al receptor ORL1 y con mejor estabilidad. Además, es un objeto de la invención proporcionar nuevos conjugados peptídicos con la actividad de tipo nociceptina de dicho hexapéptido o con actividad de unión al receptor ORL1 y/o a un receptor todavía sin identificar en el tejido renal.

[0007] Este objetivo se consigue con los conjugados peptídicos de la presente invención que comprenden hexapéptidos modificados en los extremos C y/o N por conjugación con cadenas peptídicas cargadas cortas.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0008] Un conjugado peptídico de la fórmula general I

$$R_1-Z-X-Z'-R_2 \quad (I)$$

en la que

X representa un hexapéptido con la secuencia de la fórmula (II) (RK) YY (RK)(WI)(RK), en que los paréntesis indican alternativas;

Z representa una cadena peptídica cargada de 4 a 20 restos aminoacídicos con la configuración D o L o está ausente; y

Z' representa una cadena peptídica cargada de 4 a 20 restos aminoacídicos con la configuración D o L o está ausente, teniendo en cuenta que Z y Z' no estén ausentes a la vez;

R₁ representa H o un grupo acilo;

R₂ representa NR₃R₄, en que cada uno de R₃ y R₄, representan independientemente hidrógeno, alcoxi
10 C(1-6), ariloxi o un alquilo inferior según se define en este documento; o R₂ representa OH;
y sales, hidratos y solvatos del mismo y derivados del mismo esterificados en el extremo C con ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados.

[0009] Los conjugados peptídicos de la invención pueden formar sales de adición de ácido, preferentemente con ácidos farmacéuticamente aceptables y estas sales están incluidas dentro del alcance de la invención. Los compuestos pueden servir como medicamentos en su forma pura. Sin embargo, preferentemente los compuestos se incorporan en formulaciones médicas sólidas o líquidas, que incluyen comprimidos, cápsulas, disoluciones y suspensiones. Otros componentes de tales formulaciones pueden incluir un vehículo, un diluyente, un agente tamponante, un agente osmótico y un conservante. Las formulaciones sólidas son particularmente adecuadas para la administración por vía oral, mientras que las disoluciones son más útiles para inyección (i.v., i.m., i.p. o s.c.) o para administración por vía intranasal.

[0010] Los conjugados peptídicos de la invención con actividad de tipo nociceptina o actividad de unión al receptor ORL1, pero que actúan fuera del SNC son especialmente útiles en el tratamiento de enfermedades y dolencias periféricas relacionadas con ORL1, como las enfermedades en las que se requiere o prefiere un efecto renal selectivo. Más específicamente, los conjugados peptídicos de la invención muestran un efecto acuareático significativo ahorrador de sodio y de potasio, que es beneficioso en el tratamiento de afecciones patológicas formadoras de edemas asociadas con hiponatremia y/o hipotasemia. Los conjugados peptídicos de la invención son útiles para el tratamiento médico de humanos y para uso veterinario como diuréticos durante estados formadores de edemas en ganado, por ejemplo equino y vacuno. Una ventaja particular de los compuestos de la invención es su estabilidad en el plasma en comparación con los hexapéptidos desvelados por Dooley y col.^[1]

[0011] Los nuevos conjugados peptídicos de la invención son útiles para la preparación de anticuerpos capaces de unirse específicamente a dichos conjugados peptídicos. Los anticuerpos producidos contra los conjugados peptídicos de la invención o fracciones de los mismos también se desvelan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012]

La figura 1 muestra curvas de respuesta a la concentración para los efectos de la adición acumulativa de las sustancias de prueba (Ac-RYYRWK-NH₂ y el compuesto 1) sobre la relajación inducida por nociceptina en el ensayo del conducto deferente de ratón.

La figura 2 muestra las respuestas cardiovascular y renal a nociceptina administrada como infusión i.v. (11 nmol/kg/min); HR es la frecuencia cardíaca (latidos por minuto, lpm), MAP significa la presión arterial (mm de Hg), V es la tasa de flujo urinario (µl/min) y U_{Na}V es la tasa de excreción urinaria de sodio (µeq/min).

La figura 3 muestra las respuestas cardiovascular y renal al compuesto 1 administrado como infusión i.v. (1 y 0,1 nmol/kg/min), así como la actividad nerviosa simpática renal como porcentaje del nivel de control (RNSA, %).

La figura 4 muestra la disminución del aclaramiento osmolar (COsm) y el aumento del aclaramiento de agua libre (CH₂O) observados durante la infusión i.v. del compuesto 1 (1 y 0,1 nmol/kg/min).

La figura 5 ilustra la magnitud similar de los cambios de las respuestas cardiovascular y renal (V y U_{Na}V) provocadas por la infusión i.v. de 1 nmol/kg/min del compuesto 1 y 11 nmol/kg/min de nociceptina.

La figura 6 ilustra la magnitud similar de los cambios de las respuestas cardiovascular y renal (V y U_{Na}V) provocadas por la infusión i.v. de 0,1 nmol/kg/min del compuesto 1 y 1,1 nmol/kg/min de nociceptina.

La figura 7 es una ilustración de la relación entre los cambios en la tasa de flujo urinario y la excreción de sodio y potasio después de la administración i.v. del compuesto 1, 65 nmol/kg i.v. (flecha) en ratas normales. Los datos se expresan relativos (porcentaje) al nivel anterior a la administración i.v. del compuesto 1.

La figura 8 ilustra los cambios en la tasa de flujo urinario, el aclaramiento de agua libre, la excreción fraccional de potasio y la excreción fraccional de sodio después de la administración i.v. del compuesto 1, 65 nmol/kg i.v. en ratas normales y en ratas cirróticas.

5 La figura 9 es una ilustración de la excreción fraccional de agua (V/GFR) durante la infusión i.v. continua con una dosis acuareática máxima del antagonista selectivo del receptor de vasopresina de tipo 2, OPC-31260 (0,8 mg/kg/h; n = 8 (datos de ^[2]) o del compuesto 1 (12 nmol/kg/min). Con el fin de evitar la activación de los mecanismos homeostáticos compensatorios del volumen, los experimentos se realizaron en condiciones en las que se evitó una
10 reducción de volumen mediante un sistema de reposición de la volemia con glucosa 150 mM dirigido por ordenador y servocontrolado.

La figura 10 es un gráfico que muestra la velocidad de degradación del compuesto 1 y de Ac-RYYRWK-NH₂ en el plasma heparinizado de ratón.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] El acoplamiento de una fracción peptídica cargada introduce un aumento de la polaridad o un aumento de la carga en el hexapéptido cargado positivamente (RK)YY(RK)(WI)(RK), lo que resulta en un conjugado peptídico
20 con mayor estabilidad e hidrofiliidad. También se cree que dicho acoplamiento reduce la probabilidad de que el conjugado peptídico cruce la barrera hematoencefálica. Además, los datos preliminares sugieren que la modificación del extremo C con K₆ parece inducir la estructura de hélice α en el hexapéptido X, según se determina por espectros de RMN 1D. En la secuencia de aminoácidos (RK)YY(RK)(WI)(RK), los aminoácidos alternativos en las posiciones 1, 4, 5 y 6 se muestran entre paréntesis.

25 **[0014]** En las realizaciones preferidas de la invención Z representa una cadena peptídica cargada negativamente de 4 a 20 restos aminoácidos, Z' representa una cadena peptídica cargada positivamente de 4 a 20 restos aminoácidos, R₁ representa Ac o Tfa y R₂ representa NH₂ o R₂ representa NR₃R₄, en que cada uno de R₃ y R₄ representan independientemente hidrógeno, metilo o etilo.

30 **[0015]** Preferentemente, dicho hexapéptido X se selecciona del grupo que consta de KYRWR, RYYRWR, RYYRWK, RYYRWK (todos D), RWRK, RYYRIR, RYYKIK, RYYKIR, RYYKWR y RYYKWK, con mayor preferencia del grupo que consta de RYYRWR, RYYRWK, RYYRIK, RYYKWR y RYYKWK, con mayor preferencia dicho hexapéptido X es RYYRWK o KYRWRK, en que los restos aminoácidos están en la forma L, a menos que se
35 especifique lo contrario. Además, el número de restos aminoácidos en cada uno de Z y Z' está preferentemente en el intervalo de 4 a 10 o de 5 a 10.

[0016] Se prefiere que los restos aminoácidos de Z se seleccionen del grupo que consta de Q, T, S, P, N, E y D, con la configuración D o L, y que el aminoácido N-terminal de Z se seleccione del grupo que consta de Q, T, N y S, con la configuración D o L, y que los aminoácidos restantes se seleccionen del grupo que consta de P, D y E. Más específicamente, Z se selecciona del grupo que consta, por ejemplo, de N(E)₇, N(E)₆, N(E)₅, N(E)₃, S(E)₇, S(E)₆, S(E)₅, S(E)₃, NP(E)₄, NP(E)₅, N(D)₇, N(D)₆, N(D)₅, N(D)₃, Q(E)₇, Q(E)₅, Q(E)₃, QN(D)₇, Q(D)₆, Q(D)₅, y Q(D)₃, preferentemente Z es N(E)₅.

45 **[0017]** Se prefiere que los restos aminoácidos de Z' se seleccionen del grupo que consta de A, G, K y R, preferentemente K, con la configuración D o L, con mayor preferencia Z' se selecciona del grupo que consta de A(K₄)G, K₅G, AK₅, H₆, K₁₀, K₈, K₆, K₅ y K₄.

[0018] Algunos ejemplos de conjugados Z-X-Z' son N(E)₅RYYRWKK₆, N(E)₅RYYRWK, RYYRWKK₆,
50 N(E)₅RYYRWRK₆, N(E)₅RYYRWR, RYYRWRK₆, N(E)₅RYYRIKK₆, N(E)₅RYYRIK y RYYRIKK₆.

[0019] Algunos ejemplos de compuestos de la invención son: Ac-RYYRWKK₆-NH₂, Ac-K₆RYYRWK-NH₂, N(E)₅RYYRWKEC₆-NH₂ y sales, preferentemente sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos y derivados de los mismos, incluidos derivados C-terminales, como ácidos carboxílicos libres.

55 **[0020]** Una realización preferida de la invención está representada por la fórmula general III

$$R_1-X-Z'-R_2 \quad (III)$$

en la que R₁, X, Z' y R₂ tienen los mismos significados definidos anteriormente, y sales hidratos y solvatos de la misma y derivados de la misma esterificados en el extremo C con ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados. En un
60 conjugado peptídico de la fórmula III preferido, R₁ representa Ac, Z' representa K_n, en que n es un número entero seleccionado entre 5, 6 ó 7 y R₂ representa NH₂. Preferentemente, X se selecciona del grupo que consta de KYRWR, RYYRWR, RYYRWK, RYYRWK (todos D), RYYRIK, RYYKWR y RYYKWK. Opcionalmente, los

conjugados peptídicos de las fórmulas I y III están ligados además a una fracción de transporte o a una etiqueta de afinidad, como H₆, en que la unión entre el conjugado peptídico y dicha fracción de transporte o etiqueta de afinidad puede tener lugar mediante cualquier enlace covalente conveniente. Dicha fracción de transporte se selecciona preferentemente del grupo que consta de los restos 49-57 del péptido tat del VIH, los restos 49-56 del péptido tat del VIH, la secuencia tat YGRKKRRQRRR, un péptido de poliarginina con 6 a 20 restos, como R₆ y secuencias de péptidos transductores, como las secuencias peptídicas siguientes YARKARRQARR, YARAAARQARA, YARAARRAARR, YARAARRAARA, ARRRRRRRRRR y YAAARRRRRRR, que se desvelan en el documento WO 99/29721 y en la patente de los EE. UU. n° 6.221.355 (SEQ ID No: 3 y 8).

[0021] La secuencia peptídica de un compuesto de las fórmulas I y III está opcionalmente en la forma con todos D, la forma retro o la forma retro con todos D, en que la forma con todos D es la más preferida. Opcionalmente, la secuencia X de las fórmulas I y II es una forma con todos D, una forma retro o una forma retro con todos D de la secuencia peptídica de la fórmula II o del hexapéptido (RK)YY(RK)(WI)(RK) según se ha definido anteriormente, respectivamente.

[0022] Algunos ejemplos de compuestos de la invención se muestran en la tabla 1 a continuación:

Compuesto 1	Ac-RYYRWKKKKKKK-NH ₂
Compuesto 2	Ac-KKKKKKRYRWWK-NH ₂
Compuesto 3	H-NEEEEEERYRWKKKKKKK-NH ₂
Compuesto 8	Ac-RYYRWKKKKKKK-NH ₂ (todos D)
Compuesto 9	Ac-KYYRWKKKKKKK-NH ₂
Compuesto 10	Ac-RYYRIKKKKKKK-NH ₂
Compuesto 11	Ac-RYYRWKAKKKKKK-NH ₂
Compuesto 12	Ac-RYYRWKKKKKKK-NH ₂
Compuesto 13	Ac-RYYRWKKKKKKKC-NH ₂
Compuesto 14	Tfa-RYYRWKKKKKKK-NH ₂

y sales, hidratos, solvatos y derivados C-terminales de los mismos, es decir el ácido carboxílico libre. Otros compuestos preferidos son:

[0023] Ac-KWRYYNKKKKKKK-NH₂
Ac-KWRYYRKKKKKKK-NH₂ y
Ac-KWRYRKKKKKKK-NH₂ (todos D)

y sales, hidratos, solvatos y derivados C-terminales de los mismos, es decir el ácido carboxílico libre.

[0023] Algunos ejemplos de sales de adición de ácido con un ácido orgánico y un ácido inorgánico de la invención son:

compuesto 1A: Ac-RYYRWKKKKKKK-NH₂ x 9 CH₃COOH
compuesto 1C: Ac-RYYRWKKKKKKK-NH₂ x 9 HCl.

[0024] Los conjugados peptídicos de la invención se preparan preferentemente por el procedimiento de síntesis desvelado en el documento WO 98/11125 y, preferentemente mediante un procedimiento según se describe en el ejemplo 15 en dicho documento. Dichos procedimientos de síntesis resultarán en un producto peptídico primario con trifluoroacetato como contraión que pueden ser adecuados para la preparación de un medicamento. Sin embargo, en muchos casos puede ser ventajoso sustituir el contraión trifluoroacetato por un anión farmacéuticamente aceptable o preferido, como acetato. Esto puede efectuarse por cromatografía de intercambio iónico. Alternativamente, el producto peptídico primario puede liofilizarse y disolverse en ácido clorhídrico diluido repetidamente para obtener el clorhidrato purificado.

[0025] El conjugado peptídico de la fórmula I o III o un fragmento epitópico del mismo que comprende una parte o toda la secuencia (RK)YY(RK)(WI)(RK) y/o una parte o toda la secuencia Z o la secuencia Z', preferentemente acoplado a un transportador a través de un resto de cisteína terminal, puede usarse para producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a dichos conjugados peptídicos o dicha secuencia X. El resto de Cys terminal se obtiene opcionalmente a través de la sustitución por un resto de Cys de uno de los restos aminoácidos terminales de dicho conjugado peptídico o dicho fragmento epitópico del mismo o dicho conjugado peptídico o dicho fragmento epitópico del mismo comprenden otro resto de Cys en uno de sus extremos. Algunos ejemplos de fragmentos peptídicos con una C terminal útil para la producción de anticuerpos capaces de unirse específicamente a los conjugados peptídicos de la invención son RYYRWKC, KYRWKC, CWKKKKKKK, CKKKKKK y CWKKKKK. Además, es posible usar fragmentos peptídicos con una homología de secuencia considerable con los conjugados peptídicos de la invención para la producción de anticuerpos capaces de unirse específicamente a los conjugados peptídicos de la invención. Algunos ejemplos son CAPPSKKKKKK, CAAPKKKKK, CPPSKKKKK, etc. Opcionalmente, cada uno de los conjugados peptídicos anteriores con una Cys en el extremo pueden tener al

menos un aminoácido en la forma D.

[0026] Tal como se discutirá con más detalle a continuación, los nuevos conjugados peptídicos pueden administrarse como un agente activo por sí solo o en combinación con uno o más medicamentos como los que se indican específicamente a continuación.

[0027] En toda la descripción y en las reivindicaciones se usa el código de una letra para los aminoácidos naturales, así como el código de tres letras para los aminoácidos naturales y otros códigos de tres letras generalmente aceptados para otros α -aminoácidos, como ornitina (Orn), ácido 2,4-diaminobutanoico (Dab) y ácido 2,3-diaminopropanoico (Dap). Si no se ha especificado la forma L o D, se entiende que el aminoácido en cuestión presenta la forma natural L, véase Pure & Appl. Chem. vol. 56 (5), págs. 595-624 (1984). En caso de que no se especifique nada, se entiende que el aminoácido C-terminal de un compuesto de la invención se encuentra como ácido carboxílico libre, lo que puede expresarse también como “-OH”. Véase Biochem. J., 1984, 219, 345-373; Eur. J. Biochem., 1984, 138, 9-37; 1985, 152, 1; 1993, 213, 2; Internat. J. Pept. Prot. Res., 1984, 24, pág. 84 y sig.; J. Biol. Chem., 1985, 260, 14-42; Pure Appl. Chem., 1984, 56, 595-624; Amino Acids and Peptides, 1985, 16, 387-410; Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2ª. edición, Portland Press, 1992, págs. 39-69; copyright IUBMB y IUPAC. El término “forma con todos D” de un conjugado peptídico de las fórmulas I o III se refiere a un péptido cuando todas las unidades aminoacídicas están en la forma D. Opcionalmente, en un conjugado peptídico de la invención, la secuencia definida por la fórmula (RK)YY(RK)(WI)(RK) está en la forma con todos D. Los D-aminoácidos son aminoácidos no naturales estables en un entorno rico en proteasas. Por lo tanto, una manera útil de estabilizar los conjugados peptídicos de la invención contra la degradación proteolítica es sustituir los L-aminoácidos por los D-aminoácidos correspondientes. El término “fragmento epitópico” se refiere a una sección truncada o acortada de una secuencia peptídica que tiene, por ejemplo, 5-8 unidades aminoacídicas y es capaz de provocar una respuesta antigénica.

[0028] El término “alquilo” se refiere a grupos monovalentes derivados de alcanos por la eliminación de un átomo de hidrógeno de cualquier átomo de carbono: C_nH_{2n+1} -. Los grupos derivados de alcanos sin ramificar por eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono terminal forman una subclase de los grupos alquilo normales (*n*-alquilo): $H[CH_2]_n$ -. Los grupos RCH_2 -, R_2CH - (R distinto de H) y R_3C - (R distinto de H) son grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios, respectivamente. “Alquilo” se refiere a cualquier grupo alquilo e incluye alquilo C(1-6), como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo y hexilo y cualquier posible isómero de los mismos. Por “alquilo inferior” se entiende alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-4), con mayor preferencia metilo y etilo.

[0029] El término “alcoxi C(1-6)” se refiere a un grupo éster de la fórmula R-O-, en la que R representa alquilo C(1-6). El término “ariloxi” se refiere a un grupo éster de la fórmula R-O-, en la que R representa fenilo o naftilo, opcionalmente sustituido con un grupo alquilo inferior.

[0030] El término “acilo”, tal como se usa en este documento, incluye radicales acilo que derivan formalmente de oxoácidos $R_kE(=O)(OH)_m$ (l distinto de 0) por eliminación de un catión hidroxilo HO^+ , un radical hidroxilo HO o un anión hidroxilo HO-, respectivamente y análogos de sustitución de tales intermedios. Los radicales acilo pueden representarse formalmente por formas canónicas que tienen un electrón desapareado o una carga positiva en el elemento que genera el ácido del oxoácido. Ejemplos de radicales acilo: $RC(=O)$, $RS(=O)_2$.

[0031] El término “acilado”, tal como se usa en este documento, indica que el compuesto en cuestión porta un grupo acilo. Un grupo acilo se forma por la eliminación de uno o más grupos hidroxilo de un oxoácido, como un ácido carboxílico, que tiene la estructura general $R_kE(=O)(OH)_m$ (l distinto de 0) y análogos de sustitución de tales grupos acilo. Ejemplos: $CH_3C(=O)$ -, $CH_3C(=NR)$ -, $CH_3C(=S)$ -, $PhS(=O)_2$ -, $HP(=N)$ -. En química inorgánica, un grupo acilo sin especificar es normalmente un grupo acilo carboxílico. Véase, International Union of Pure and Applied Chemistry, Recommendations on Organic & Biochemical Nomenclature, Symbols & Terminology, etc., IUPAC Recommendations 1994. “Ac” indica un grupo acetilo y “Tfa” indica un grupo trifluoroacético.

[0032] El término “conjugado peptídico”, tal como se usa en este documento, indica una fusión de al menos dos secuencias peptídicas por medio de un enlace peptídico o un enlace bioisostérico equivalente, como el mimetismo del enlace peptídico descrito en la tabla 1 en Tayar y col., Amino Acids (1995) 8:125-139.

[0033] El término “fracción de transporte”, tal como se usa en este documento, indica una entidad química que sirve de escolta a moléculas como polipéptidos a través de membranas biológicas. Los polímeros de transporte se desvelan en el documento WO 98/52612. Los conjugados peptídicos de la invención están unidos a dicha fracción de transporte por medio de un enlace covalente. El término “restos 49-57 del péptido tat del VIH” se refiere a una fracción de transporte con la secuencia RKKRRQRRR según se desvela en el documento WO 91/09958.

[0034] “Agonista” se refiere a una sustancia endógena o a un fármaco que puede interactuar con un

receptor e iniciar una respuesta fisiológica o farmacológica característica de tal receptor (contracción, relajación, secreción, activación enzimática, etc.).

[0035] “Antagonista” se refiere a un fármaco o un compuesto que se opone a los efectos fisiológicos de otro.

5 Hablando de receptores, es una entidad química que se opone a las respuestas asociadas al receptor inducidas normalmente por otro agente bioactivo.

[0036] “Agonista parcial” se refiere a un agonista que es incapaz de inducir la activación máxima en una población de receptores, independientemente de la cantidad de fármaco administrado (véase también actividad intrínseca). Un “agonista parcial” puede denominarse también “agonista con eficacia intrínseca intermedia” en un tejido dado. Además, un agonista parcial puede antagonizar el efecto de un agonista total que actúa sobre el mismo receptor.

[0037] “Receptor” se refiere a una molécula o una estructura polimérica en o sobre una célula que reconoce específicamente y se une a un compuesto que actúa como mensajero molecular (neurotransmisor, hormona, linfocina, lectina, fármaco, etc.).

[0038] El término “sal”, tal como se usa en este documento, denota sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos inorgánicos u orgánicos y/o bases, preferentemente sales básicas. Mientras que se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables, en particular cuando se emplean los compuestos de la invención como medicamentos, otras sales son útiles, por ejemplo, para el procesamiento de estos compuestos o en los casos en que se contemplan usos no medicamentosos. Las sales de estos compuestos pueden prepararse por procedimientos reconocidos en la técnica. Algunos ejemplos de tales sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de adición de ácido inorgánico y orgánico, como clorhidratos, sulfatos, nitratos o fosfatos y acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, succinatos, benzoatos, citratos, tartratos, fumaratos, maleatos, metanosulfonatos, isotionatos, teofilinacetatos, salicilatos, respectivamente, o similares. Las sales de amonio cuaternario de alquilo inferior y similares también son adecuadas. La expresión “aniones farmacéuticamente aceptables”, tal como se usa en este documento, incluye el grupo que consta de CH_3COO^- , CF_3COO^- , Cl^- , SO_3^{2-} , maleato y oleato.

[0039] El término “administración por vía periférica” incluye todas las formas de administración que excluyen la administración de la sustancia activa directamente en el sistema nervioso central. “Administración por vía central”, tal como se usa en este documento, significa la administración directamente en el sistema nervioso central, como la administración por vía intracerebroventricular (administración i.c.v.).

[0040] El término “hiponatremia”, tal como se usa en este documento, incluye, pero no se limita necesariamente a las siguientes afecciones médicas:

pseudohiponatremia, caracterizada por una osmolalidad plasmática normal asociada, por ejemplo, con hiperlipidemia, hiperproteinemia o después de la resección transuretral de tumores de próstata/vejiga y una osmolalidad plasmática incrementada asociada, por ejemplo, con hiperglucemia y manitol;

hiponatremia hipoosmolal, caracterizada por

45 pérdida primaria de Na^+ (ganancia secundaria de agua) asociada, por ejemplo, con pérdidas tegumentarias: sudor, quemaduras; pérdidas gastrointestinales: vómitos, tubos de drenaje, fístulas, obstrucciones, diarrea; pérdidas renales: diuréticos, diuresis osmótica, hipoaldosteronismo, nefropatía con pérdida de sal, diuresis postobstructiva, necrosis tubular aguda no oligúrica;

50 ganancia primaria de agua (pérdida secundaria de Na^+) asociada, por ejemplo, con polidipsia primaria; disminución de la absorción de solutos (por ejemplo, potomanía de cerveza); liberación de AVP (vasopresina) debida a dolor, náuseas, fármacos; síndrome de la secreción inapropiada de AVP; deficiencia de glucocorticoides; hipotiroidismo e insuficiencia renal crónica; y

55 ganancia primaria de Na^+ (superada por una ganancia secundaria de agua) asociada, por ejemplo, con insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y síndrome nefrótico.

Insuficiencia cardíaca congestiva (ICC)

60 **[0041]** La insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) es el estado patofisiológico en el que una anomalía en la actividad cardíaca es responsable de la incapacidad del corazón de bombear la sangre a un ritmo en correspondencia con los requerimientos de los tejidos metabolizantes. Con independencia de la causa subyacente

de la ICC (por ejemplo, cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, cardiomiopatía dilatada, valvulopatía, anemia, etc.), la principal manifestación clínica de la insuficiencia cardíaca es la disnea, que se presenta con actividades menos fatigosas a medida que progresa la enfermedad. Según la clasificación funcional de la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA), los pacientes de ICC pueden clasificarse en una de cuatro clases (clase I, clase II, clase III y clase IV). Esta clasificación funcional se usa en todo el mundo y está estrechamente asociada a la mortalidad, la cual es independiente de la fracción de eyección ventricular.

[0042] La insuficiencia cardíaca congestiva se caracteriza por una compleja serie de ajustes neurohumorales. Los principales mecanismos son la activación del sistema nervioso simpático, la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona y la estimulación de la liberación de vasopresina. Estas influencias elevan la resistencia vascular sistémica y aumentan la retención de sodio y agua, mientras que la excreción de potasio aumenta debido al hiperaldosteronismo. Debido a la activación de los mecanismos de retención de agua, los pacientes con ICC terminal tienen una capacidad de excreción de agua reducida y, a menos que se limite la ingesta de agua, estos pacientes presentan un gran riesgo de padecer hiponatremia dilucional.

15

Tratamiento actual de la ICC

[0043] El propósito del tratamiento médico es aliviar los síntomas debilitantes de los pacientes sin comprometer demasiado la actividad miocárdica. Durante la progresión de la ICC, el tratamiento médico se intensifica mediante la adición de fármacos con diferentes puntos de acción. El tratamiento actual de la insuficiencia cardíaca puede dividirse en tres categorías: (1) reducción del trabajo cardíaco, incluidas la precarga y la postcarga; (2) control de la excesiva retención de agua y sal; (3) mejora de la contractilidad miocárdica. Normalmente, los pacientes de la clase IV de la NYHA reciben un tratamiento con dosis máximas de vasodilatadores, como inhibidores de ACE, hidralazina, inhibidores α -adrenérgicos y nitratos. Sin embargo, la congestión pulmonar debida a la retención de agua y sal todavía es un problema fundamental en estos pacientes. A pesar del intensivo tratamiento médico con medicamentos de todas clases, la mortalidad y morbilidad todavía es muy alta en los pacientes con ICC.

25

[0044] Los pacientes con insuficiencia cardíaca grave (clases III y IV de la NYHA) requieren normalmente una combinación de al menos dos diuréticos diferentes con distintos puntos de acción en los túbulos renales. La de uso más común es una combinación de un diurético del asa (por ejemplo, furosemida, bumetanida) y un diurético tiazida (por ejemplo, clorotiazida, bendroflumetiazida). Unas dosis altas de esta combinación son el tratamiento más efectivo para producir natriuresis (la máxima eficacia es aproximadamente el 30% de la carga filtrada para los diuréticos del asa y aproximadamente el 10% para las tiazidas). Sin embargo, el bloqueo de la reabsorción de sodio en los túbulos contorneados distales (es decir, en el segmento diluyente), que es sensible a tiazida puede producir orina hipertónica y contribuir a la hiponatremia dilucional. El hiperaldosteronismo y el aumento asociado de la liberación de sodio en los tubos colectores estimula el intercambio entre sodio y potasio en los tubos colectores, lo que resulta en potasiuresis. Por lo tanto, un tratamiento combinado con diuréticos del asa y tiazidas es la causa más común tanto de hiponatremia como de hipopotasemia en pacientes con insuficiencia cardíaca. Los diuréticos ahorradores de potasio (por ejemplo, espironolactona, amilorida) pueden usarse en combinación con tiazidas o diuréticos del asa, pero la baja eficacia máxima de estos compuestos (como máximo el 3% del agua filtrada) hace que estos fármacos sean diuréticos débiles.

30

35

40

[0045] Además, debido al hiperaldosteronismo, los pacientes con ICC terminal presentan un gran riesgo de padecer hipopotasemia.

45

[0046] Cuando los síntomas como disnea en reposo, ortopnea y disnea nocturna paroxística persisten a pesar del máximo tratamiento médico con diuréticos del asa (ICC resistente a diuréticos del asa o ICC refractaria), es necesario un tratamiento diurético adicional para evitar la congestión pulmonar que puede ocasionar la muerte. Con frecuencia, las tiazidas son la primera elección cuando fracasa el efecto terapéutico de los diuréticos del asa. La combinación de diuréticos del asa y tiazidas produce una natriuresis efectiva, pero la inhibición de la reabsorción de sodio en el segmento diluyente de la nefrona, sensible a tiazida, resulta a menudo en orina hipertónica, lo que puede dar lugar a trastornos electrolíticos graves. Por lo tanto, la combinación de diuréticos del asa y tiazidas es la causa más común de hipopotasemia e hiponatremia en pacientes con insuficiencia cardíaca de clase IV según la NYHA^[3].

50

[0047] La hipopotasemia es un mecanismo fundamental de predisposición al padecimiento de arritmias y el pronóstico de la ICC es malo cuando la concentración de potasio desciende por debajo de 3,3 mM. Además, en pacientes de ICC tratados con digoxina, la hipopotasemia es el factor más común desencadenante de la intoxicación digitálica, lo que es una complicación grave y potencialmente fatal.

55

[0048] En los pacientes con insuficiencia cardíaca grave, el tratamiento combinado con diuréticos del asa y tiazidas produce con frecuencia hiponatremia hipotónica como consecuencia del aumento de las pérdidas de sodio y la reducción de la excreción de agua. Si la hiponatremia se desarrolla demasiado rápidamente para permitir una

60

adaptación del cerebro, se producen síntomas de edema cerebral (por ejemplo, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, debilidad, falta de coordinación, temblores, delirio y en último término ataques y coma). La muerte se produce cuando la concentración de sodio en el suero (S-Na) desciende por debajo de 120 mM a una velocidad superior a 1 mmol/l/h. Si la hiponatremia se desarrolla más gradualmente, los síntomas son más sutiles, vagos o inespecíficos y tienden a presentarse a concentraciones aún inferiores de S-Na. Típicamente, los síntomas incluyen cambios en la personalidad (depresión, ausencia de cooperación, confusión), anorexia, náuseas, debilidad muscular y calambres. Si S-Na < 120 mM pueden producirse trastornos de la marcha, estupor y ataques.

[0049] La clase IV representa el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca terminal. Entre las manifestaciones clínicas características, el síntoma más notable es la disnea en reposo. A medida que la insuficiencia cardíaca avanza, la disnea aparece con actividades cada vez menos fatigosas, sin embargo, durante la insuficiencia cardíaca terminal, la disnea es común incluso en la posición de decúbito (ortopnea). Los pacientes presentan vasos pulmonares engrosados y edema pulmonar intersticial, lo que con frecuencia es evidente en un examen radiológico. Los pacientes con ortopnea deben levantar la cabeza para aliviar la congestión pulmonar y están frecuentemente despiertos durante la noche, con intensos ataques de tos y la sensación de falta de aire (disnea nocturna). Esta afección es bastante aterradora y a menudo la ansiedad empeora los síntomas de la insuficiencia cardíaca.

[0050] En los pacientes de la clase IV, además de con congestión pulmonar, la reducida actividad cardíaca está asociada con congestión hepática y del sistema de la vena porta, lo que produce anorexia, náuseas y dolor abdominal. Los pacientes de la clase IV presentan una mortalidad en un año extremadamente alta (30-80%). Las causas principales de la muerte son la muerte súbita (40%) y el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (40%). Entre los factores asociados con un mal pronóstico se cuentan una baja fracción de eyección (< 25%), una absorción de oxígeno reducida, una concentración de sodio en el suero reducida (< 133 mM) y una concentración de potasio en el suero reducida (< 3 mM)^[3]. Los conjugados peptídicos de la invención muestran un perfil farmacológico ventajoso que sugiere una capacidad para aliviar la congestión pulmonar, disminuir la precarga y la postcarga, aumentar el gasto cardíaco y la absorción de oxígeno y prevenir hiponatremia e hipopotasemia.

[0051] Cuando el gasto cardíaco se reduce tiene lugar una serie de ajustes compensatorios que en último término resultan en la acumulación anormal de fluido. En los pacientes de ICC de las clases I a III según la NYHA, la acumulación anormal de fluido y la expansión acompañante de la volemia constituyen un mecanismo compensatorio importante que tiende a mantener el gasto cardíaco y la perfusión de los órganos vitales. Sin embargo, en el estado terminal de la insuficiencia cardíaca (clase IV según la NYHA) los ventrículos cardíacos trabajan con una curva de actividad deprimida y aplanada y en la insuficiencia cardíaca terminal, el paciente finaliza en la parte descendente de la curva de Starling de volumen-gasto cardíaco. Por lo tanto, estos pacientes necesitan un tratamiento diurético efectivo para controlar la volemia y evitar el edema pulmonar que puede ocasionar la muerte. Los efectos ventajosos de los conjugados peptídicos de la invención en la insuficiencia cardíaca, como la insuficiencia cardíaca refractaria, resistente a los diuréticos del asa, son disminuir la volemia y la congestión pulmonar. Si el paciente se encuentra en la parte aplanada de la curva, el gasto cardíaco disminuye ligeramente y si el paciente se encuentra en la parte descendente de la curva, el gasto cardíaco puede aumentar^[3].

[0052] Al tener un perfil farmacológico único como acuaréticos ahorradores de potasio y sodio, los conjugados peptídicos de la invención, como el compuesto 1, representan los fármacos candidatos ideales para el tratamiento de los síntomas de ICC en pacientes con insuficiencia cardíaca refractaria que ya no responden suficientemente a altas dosis de diuréticos del asa. En estos pacientes, los nuevos conjugados peptídicos, como tratamiento adicional o combinado con los diuréticos del asa, pueden favorecer una diuresis efectiva sin las pérdidas aceleradas de sodio y potasio observadas con otros diuréticos. Este mismo perfil farmacológico único presentará también una ventaja en el tratamiento de la hiponatremia, nefropatía y edema asociados con el síndrome nefrótico y la cirrosis hepática.

50 Farmacología

Ensayo del conducto deferente de ratón

55 **[0053]** Los compuestos de la presente invención son farmacológicamente activos, por ejemplo, como agonistas o agonistas parciales de nociceptina y un procedimiento útil para demostrar su actividad es el descrito por Hughes, J., Kosterlitz, H. W., Leslie, F. M.: Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics^[4]. La preparación del conducto deferente aislado y estimulado eléctricamente se ha usado ampliamente para evaluar las actividades farmacológicas funcionales de agonistas y antagonistas de opioides *in vitro*^[5]. El conducto deferente de ratón tiene los tres tipos de receptores de opioides y los estudios subsiguientes han descrito que el ensayo del conducto deferente de ratón también es sensible a nociceptina^[6].

[0054] Los conductos deferentes de ratones albinos NMRI macho con un peso de 30-40 g se colocaron en un baño de órganos SCHULER tipo 809, Hugo Sachs Elektronik, Alemania, y se perfundieron a 37°C con una disolución de Krebs modificada (NaCl 6,9 g/l, KCl 0,35 g/l, KH₂PO₄ 0,16 g/l, NaHCO₃ 2,1 g/l, glucosa H₂O 2,0 g/l, CaCl₂ 2,52 ml/l). La disolución se gaseó con carbógeno (O₂ al 95% y CO₂ al 5%) durante todo el experimento. El tejido se estimuló eléctricamente por medio de dos electrodos de plata directamente en el baño de órganos mediante un estimulador HSE I, tipo 215. La estimulación del tejido se realizó mediante la aplicación de una tensión supramáxima (15 V) en sucesiones de 10 pulsos cuadrados cada 60 s, cada uno de 1 ms de duración con una frecuencia de 100 ms. Las curvas de respuesta a la concentración se realizaron mediante la adición acumulativa a los baños de órganos de sustancias de prueba que relajan los músculos lisos del conducto deferente de ratón. Las sustancias de prueba usadas en el ensayo fueron nociceptina en una disolución salina isotónica, el compuesto 1 (como trifluoroacetato en una disolución salina isotónica), el compuesto 2 (como trifluoroacetato en una disolución salina isotónica) y el hexapéptido Ac-RYYRWK-NH₂ (como trifluoroacetato en una disolución salina isotónica). Los conjugados peptídicos de la presente invención son biológicamente activos en el ensayo del conducto deferente de ratón (MVD), pero los compuestos inhiben la contracción del conducto deferente de ratón inducida eléctricamente con una potencia variable: nociceptina > compuesto 1 = compuesto 2 >> Ac-RYYRWK-NH₂ (datos no mostrados).

[0055] También se ensayaron los efectos de Ac-RYYRWK-NH₂ y del compuesto 1 sobre la relajación inducida por nociceptina en el ensayo del conducto deferente de ratón. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 1. Estos datos demuestran que tanto el agonista parcial Ac-RYYRWK-NH₂^[1] como el conjugado peptídico denominado compuesto 1 inhiben la relajación del músculo liso inducida por nociceptina. Los valores pA₂ que indican la afinidad de un compuesto como antagonista se calcularon mediante la ecuación de Schild^[7]. Estos valores se presentan en la tabla 2:

Tabla 2	Ac-RYYRWK-NH ₂	Compuesto 1
Valor pA ₂ (número de experimentos)	7,8 (n = 4)	9,5 (n = 4)

[0056] Estos datos demuestran que el compuesto 1 es aproximadamente 50 veces más potente como antagonista en la relajación del músculo liso inducida por nociceptina en el ensayo MVD que el hexapéptido sin conjugar Ac-RYYRWK-NH₂.

Estudios *in vivo*

[0057] Los estudios previos han demostrado que la nociceptina produce un notable incremento de la tasa de flujo urinario y una disminución de la excreción de sodio urinario (es decir, una respuesta acuareática) cuando se administra por vía central (intracerebroventricular, i.c.v.) o como infusión i.v. en ratas conscientes^[8-10]. En el modelo de la rata consciente, el animal porta de manera permanente catéteres en la vejiga urinaria, la arteria femoral y la vena femoral. El animal recibe una infusión i.v. continua con disolución salina isotónica a 50 µl/min. La orina se recoge en viales en periodos de recogida consecutivos de 10 min cada uno. Después de dos periodos de control se administra el compuesto de prueba y se continúa con la recogida fraccionada de orina (periodos de 10 min) durante al menos 2 h. Las concentraciones urinarias de sodio y potasio se determinan por fometría de llama (Instrumentation Laboratory 943) con cesio como estándar interno.

[0058] El efecto diurético de los conjugados peptídicos de la invención ha sido ensayado en ratas conscientes, en las que el compuesto 1 provoca una respuesta diurética intensa y sostenida. Las respuestas cardiovascular y renal producidas por la infusión i.v. de nociceptina (Phoenix Pharmaceuticals) y el compuesto 1 se han estudiado en ratas Sprague Dawley conscientes. Los resultados se muestran en las figuras 2 a 8, en las que HR es la frecuencia cardíaca, MAP es la presión arterial media, V es la tasa de flujo urinario, U_{Na}V es la tasa de excreción urinaria de sodio, RSNA es la actividad nerviosa simpática renal expresada como % del nivel de control, C_{osm} es el aclaramiento osmolar y C_{H₂O} es el aclaramiento de agua libre.

[0059] La figura 2 muestra las típicas respuestas cardiovascular y renal a nociceptina administrada como infusión i.v. (11 nmol/kg/min). La nociceptina disminuye la MAP significativamente, posiblemente debido a la relajación del músculo liso arterial^[11].

[0060] La figura 3 muestra las respuestas diurética (V µl/min) y antinatriurética (U_{Na}V µeq/min) significativas al compuesto 1 administrado como infusión i.v. (1 y 0,1 nmol/kg/min). De manera similar a la nociceptina i.v., el compuesto 1 produjo una reducción ligera pero significativa de la MAP, con poco efecto en la HR. Ninguna de las ratas a las que se administró el compuesto 1 mostró señales de un aumento del apetito, sedación o cambios de comportamiento normalmente asociados con el tratamiento con nociceptina.

[0061] La figura 4 muestra la disminución del aclaramiento osmolar y el aumento del aclaramiento de agua

libre observados durante la infusión i.v. del compuesto 1 (1 y 0,1 nmol/kg/min).

[0062] La figura 5 ilustra la magnitud similar de los cambios en V y $U_{Na}V$ provocados por la infusión i.v. de 1 nmol/kg/min del compuesto 1 y 11 nmol/kg/min de nociceptina.

5

[0063] La figura 6 ilustra la magnitud similar de los cambios en V y $U_{Na}V$ provocados por la infusión i.v. de 0,1 nmol/kg/min del compuesto 1 y 1,1 nmol/kg/min de nociceptina. En conjunto, los datos presentados en las figuras 5 y 6 sugieren que, en comparación con la auténtica nociceptina, el compuesto 1 es aproximadamente 10 veces más potente en la producción de respuestas diurética y antinatriurética de magnitud similar. El efecto diurético de la infusión del compuesto 1 tendió a persistir durante más tiempo que el de la infusión i.v. de nociceptina.

10

[0064] Además, se estudiaron los efectos de la administración i.v. de bolos de nociceptina (30 y 100 nmol/kg, Phoenix Pharmaceuticals) y nociceptina-NH₂ (30 nmol/kg) sobre la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la RSNA en grupos de seis ratas Sprague-Dawley conscientes. La inyección de bolos produjo una rápida bradicardia, una respuesta hipotensiva y la supresión inicial de la RSNA (datos no mostrados). Una inyección i.v. similar de bolos del compuesto 1 (30 nmol/kg) no produjo ningún cambio en la frecuencia cardíaca, la presión arterial ni la RSNA. Además, las ratas que recibieron esta dosis no mostraron ninguna señal de estimulación del apetito o de cambios de comportamiento. La inyección i.v. de bolos del compuesto 1 (30 nmol/kg) en esta misma rata produjo una notable respuesta diurética (V) y antinatriurética ($U_{Na}V$) (datos no mostrados). Un resumen de las respuestas *in vivo* al compuesto 1 obtenidas en los experimentos descritos anteriormente se muestra en la tabla 3 a continuación:

15

20

Tabla 3: respuestas *in vivo* de las series de experimentos en que

Dosis i.v. del compuesto 1	HR	MAP	V	$U_{Na}V$	C_{H_2O}	Ingesta de alimento	Cambios de comportamiento
Infusión i.v. 0,1 nmol/kg/min	0	(↓)	↑	0	↑	0	0
Infusión i.v. 1,0 nmol/kg/min	0	(↓)	↑↑	↓	↑↑	0	0
Inyección i.v. de bolos 30 nmol/kg	0	0	↑	↓	↑	0	0

0 indica falta de respuesta, (↓) indica una disminución muy ligera, ↓ indica una ligera disminución, ↑ indica un ligero aumento y ↑↑ indica un fuerte aumento.

[0065] De estos estudios, es evidente que el compuesto 1 provoca una respuesta diurética significativa a dosis de infusión i.v. muy por debajo de las requeridas para provocar cambios en la alimentación o el comportamiento (por ejemplo, sedación, comportamiento de exploración aumentado, catalepsia, convulsiones, etc.).

25

Además, después de 120 min de infusión i.v. del compuesto 1 (1 nmol/kg/min) en el estudio presentado en la figura 3, se examinaron las respuestas de HR y MAP a una inyección i.v. de bolos de nociceptina. En estos estudios se bloqueó completamente la bradicardia y la hipotensión típicas (de aparición rápida y de gran magnitud) en todas las ratas sometidas al ensayo (n = 6).

30

[0066] En una serie adicional de estudios de respuesta a la dosis se investigaron las respuestas cardiovascular y renal al compuesto 1 después de una inyección i.v. de bolos (10 (n = 6), 30 (n = 4), 100 (n = 6) o 300 (n = 4) nmol/kg i.v.) o durante una infusión i.v. continua (0,1 (n = 6), 1 (n = 6) o 10 nmol/kg/min (n = 6)). Después de la estabilización de la tasa de flujo urinario y de la excreción urinaria de sodio, la orina se recogió durante un periodo de control de 20 min. A continuación se administró la inyección i.v. de bolos o se cambió la infusión i.v. por una disolución salina isotónica que contenía el compuesto 1 (experimentos de infusión i.v.). A partir del momento de la administración del fármaco se tomaron muestras experimentales de orina (periodos consecutivos de 10 min) durante 80 min.

35

Observaciones de la respuesta de alimentación

40

[0067] Una hora antes del comienzo de cada experimento se colocó una pella de alimento (comida estándar para roedores) accesible para la rata a través de un agujero en el dispositivo de inmovilización. Se registraron el número y el momento de las respuestas de alimentación (es decir, los tiempos en que la rata comenzó a comer la pella de alimento) antes y después de la administración del fármaco. En caso de observarse una respuesta de alimentación positiva se retiró la pella del inmovilizador para evitar alteraciones de la frecuencia cardíaca y/o la presión arterial media inducidas por el alimento. La pella de alimento se presentó a la rata a intervalos de 10 min para determinar la duración de la respuesta de alimentación.

45

[0068] En esta serie de estudios en ratas conscientes con catéteres permanentes hemos demostrado que la inyección i.v. de bolos del compuesto 1 produce una diuresis acuosa selectiva. Los datos se presentan en la tabla 4

50

a continuación:

Tabla 4: respuestas después de la administración i.v. de bolos del compuesto 1

Parámetros estudiados	Dosis i.v. de bolos (nmol/kg)			
	10 (n = 6)	30 (n = 4)	100 (n = 6)	300 (n = 4)
Δ flujo de orina (%)	+83 ± 42	+207 ± 11	+249 ± 60	+127 ± 47
Δ excreción de Na (%)	-44 ± 3	-51 ± 7	-70 ± 2	-85 ± 6
Δ excreción de K (%)	-35 ± 4	-20 ± 7	-52 ± 5	-79 ± 6
Δ presión sanguínea (%)	-4 ± 1	-8 ± 2	-12 ± 2	-15 ± 3
Ingesta de alimento	-	(+)*	(+)**	(+)***

* Indica que de 4 ratas sometidas a ensayo con 30 nmol/kg de bolos i.v., una rata demostró una respuesta de alimentación en varios puntos de tiempo durante el periodo experimental de 80 min.
 ** Indica que de 6 ratas sometidas a ensayo con 100 nmol/kg de bolos i.v., 3 ratas mostraron una respuesta de alimentación dentro de los 30 min después de la administración i.v. de los bolos de ZP120C. En las 3 ratas restantes no se observó ninguna respuesta de alimentación en todo el periodo de ensayo (80 min).
 *** Indica que de 4 ratas sometidas a ensayo con 300 nmol/kg de bolos i.v., 2 ratas demostraron una respuesta de alimentación en diversos puntos de tiempo en el periodo experimental de 80 min.

- 5 **[0069]** En la administración como infusión i.v. continua, se observó una respuesta diurética acuosa selectiva (diuresis asociada con antinatriuresis) para 1 y 10 nmol/kg/min (tabla 5).

Tabla 5: respuestas durante la infusión i.v. del compuesto 1

Parámetros estudiados	Dosis de infusión i.v. (nmol/kg/min)		
	0,1 (n = 6)	1,0 (n = 6)	10 (n = 6)
Δ flujo de orina (%)	+99 ± 21	210 ± 51	160 ± 68
Δ excreción de Na (%)	-5 ± 3	-64 ± 7	-79 ± 6
Δ excreción de K (%)	-16 ± 6	-51 ± 9	-68 ± 15
Δ presión sanguínea (%)	-5 ± 4	-10 ± 2	-15 ± 3
Ingesta de alimento	-	-	(+)*

*Indica que de 6 ratas sometidas a ensayo con 10 nmol/kg/min, 4 ratas no mostraron una respuesta de alimentación y 2 ratas comieron en el último periodo de 10 min del estudio de infusión de 80 min.

- [0070]** De manera colectiva, estos estudios de respuesta a la dosis demuestran que el compuesto 1 produce una respuesta diurética acuosa significativa a dosis de infusión i.v. y de inyección i.v. de bolos que se encuentran muy por debajo de las requeridas para provocar cambios considerables en la actividad cardiovascular. Esto está en contraste con la diuresis producida por la nociceptina endógena, a la que sigue una notable respuesta Bradicárdica e hipotensiva (bolos i.v. e inyección i.c.v.) y una inhibición simultánea de la actividad nerviosa simpática renal (inyección i.c.v.)^[8-10]. Estas observaciones sugieren que, a diferencia del ligando endógeno de ORL1, nociceptina, el compuesto 1 tiene utilidad clínica como acuarético en pacientes a dosis terapéuticas sustancialmente inferiores a las requeridas para provocar efectos cardiovasculares sistémicos adversos. Nuestra especulación es que una menor penetración del compuesto 1 en el SNC puede explicar el efecto renal más selectivo del nuevo compuesto en comparación con la nociceptina endógena.

- [0071]** Las ratas con cirrosis hepática inducida por ligadura del conducto biliar común desarrollan una ávida retención de sodio y de agua y ascitis en 2-4 semanas. La alteración del equilibrio de sodio y agua en las ratas cirróticas concuerda con las observaciones clínicas fundamentales de edemas y ascitis en los pacientes con cirrosis hepática. Para examinar la eficacia del compuesto 1 en un modelo experimental de un estado formador de edemas, se evaluó la respuesta diurética a una única inyección i.v. de bolos del compuesto 1 (65 nmol/kg) en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del conducto biliar común cuatro semanas antes. Antes de los experimentos se colocaron catéteres permanentes a las ratas en la vejiga urinaria y en la vena y la arteria femoral. Las respuestas renales al compuesto 1 se compararon con las respuestas en ratas usadas como testigos quirúrgicos. El compuesto 1 produjo un notable aumento del aclaramiento de agua libre (diuresis acuosa), asociado con una disminución de la excreción urinaria de sodio y potasio en ausencia de cambios de la tasa de filtración glomerular en todos los animales. Las respuestas renales fueron similares en las ratas cirróticas y en las ratas de control. Los cambios relativos en la tasa de flujo urinario y la excreción de sodio y potasio después de la administración i.v. de 65 nmol/kg en los animales usados como control quirúrgico se resumen en la figura 7.

- [0072]** Tal como se ilustra en la figura 8, las ratas cirróticas mostraron una excreción fraccional de sodio antes de la administración del fármaco significativamente inferior en comparación con los animales de control. Esto indica que las ratas cirróticas presentaban una intensa retención de sodio, lo que concuerda con la notable retención de sodio que caracteriza la cirrosis hepática humana. El compuesto 1 produce un notable aumento de la tasa de flujo

urinario y del aclaramiento de agua libre (diuresis acuosa), asociado con una disminución de la excreción fraccional de sodio y potasio en ausencia de cambios en la tasa de filtración glomerular en todos los animales. Las respuestas renales fueron similares en las ratas cirróticas y las ratas de control. Los cambios en la tasa de flujo urinario, el aclaramiento de agua libre, la excreción fraccional de sodio y la excreción fraccional de potasio después de la administración i.v. de 65 nmol/kg en las ratas usadas como control quirúrgico y en los animales cirróticos se resumen en la figura 8. Estos resultados en un modelo animal de un estado patológico caracterizado por la ávida retención de sodio indican que los compuestos de la presente invención, como el compuesto 1, son útiles en el tratamiento de edemas, hipopotasemia e hiponatremia en estados formadores de edemas como cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome nefrótico e insuficiencia renal.

10

[0073] Para evaluar si se desarrolla taquifilaxia aguda durante el tratamiento i.v. con el compuesto 1 se realizó una serie de experimentos adicionales. Las ratas con catéteres permanentes se sometieron a la infusión de un vehículo (glucosa 150 mM) o del compuesto 1 (1 nmol/kg) durante 12 h mientras que el equilibrio hídrico se mantuvo por medio de un sistema i.v. de reposición de la volemia dirigido por ordenador y servocontrolado ^[2]. Una taquifilaxia aguda se ha observado durante la dosificación i.v. repetida del antagonista de vasopresina SFK 101926 en perros conscientes ^[12] y se ha descrito tolerancia durante el tratamiento crónico para el antagonista selectivo del receptor V₂, OPC-31260 ^[13].

15

[0074] El compuesto 1 provocó una respuesta acuareática sostenida que duró las 12 horas del periodo de infusión, lo que sugiere que no se desarrolla una taquifilaxia aguda durante el tratamiento con este compuesto. La infusión i.v. de 1 nmol/kg/min del compuesto 1 provocó una respuesta acuareática de magnitud similar a la respuesta observada con las dosis máximas del antagonista selectivo del receptor de vasopresina de tipo 2, OPC-31260 (figura 9) al ensayarlo en el mismo modelo ^[2]. En este experimento, 1 nmol/kg/min del compuesto 1 inhibió la reabsorción tubular de agua sin cambios concomitantes en la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular o la reabsorción tubular proximal. Estos experimentos demostraron que el compuesto 1 tiene una eficacia acuareática máxima similar a la que puede obtenerse con antagonistas de vasopresina del tipo 2. Sin embargo, no se desarrolla taquifilaxia aguda en las primeras 12 horas del tratamiento con el compuesto 1 y esta observación representa una ventaja terapéutica más del compuesto 1 en relación con los antagonistas del receptor de vasopresina de tipo 2. Además, los antagonistas del receptor de vasopresina de tipo 2 no afectan al tratamiento renal de los electrolitos, mientras que los compuestos de la presente invención disminuyen la excreción urinaria de sodio y potasio.

20

[0075] Para examinar el efecto de los compuestos de la presente invención en un modelo *in vivo* de insuficiencia cardíaca se usa un modelo crónico de insuficiencia cardíaca de bajo gasto cardíaco. Brevemente, las ratas se anestesian en una cámara de inhalación con el 4% de halotano en una mezcla de gases N₂O/O₂ 1:1. Después de insertar un tubo endotraqueal, el animal se somete a respiración asistida con el 1% de halotano en una mezcla de gases N₂O/O₂ 1:1. El volumen corriente y la tasa respiratoria se ajustan para mantener el pH arterial entre 7,35 y 7,45. Durante la operación, el animal se coloca en una mesa calentada que mantiene la temperatura rectal a 37-38°C. La ligadura de la arteria coronaria izquierda, usada para producir la insuficiencia cardíaca congestiva, se realiza a través de una toracotomía paraesternal, colocando una sutura de seda 6-0 entre el tronco pulmonar y la aurícula izquierda. Un control quirúrgico se realiza sin ligar la arteria coronaria izquierda. Para reducir al mínimo el dolor postoperatorio, las ratas se tratan después de la operación con buprenorfina, 0,2 mg/kg s.c. durante dos días. Dos semanas después de la operación de corazón se insertan catéteres permanentes Tygon en la arteria y en la vena femoral y un catéter vesical en la vejiga urinaria. Para evitar la coagulación en los catéteres vasculares, estos conductos se rellenan con dextrosa al 50% con 1.000 unidades/ml de heparina y 10.000 unidades/ml de estreptoquinasa. Los inventores de la presente invención han descrito este modelo previamente ^[14]. Los exámenes fisiológicos se realizan tres semanas después de la operación de corazón, dado que el deterioro funcional después de la ligadura de la arteria coronaria izquierda es máximo generalmente en este momento. Los estudios de la actividad renal se realizan según se ha descrito anteriormente. Para evaluar el grado de insuficiencia cardíaca, la rata se anestesia con halotano en N₂O/O₂ 1:1, se intuba y se somete a respiración asistida y se le inserta un catéter Tygon en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha para medir la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI). La medida exacta de la PDFVI se realiza mediante el ajuste de la concentración de halotano para mantener la postcarga durante la anestesia al mismo nivel que la presión arterial media registrada en el estado consciente. Este modelo animal comparte las características clínicas de bajo gasto cardíaco, retención de sodio y agua y formación de edemas de la forma más común de insuficiencia cardíaca humana ^[15].

35

40

[0076] Para examinar el efecto de los compuestos de la presente invención en un modelo *in vivo* de síndrome nefrótico se usa un modelo crónico de síndrome nefrótico inducido por adriamicina. El síndrome nefrótico se induce con una única inyección intravenosa de adriamicina (= doxorubicina, Sigma Chemical, San Luis, MO, EE. UU.); 7-8 mg/kg a una concentración de 10 mg/ml disuelta en disolución salina isotónica. En este modelo, la proteinuria comienza cuatro a cinco días después de una única inyección intravenosa de 7,5 mg/kg. La expresión total del síndrome con cambios glomerulares, proteinuria, retención de sodio y de agua y formación de edemas comienza 13

45

50

55

a 15 días después ^[15;16].

[0077] Para examinar el efecto de los compuestos de la presente invención en un modelo *in vivo* de cirrosis hepática se usa un modelo crónico de cirrosis biliar inducida por ligadura del conducto biliar común ^[17]. Después de 5 28 días de obstrucción, las ratas presentan una cirrosis progresiva, asociada con retención de sodio y de agua y ascitis ^[15].

[0078] Para examinar el efecto de los compuestos de la presente invención en un modelo *in vivo* de insuficiencia orgánica múltiple que incluye la insuficiencia renal aguda se usa un modelo de insuficiencia orgánica 10 provocada por hemorragia durante la anestesia y la cirugía. En este modelo, las ratas reciben una infusión de disolución salina o los compuestos de la presente invención durante 15 min antes de la anestesia. Después, los animales se anestesian con isoflurano (al 3% en una mezcla de O₂/N₂O) y se someten a periodos de cirugía (cateterización permanente en la vejiga y en la vena y la arteria femoral; 30 min); hemorragia (20 cm³/kg de peso 15 corporal; 45 min) y recuperación (reposición sanguínea; 120 min). En el ensayo se recogen muestras de orina consecutivas de 10 min y se permite que las ratas se recuperen durante siete días. Después de la hemorragia se reúnen las muestras recogidas de orina y de sangre (por ejemplo, los días 2, 4 y 6) para evaluar la recuperación según se determina por la producción de orina y las concentraciones de creatinina y urea en el suero. Finalmente, en el día 7 las ratas se sacrifican para el examen histológico de todos los órganos. Mediante este modelo, Kapusta y col., demostraron previamente que el agonista de opioides κ U-50,488H evita la insuficiencia orgánica múltiple 20 (riñón, pulmones, intestino) y aumenta la supervivencia después de una hemorragia provocada durante la anestesia quirúrgica ^[18].

[0079] En resumen, los estudios *in vivo* han demostrado que el compuesto 1 es un potente acuarético ahorrador de sodio y potasio. Además de sus efectos periféricos, la nociceptina provoca una disminución mediada 25 centralmente de la actividad nerviosa simpática, la presión arterial y la frecuencia cardíaca ^[10;19;20]. Además, la nociceptina disminuye el flujo simpático espinal al disminuir la actividad de las neuronas preganglionares tanto *in vitro* como *in vivo* ^[21]. La rápida aparición y la similar relación temporal de la disminución de la actividad nerviosa simpática, la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en ratas con deservación sinoaórtica del barorreceptor sugieren que los efectos cardiovasculares de la nociceptina son debidos principalmente a la inhibición de la actividad 30 nerviosa simpática del sistema cardiovascular ^[10]. Por lo tanto, el efecto inhibitorio del compuesto 1 sobre la hipotensión y bradicardia inducidas por nociceptina sugiere que el compuesto 1 es capaz de antagonizar los efectos de la nociceptina en el control neurógeno de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea. La observación de que el compuesto 1 actúa como antagonista de nociceptina *in vivo* está apoyada por el hecho de que el compuesto 1 antagoniza el efecto de relajación del músculo liso de la nociceptina en el modelo del conducto deferente de ratón. 35 Por lo tanto, en contraste con la nociceptina endógena, el compuesto 1 aumenta la tasa de flujo urinario y disminuye la excreción urinaria de sodio y potasio en dosis que no producen bradicardia ni hipotensión notables.

Estudios *in vitro* de la unión del compuesto 1 a ORL1

40 **[0080]** Hemos demostrado en una serie de ensayos de unión que el compuesto 1 se une al receptor humano de nociceptina (es decir, ORL1) con alta afinidad y alta especificidad.

[0081] Mediante el uso de células HEK293 transfectadas con el receptor ORL1 humano hemos demostrado que el compuesto 1 desplaza la unión específica de nociceptina marcada con ³H con una K_i = 0,26 nM. 45

[0082] Además, el compuesto 1 se ha probado en cinco ensayos de unión a receptores de opioides (opiáceo no selectivo, δ, κ, μ y ORL1), tres ensayos de unión a receptores de vasopresina (V1a, V1b y V2) a concentraciones de 0,1, 10 y 1.000 nM, así como en 40 sitios diferentes de unión de receptores, absorción y canales iónicos (A1, A2, α1, α2, β1, absorción de NE, AT1, BZD, B2 (h), CCK_A (~ CCK₁), D1, D2, ETA(h), GABA, NMDA, H₁, M, NK₁(h), Y, N, 50 opiáceo, PCP, 5-HAT, 5-HT_{1B}- 5HT_{2A}, absorción de 5-HAT, σ, V₁) a una concentración de 10 μM. Estos experimentos demostraron que el compuesto 1 es un ligando selectivo del receptor ORL1 con ninguna o solamente ligera afinidad por otros receptores distintos de ORL1. Además, en células HEK293 transfectadas que expresan el receptor ORL1 humano, el compuesto 1 inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina con una CE₅₀ = 0,54 nM y con un máximo relativo respecto a nociceptina del 92%. Estos resultados sugieren que el compuesto 1 es un 55 agonista selectivo del receptor ORL1.

[0083] Los datos que demuestran la unión de los compuestos de la invención al receptor ORL1 humano expresado en células CHO, calculados como valores CI₅₀ (nM) (todos basados en un experimento) se muestran en la tabla 6 a continuación. El receptor ORL1 está acoplado negativamente a AMPc y, por lo tanto, el efecto de los 60 agonistas de ORL1 se detecta como una inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina. Se han ensayado seis compuestos de la invención en cuanto a su eficacia sobre el receptor hORL1 expresado en células CHO. Todos los valores de CE₅₀ (nM) se basan en un experimento (datos mostrados en la tabla 6).

Tabla 6. Unión de compuestos ZS (péptidos) al receptor hORL1

Número del compuesto	Unión CI_{50} (nM)	Eficacia CE_{50} (nM)
CE1	0,31	0,41
1	0,32	0,58
3	235	83
4	ND	91
6	115	135
7	> 100	ND
8	78	59
9	3,7	0,035
10	0,51	ND
11	0,27	ND
12	0,15	ND
13	ND	ND

[0084] La mayor parte de los trabajos publicados sobre el receptor ORL1 humano se ha centrado en los efectos del receptor en el SNC. Sin embargo, el trabajo descrito en este documento se centra en el efecto mediado por el compuesto 1 en el riñón. Con el fin de determinar si el receptor ORL1 está presente en el riñón humano, hemos construido cebadores para PCR homólogos al receptor ORL1 expresado en el cerebro humano. El ARN total aislado del riñón humano se sometió a la síntesis de la primera hebra para obtener material para el análisis por PCR. Este análisis mostró un fragmento de 449 pb del receptor ORL1, lo que indica que el receptor se expresa en el riñón humano y que, por lo tanto, es de esperar que los ligandos de ORL1 de la presente invención tengan efectos renales en humanos.

5

Estabilidad *in vitro*

[0085] Una degradación de los péptidos se observa casi exclusivamente en presencia de enzimas, por ejemplo, en la corriente sanguínea. Una característica importante de un fármaco potencial es si se degrada rápidamente *in vivo* o si es capaz de producir sus efectos durante un periodo más prolongado. Para poder examinar la estabilidad de los conjugados peptídicos de la presente invención se ensayó la degradación en plasma de ratones estabilizado con heparina (obtenido de Harlan Seralab, RU).

10

Procedimientos

15

[0086] Los estudios de estabilidad se realizaron por triplicado. Un volumen de 100 μ l de una disolución del compuesto de ensayo (conjugado peptídico) con una concentración de 1 mg/ml se añadió a un tubo Eppendorf que contenía 900 μ l de plasma incubado a 37°C. Inmediatamente después de la adición se extrajo una muestra de 100 μ l que se añadió a un tubo Eppendorf que contenía 10 μ l de la disolución de extracción (TFA (ácido trifluoroacético) al 50% en MeCN, v/v). Esta muestra constituye $t = 0$. A continuación se extrajeron muestras a $t = 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300$ y 360 min que se trataron de la misma manera que la muestra a $t = 0$. Las muestras se centrifugaron a 20.000 g y el sobrenadante se transfirió a viales y se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

20

[0087] El análisis se realizó en un aparato de HPLC HP1100 con una bomba cuaternaria. Se usó una columna Vydac 201SP5215 y el aparato comprendía un inyector automático, un horno para columnas, un detector de UV variable y un detector de fluorescencia. El proceso se controló mediante el software ChemStation. La elución del gradiente constó de dos disolventes A y B que contenían ácido n-heptafluorobutírico (HFBA) al 0,02% en agua MilliQ (MQW) y HFBA al 0,02% en MeCN al 90% en MQW, respectivamente. La separación se efectuó a 30°C mediante un gradiente lineal de B al 5-100 % en 15 min con un flujo de 0,250 ml/min. Los cromatogramas usados en este estudio se obtuvieron por detección UV a una longitud de onda de 254 nm. Los picos identificados como los péptidos de ensayo por comparación con estándares conocidos se integraron para obtener el área del pico como una medida de la concentración para cada punto de tiempo. Estos valores se transfirieron a Microsoft Excel, donde se determinaron las semividas ($t_{1/2}$) y la constante de velocidad (k_{obs}) para Ac-RYYRWK-NH₂ y el compuesto 1 por ajuste en la ecuación. Tal como se ilustra en la figura 10, la velocidad de degradación de la sustancia sin conjugar Ac-RYYRWK-NH₂ fue significativamente mayor que la del compuesto 1 (Ac-RYYRWK-NH₂: $t_{1/2} = 2-5$ min (estimación) y compuesto 1: $t_{1/2} = 358 \pm 36$ min).

25

30

35

40

[0088] Estos datos demuestran que el conjugado peptídico, compuesto 1, es significativamente más estable en plasma heparinizado de ratón que el hexapéptido sin conjugar Ac-RYYRWK-NH₂. Por lo tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para mejorar la estabilidad de un hexapéptido, preferentemente un hexapéptido de la fórmula II en este documento y, con mayor preferencia, el hexapéptido RYYRWK, mediante la unión de una secuencia peptídica Z' según se define en este documento, en que preferentemente Z' es una secuencia K₆, al

45

extremo C de dicho hexapéptido por medio de un enlace peptídico.

Estabilidad en plasma humano heparinizado

- 5 **[0089]** La degradación del compuesto 1 de la invención se ha estudiado además en plasma humano heparinizado. La tabla 7 muestra la semivida de degradación ($T_{1/2}$) del compuesto 1 de la invención en comparación con Ac-RYYRWK-NH₂ y nociceptina-NH₂. A partir de la tabla es evidente que el compuesto 1 de la invención con una semivida superior a 16 h es considerablemente más estable en el plasma que Ac-RYYRWK-NH₂ que tiene una semivida inferior a 1 h y que nociceptina-NH₂, que tiene una semivida de 1,5 h.

10

Tabla 7. Resultados del ensayo de estabilidad in vitro en plasma y suero, $T_{1/2}$ en min (media \pm desviación)

COMPUESTOS	$T_{1/2}$ en min (degradación en plasma humano heparinizado)
Compuesto 1	973,8 min \pm 21,9%
Ac-RYYRWK-NH ₂	50,7 min \pm 20,9%
Nociceptina-NH ₂	97,5 min \pm 6,4%
* sin reacción en más de 5 h	

Procedimiento para el análisis de la estabilidad en plasma *in vitro*

- 15 **[0090]** Se analiza la estabilidad de los péptidos en plasma humano. Los péptidos se incuban a 37°C en plasma y se toman muestras a aproximadamente 8 intervalos regulares entre $t = 0$ y $t = 390$ min para el compuesto 1 y nociceptina-NH₂ y a 9 intervalos entre $t = 0$ y $t = 32$ min para el compuesto CE1 que se analizan por HPLC.

- 20 **[0091]** Se estiman las condiciones apropiadas (columna, disolvente, gradiente y temperatura) para los análisis de HPLC con el fin de asegurar que el pico del fármaco y los picos del plasma no tengan el mismo tiempo de retención. Esto se realiza mediante inyecciones subsiguientes del fármaco, el plasma y una coinyección del fármaco y el plasma, seguidas de la optimización de los parámetros del procedimiento de LC hasta que se obtiene una separación satisfactoria. Se realizan tres experimentos paralelos para cada tipo de plasma. Un volumen de 100 μ l del péptido se mezcla con 900 μ l de plasma a $t = 0$ y se incuba a 37°C (concentración de la mezcla de fármaco y plasma 0,1 mg/ml). Se extraen muestras de 100 μ l de la mezcla de fármaco y plasma a intervalos apropiados y se detiene la degradación por precipitación de la muestra con 10 μ l de MeCN:TFA 50:50 (v/v). También se toma una muestra de control de plasma sin el fármaco que se trata de la misma manera. Las muestras de plasma se centrifugan a 12.000 rpm durante 15 min (centrífuga Eppendorf) a temperatura ambiente. La disolución sobrenadante resultante se transfiere a viales de 300 μ l para un inyector automático HP y se analizan por HPLC. Los análisis de HPLC se realizan como se indica a continuación:

Ac-RYYRWK-NH₂ y compuesto 1

Columna: Vydac 201 SP5215, 991203, 033,

S/N N 905550-1-3, 150 x 2,1 mm, flujo: 0,200 ml/min. Temperatura: 40°C.

Disolvente A: HFBA al 0,02% en MQW. Disolvente B: HFBA al 0,02% en MQW:MeCN 10:90

- 35 Tiempo de cromatografía = 25 min. Volumen inyectado: 20 μ l. Detección: FLD1 A, excitación = 280 nm, emisión = 335 nm

Gradiente (tiempo en min; %B): 0;5 5;50 15;100 15,5;5 25;5

Nociceptina-NH₂

Columna: Vydac 218MSP52, 000517, 095,

- 40 S/N N 970520-9-7, 250 x 2,1 mm, flujo: 0,200 ml/min. Temperatura: 40°C.

Disolvente A: TFA al 0,1% en MQW. Disolvente B: TFA al 0,1% en MQW:MeCN 10:90

- ref. = 360, 100 nm

Gradiente (tiempo en min; %B): 0;1 5;1 15;40 16;100 17;1 25;5

45

- [0092]** Las muestras se analizan en el orden siguiente: blanco, el péptido a 0,1 mg/ml, el plasma sin el péptido, las tres muestras paralelas para $t = 0$, las tres muestras paralelas para $t = 5$ min, las tres muestras paralelas para $t = 60$ min, etc. Y finalmente se repiten las tres muestras paralelas para $t = 0$ para asegurarse de que no ha habido degradación u otro fallo durante el análisis. La concentración de las muestras (altura del pico en unidades de miliabsorbancia, mAU) se representa frente al tiempo y se ajusta una función que describe una degradación monoexponencial (Excel). Las semividas de los péptidos en el plasma se presentan en la tabla 7 como media ($n = 3$) \pm desviación estándar.

Composiciones

55

- [0093]** La invención se refiere también a una composición que comprende un conjugado peptídico

farmacológicamente activo según se define en este documento en combinación con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden estar en una forma adaptada a la administración por vía oral, subcutánea, parenteral (intravenosa, intraperitoneal), intramuscular, rectal, epidural, intratraqueal, intranasal, dérmica, vaginal, bucal, ocular o pulmonar, preferentemente en una forma adaptada para la administración por una vía periférica o que es adecuada para la administración por vía oral o adecuada para la administración por vía parenteral. Otras vías de administración preferidas son la vía subcutánea, intraperitoneal e intravenosa y tales composiciones pueden prepararse de manera bien conocida para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en general en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 17. ed., Alfonso R. Gennaro (ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE. UU., 1985 y ediciones más recientes y en las monografías de la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences" de Marcel Dekker. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo disoluciones y suspensiones para inyección, cápsulas y comprimidos, preferentemente en forma de formulaciones entéricas, por ejemplo, como se desvelan el documento US 5.350.741 para administración por vía oral.

15 **[0094]** El vehículo farmacéutico o diluyente empleado puede ser un vehículo convencional sólido o líquido. Algunos ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, caolín, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, goma acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa. Algunos ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácido graso, polioxietileno y agua. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, como monoestearato de glicerina o diestearato de glicerina solos o mezclados con una cera.

25 **[0095]** Cuando se usa un vehículo sólido para la administración por vía oral, la preparación puede formarse en comprimidos, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o de pella, o puede estar en forma de una pastilla para chupar. La cantidad del vehículo sólido variará ampliamente pero normalmente estará entre 25 mg, aproximadamente y 1 g, aproximadamente.

30 **[0096]** Un comprimido típico que puede prepararse por las técnicas convencionales de formación de comprimidos puede contener: núcleo: el principio activo (como compuesto libre o sal del mismo), 100 mg; dióxido de silicio coloidal (Aerosil), 1,5 mg; celulosa microcristalina (Avicel), 70 mg; goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol), 7,5 mg; estearato de magnesio. Recubrimiento: HPMC, aproximadamente 9 mg; Mywacett 9-40T (monoglicérido acilado usado como plastificante para recubrimientos de película), aproximadamente 0,9 mg.

35 **[0097]** Si se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril, como una suspensión o disolución líquida acuosa o no acuosa.

40 **[0098]** La composición puede estar también en una forma adecuada para la inyección o infusión local o sistémica y, como tal, puede formularse con agua estéril o una disolución salina isotónica o una disolución de glucosa. Se prefiere que las composiciones de la invención estén en una forma adaptada a la administración por vía periférica solamente, con excepción de las formas administrables por vía central.

45 **[0099]** Las composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales que son bien conocidas en la técnica. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, en que la preparación liofilizada se combina con la disolución acuosa estéril antes de la administración. La composición puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes tamponantes, agentes osmóticos y similares, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

Formulación de conjugados peptídicos para inyección intravenosa:

50 **[0100]** Las formulaciones multidosis pueden prepararse como una disolución de un compuesto de la invención en disolución salina isotónica estéril, almacenada en viales con tapa y si es necesario con la adición de un conservante (por ejemplo, benzoatos). Las formulaciones de dosis fija pueden prepararse como una disolución del compuesto en disolución salina isotónica estéril, almacenada en ampollas de vidrio y si es necesario rellenas de un gas inerte.

60 **[0101]** Todas las dosis del compuesto se almacenan secas en ampollas o viales con tapa, si es necesario, rellenos con un gas inerte. La formulación multidosis requiere el máximo grado de estabilidad del compuesto. Si la estabilidad del compuesto es baja, pueden usarse formulaciones de dosis fija.

[0102] Para la administración por vía nasal, la preparación puede contener un compuesto de la presente invención disuelto o suspendido en un vehículo líquido, en particular un vehículo acuoso para la administración como

aerosol. El vehículo puede contener aditivos como agentes solubilizantes, por ejemplo propilenglicol, tensioactivos como sales de ácidos biliares o éteres de alcoholes superiores de polioxi-etileno, mejoradores de la absorción como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina o conservantes como parabenos.

5 **[0103]** En una realización preferida de la invención, el compuesto de la fórmula I, II o III se administra en una dosis en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 g diarios por paciente, preferentemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 mg diarios por paciente, con mayor preferencia desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg diarios por paciente, aproximadamente 50 mg diarios por paciente. Típicamente, una composición farmacéutica adaptada para la administración por vía oral contiene en una
10 dosis unitaria una cantidad de un compuesto de la fórmula I o II en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg. Típicamente, una composición farmacéutica adaptada para la administración por vía parenteral contiene en una dosis unitaria una cantidad de un compuesto de la fórmula I o II en el intervalo desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg.

15 **[0104]** La invención se refiere también a un compuesto farmacológicamente activo que es un conjugado peptídico o un derivado o sal del mismo según se desvela en este documento para uso terapéutico y el uso del mismo según se define en este documento para la preparación de una composición farmacéutica para uso terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades y dolencias periféricas relacionadas con ORL1. Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración por vía oral. Los usos
20 terapéuticos de los nuevos conjugados peptídicos en este documento son el aumento de la excreción renal de agua y la disminución de la excreción urinaria de sodio y potasio (es decir una diuresis acuosa selectiva) con dosis relativamente bajas del compuesto, es decir, preferentemente menos de 50 mg diarios por paciente, y la disminución de la presión sanguínea en ausencia de taquicardia refleja y el aumento del apetito con dosis mayores del compuesto activo.

25 **[0105]** En realizaciones específicas, un conjugado peptídico según la presente invención puede usarse para evitar efectos secundarios en el SNC en el tratamiento de enfermedades o dolencias específicas que pueden tratarse con compuestos con actividad similar a la de nociceptina, debido a la baja penetración de los conjugados peptídicos en el sistema nervioso central.

30 **[0106]** En realizaciones específicas, un conjugado peptídico según la presente invención puede usarse como agonista o agonista parcial o como inhibidor, dependiendo de la utilidad clínica, que actúa sobre un receptor de nociceptina como ORL1, especialmente cuando dicho receptor se encuentra en el tejido periférico. De este modo, el conjugado peptídico de la fórmula I o III es útil para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de
35 estados patológicos asociados con una elevada actividad de nociceptina.

[0107] En realizaciones específicas, un conjugado peptídico según la presente invención puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de hiponatremia y/o hipopotasemia, así como en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de hiponatremia y/o hipopotasemia.

40 **[0108]** Además, un conjugado peptídico según la presente invención puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de afecciones con retención de sodio y agua y la insuficiencia renal aguda, así como en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de la insuficiencia orgánica múltiple y estados con retención de sodio y agua y la insuficiencia renal aguda. Además, un conjugado peptídico según la presente invención puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de
45 estados de insuficiencia orgánica asociados con la expansión del volumen de fluido extracelular que incluyen:

1. Insuficiencia cardíaca congestiva, en la que la insuficiencia cardíaca puede describirse como sistólica o diastólica, de alto gasto o de bajo gasto, aguda o crónica, derecha o izquierda y anterógrada o retrógrada. Un ejemplo de un modelo predictivo de insuficiencia cardíaca *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de
50 los péptidos de la presente invención es el modelo de bajo gasto cardíaco inducido por la ligadura de la arteria coronaria izquierda en ratas conscientes^[15].

2. Cirrosis hepática en que la cirrosis puede estar relacionada con la cirrosis alcohólica; cirrosis postnecrótica (causada por enfermedades infecciosas, trastornos metabólicos hereditarios, fármacos y toxinas, enfermedades inflamatorias y otras); cirrosis biliar (primaria o secundaria); cirrosis cardíaca debida a una
55 insuficiencia cardíaca congestiva derecha, grave y prolongada; cirrosis metabólica, hereditaria, relacionada con fármacos u otros tipos de cirrosis. Un ejemplo de un modelo predictivo de cirrosis hepática *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de los péptidos de la presente invención es el modelo de cirrosis hepática inducida por la ligadura del conducto biliar común en ratas conscientes^[15].

3. Síndrome nefrótico relacionado con una enfermedad renal y/o sistémica inducida por fármacos o
60 toxinas. Un ejemplo de un modelo predictivo de síndrome nefrótico *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de los péptidos de la presente invención es el modelo de síndrome nefrótico inducido por la administración i.v. de adriamicina^[15].

4. Hipertensión, en que la hipertensión puede ser primaria (idiopática) o secundaria por fármacos, toxinas o enfermedades de las glándulas endocrinas, riñones o del sistema nervioso central. Algunos ejemplos de modelos predictivos de hipertensión *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de los péptidos de la presente invención son el modelo de la rata con hipertensión espontánea o de la rata Dahl sensible a sal.

5 5. Insuficiencia orgánica múltiple provocada durante el choque hemorrágico que incluye la insuficiencia renal aguda. Un ejemplo de un modelo predictivo *in vivo* de insuficiencia orgánica múltiple (riñón, pulmones, intestino) provocada durante la anestesia, cirugía y hemorragia es el descrito por Kapusta y col. ^[16].

6. Insuficiencia renal aguda, en que la patogénesis de la enfermedad puede estar relacionada con causas prerrenales o renales intrínsecas:

10 Azotemia prerrenal, como en las afecciones siguientes:

I. Hipovolemia

A. Hemorragias, quemaduras, deshidratación

B. Pérdida de fluido gastrointestinal: vómitos, drenaje quirúrgico, diarrea

15 C. Pérdida de fluido renal: diuréticos, diuresis osmótica (p. ej. diabetes

sacarina), hipoadrenalismo

D. Secuestro en el espacio extravascular: pancreatitis, peritonitis, traumatismos, quemaduras, hipoalbuminemia grave;

II. Bajo gasto cardíaco

20 A. Enfermedades del miocardio, válvulas y pericardio, arritmias,

taponamiento

B. Otras: hipertensión pulmonar, embolia pulmonar masiva, respiración mecánica asistida con presión positiva;

III. Alteración de la relación entre la resistencia vascular renal y sistémica

25 A. Vasodilatación sistémica: septicemia, antihipertensivos, reductores de

la postcarga, anestesia, anafilaxia

B. Vasoconstricción renal: hipercalcemia, norepinefrina, epinefrina, ciclosporina, anfotericina B

C. Cirrosis con ascitis (síndrome hepatorenal);

30 IV. Hipoperfusión renal con trastorno de las respuestas de autorregulación renal,

inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina;

V. Síndrome de hiperviscosidad (raro)

Mieloma múltiple, macroglobulinemia, policitemia.

La insuficiencia renal aguda incluye además:

Azotemia renal intrínseca, como en las afecciones siguientes:

35 I. Obstrucción renovascular (bilateral o unilateral con un riñón funcional)

A. Obstrucción de la arteria renal: placa aterosclerótica, trombosis, embolia, aneurisma disecante, vasculitis

B. Obstrucción de la vena renal: trombosis, compresión;

40 II. Enfermedad de los glomérulos o de la microvasculatura renal

A. Glomerulonefritis y vasculitis

B. Síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica, coagulación intravascular diseminada, toxemia del embarazo, hipertensión acelerada, nefritis por radiación, lupus eritematoso sistémico, escleroderma;

III. Necrosis tubular aguda

45 A. Isquemia: como en la azotemia prerrenal (hipovolemia, bajo gasto cardíaco, vasoconstricción renal, vasodilatación sistémica), complicaciones obstétricas (desprendimiento placentario, hemorragia puerperal)

B. Toxinas

50 1. Exógenas: de radiocontraste, ciclosporina, antibióticos (p. ej. aminoglucósidos), quimioterapia (p. ej. cisplatino), disolventes orgánicos (p. ej. etilenglicol), acetaminofeno, abortivos ilegales

2. Endógenas: rabdomiolisis, hemolisis, ácido úrico, oxalato, discrasia de células plasmáticas (p. ej. mieloma);

IV. Nefritis intersticial

55 A. Alérgica: antibióticos (p. ej. β -lactamas, sulfonamidas, trimetoprima, rifampicina), antiinflamatorios no esteroideos, diuréticos, captopril

B. Infección: bacteriana (p. ej. pielonefritis aguda, leptospirosis), vírica (p. ej. citomegalovirus), micótica (p. ej. candidiasis)

C. Infiltración: linfoma, leucemia, sarcoidosis

60 D. Idiopática;

V. Deposición y obstrucción intratubular

A. Proteínas de mieloma, ácido úrico, oxalato, aciclovir, metotrexato,

sulfonamidas;
VI. Rechazo de aloinjertos renales

5 **[0109]** Algunos ejemplos de modelos predictivos de azotemia prerrenal *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de los péptidos de la presente invención son los modelos de insuficiencia renal aguda isquémica inducida por norepinefrina o por pinzamiento de la arteria renal en ratas, que puede acelerarse por hemorragia ^[22].

10 **[0110]** Un ejemplo de un modelo predictivo de azotemia renal intrínseca *in vivo* para el estudio de los efectos terapéuticos de los péptidos de la presente invención es el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina ^[23].

Referencias

- 15 **[0111]**
[1.] C. T. Dooley, C. G. Spaeth, I. P. Berzetei-Gurske, K Craymer, I. D. Adapa, S. R. Brandt, R. A. Houghten, L. Toll, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997, 283: 735-741.
- 20 [2.] T. E. Jonassen, S. Christensen, T. H. Kwon, S. Langhoff, N. Salling, S. Nielsen, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2000, 279: F1101-F1109.
- [3.] E. Braunwald, in Harrison's Principles of Internal Medicine, eds.: A. S. Fauci, E. Braunwald, K J. Isselbacher, J. D. Wilson, J. B. Martin, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, McGraw-Hill, New York 1998, págs. 1287-1298.
- 25 [4.] J. Hughes, H. W. Kosterlitz, F. M. Leslie, Br. J. Pharmacol. 1975, 53: 371-381.
- [5.] Smith, C. B. NIDA Research Monograph. [76], 288: 294. 1987. Referencia: serie (libro, monografía).
- 30 [6.] G. Calo, A. Rizzi, G. Bogoni, V. Neugebauer, S. Salvadori, R. Guerrini, C. Bianchi, D. Regoli, Eur. J. Pharmacol. 1996, 311: R3-R5.
- [7.] Kenakin, T. Pharmacological Analysis of Drug-Receptor Interaction. 2°. 1993. EE. UU., Raven Press. Referencia: serie (libro, monografía).
- 35 [8.] D. R. Kapusta, S. F. Sezen, J. K Chang, H. Lippton, V. A. Kenigs, Life Sci. 1997, 60: L15-L21.
- [9.] D. R. Kapusta, Peptides 2000, 21: 1081-1099.
- [10.] D. R. Kapusta, V. A. Kenigs, Am. J. Physiol. 1999, 277: R987-R995.
- 40 [11.] H. C. Champion, R. L. Pierce, P. J. Kadowitz, Regul. Pept. 1998, 78: 69-74.
- [12.] G. G. Liversidge, C. G. Wilson, W. L. Stenson, L. B. Kinter, J. Appl. Physiol. 1988, 64: 377-383.
- 45 [13.] T. E. N. Jonassen, S. Christensen, J. S. Petersen, J. Am. Soc. Nephrol. 1997, 8: 19A.
- [14.] S. Nielsen, J. Terris, D. Andersen, C. Ecelbarger, J. Frokiaer, T. Jonassen, D. Marples, M. A. Knepper, J. S. Petersen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94: 5450-5455.
- 50 [15.] G. F. DiBona, P. J. Herman, L L Sawin, Am. J. Physiol. 1988, 254: R1017-R1024.
- [16.] T. Bertani, A. Poggi, R. Pozzoni, F. Delaini, G. Sacchi, Y. Thoua, G. Mecca, G. Remuzzi, M. B. Donati, Lab. Invest. 1982, 46: 16-23.
- 55 [17.] J. Kountouras, B. H. Billing, P. J. Scheuer, Br. J. Exp. Pathol. 1984, 65: 305-311.
- [18.] D. R. Kapusta, V. A. Kenigs, L A. Dayan, A. W. Dreisbach, S. Meleg-Smith, V. Batuman, K. J. Varner, J. Am. Soc. Nephrol. 2000, 11: A3175.
- 60 [19.] T. Shirasaka, T. Kunitake, K Kato, M. Takasaki, H. Kannan, Am. J. Physiol. 1999, 277: R1025-R1032.
- [20.] D. R. Kapusta, J. K Chang, V. A. Kenigs, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289: 173-180.

[21.] C. C. Lai, S. Y. Wu, C. T. Chen, N. J. Dun, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000, 278: R592-R597.

[22.] J. D. Conger, M. F. Schultz, F. Miller, J. B. Robinette, Kidney Int. 1994, 46: 318-323.

5 [23.] D. de Rougemont, A. Oeschger, L. Konrad, G. Thiel, J. Torhorst, M. Wenk, P. Wunderlich, F. P. Brunner, Nephron 1981, 29: 176-184.

Preparación de péptidos

10 **[0112]** Los péptidos o los conjugados peptídicos en este documento se preparan preferentemente mediante procedimientos de síntesis peptídica, pero pueden prepararse también por medio de la tecnología del ADN recombinante con los procedimientos y principios generales conocidos por la persona experta en la técnica. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia peptídica de la fórmula I o III; un vector que contiene dicha secuencia de
15 ácido nucleico y una célula hospedadora que comprende dicha secuencia de ácido nucleico y es capaz de expresar dicha secuencia polipeptídica.

[0113] Una secuencia de ácido nucleico que codifica el presente conjugado peptídico puede prepararse sintéticamente por procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de la fosforamidita descrito
20 por S. L. Beaucage y M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, págs. 1859-1869 o el procedimiento descrito por Matthes y col., EMBO Journal 3, 1984, págs. 801-805. Según el procedimiento de la fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores adecuados. Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido X son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, la preparación de
25 ADNc o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención a partir de tal ADN genómico puede efectuarse, por ejemplo, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bien conocida, o por cribado de bibliotecas de expresión con anticuerpos para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales comunes. Véase, por ejemplo, Innis y col., 1990, A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Pueden usarse otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos
30 como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada por ligación (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). Después puede ligarse a una secuencia de ácido nucleico que codifica Z.

[0114] La secuencia de ácido nucleico que codifica el conjugado se inserta después en un vector de
35 expresión recombinante que puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante. Con frecuencia, la elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que ha de introducirse. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica y cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser un vector que cuando se introduce en una célula hospedadora se
40 integra en el genoma de dicha célula hospedadora y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en que se ha integrado. En el vector, la secuencia de ácido nucleico que codifica el conjugado de la presente invención debe conectarse operativamente a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora elegida y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a las de la célula hospedadora. Algunos ejemplos de promotores
45 adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el conjugado, especialmente en una célula hospedadora bacteriana, son los promotores obtenidos del operón *lac* de *E. coli*, el gen de la agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor* y el gen de la β-lactamasa de procariontes (Villa-Kamaroff y col., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer y col., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful
50 proteins of recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook y col., 1989, véase anteriormente. Cuando el hospedador es una levadura, los promotores útiles se obtienen del gen de la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, de los genes de la alcohol-deshidrogenasa y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen de la 3-fosfoglicerato-cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células hospedadoras de levadura son los descritos por
55 Romanos y col., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0115] La secuencia de ácido nucleico que codifica dicho conjugado puede conectarse operativamente también a un terminador adecuado, como el terminador de la hormona de crecimiento humano (Palmiter y col., Science 222, 1983, págs. 809-814). Los terminadores preferidos para las células hospedadoras de levadura se
60 obtienen de los genes que codifican la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0116] El vector puede comprender además elementos tales como señales de poliadenilación (por ejemplo, de SV 40 o de la región 5' E1b de adenovirus), secuencias potenciadoras transcripcionales (por ejemplo, el potenciador de SV 40) y secuencias potenciadoras traduccionales (por ejemplo, las que codifican los ARN VA de adenovirus). Algunas secuencias de poliadenilación útiles para células hospedadoras de levadura se describen en 5 Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0117] El vector de expresión recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permita la replicación del vector en la célula hospedadora en cuestión. Algunos ejemplos de una secuencia tal (cuando la célula hospedadora es una célula de mamífero) es el origen de replicación de SV 40 o del virus del poliovirus. Algunos 10 ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060 y pAMB1. Algunos ejemplos de orígenes de replicación para uso en células hospedadoras de levadura son el origen de replicación del plásmido de 2 µm, la combinación de CEN6 y ARS4 y la combinación de CEN3 y ARS1. El origen de replicación puede tener una mutación para hacer que su actividad sea sensible a la temperatura en la célula hospedadora (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1433). 15

[0118] El vector puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedadora, como el gen que codifica la dihidrofolato-reductasa (DHFR) o un gen que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, neomicina, geneticina, ampicilina o higromicina. Los 20 marcadores adecuados para las células hospedadoras de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.

[0119] Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el conjugado, el promotor y el terminador, respectivamente y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información 25 necesaria para la replicación son bien conocidos para las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, la obra citada de Sambrook y col.).

[0120] La célula hospedadora en la que se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula capaz de producir el conjugado y puede ser una célula eucariota, como células de invertebrados o de vertebrados, por 30 ejemplo, ovocitos de *Xenopus laevis* o células de mamífero, en particular células de insecto y células de mamífero. Algunos ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares COS, BHK o CHO. Los procedimientos para la transfección de células de mamífero y la expresión de las secuencias de ADN introducidas en las células se describen, por ejemplo en Kaufman y Sharp, 1982, *J. Mol. Biol.* 159: 601-621; Southern y Berg, 1982, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327-341; Loyter y col., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 422-426; Wigler y col., 1978, *Cell* 35 14: 725; Corsaro y Pearson, 1981, *Somatic Cell Genetics* 7: 603; Graham y van der Eb, 1973, *Virology* 52: 456; Fraley y col., 1980, *JBC* 225: 10431; Capecchi, 1980, *Cell* 22: 479; Wiberg y col., 1983, *NAR* 11: 7287; Neumann y col., 1982, *EMBO J.* 1: 841-845.

[0121] La célula hospedadora puede ser también un patógeno unicelular, por ejemplo, un procarionte o un 40 patógeno pluricelular, por ejemplo, un eucariota. Las células unicelulares útiles son células bacterianas como bacterias grampositivas, incluyendo, pero sin limitarse a células de *Bacillus* o células de *Streptomyces*, o bacterias gramnegativas como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* La transformación de una célula hospedadora bacteriana puede efectuarse, por ejemplo, por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), mediante el uso de células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 45 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 o Dubnar y Davidoff Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), por electroporación (véase por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0122] La célula hospedadora puede ser una célula fúngica, por ejemplo, *Neurospora*, *Eupenicillium* 50 (= *Penicillium*), *Emmericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*). La célula hospedadora fúngica puede ser también una célula de levadura. "Levadura", tal como se usa en este documento incluye levaduras que producen ascosporas (endomicetos), levaduras que producen basidiosporas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (blastomicetos). El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de células de mamíferos, como un medio con suero o sin suero que contenga los 55 suplementos apropiados o un medio adecuado para el crecimiento de células de insectos, levaduras u hongos. Los medios adecuados pueden obtenerse de los proveedores comerciales o pueden prepararse según las fórmulas publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

[0123] Por lo tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para la producción de conjugados 60 peptídicos de la fórmula I o III que tienen una secuencia polipeptídica natural que comprende:

la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica que comprende la

secuencia peptídica de la fórmula I o III y un marcador seleccionable contenidos dentro de una construcción de ácido nucleico o un vector, en una célula hospedadora para obtener una célula hospedadora recombinante;

la selección de dicha célula hospedadora recombinante;

5

el cultivo de dichas células hospedadoras recombinantes en condiciones que permitan la producción de dicha secuencia polipeptídica;

el aislamiento de dicha secuencia polipeptídica del cultivo;

10

opcionalmente la escisión de dicha secuencia polipeptídica mediante una proteasa adecuada para obtener dicho conjugado peptídico.

[0124] El conjugado peptídico de la fórmula I o III con una secuencia polipeptídica natural preparado de esta manera puede recuperarse después del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células hospedadoras del medio por centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, la purificación por diversos procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares. Posteriormente pueden emplearse etapas de modificación química para obtener derivados no naturales.

15

20

[0125] Los péptidos de la invención pueden prepararse por métodos conocidos de por sí en la técnica. Por lo tanto, las secuencias peptídicas X y Z pueden prepararse por las técnicas estándar de preparación de péptidos, como la síntesis en disolución o la síntesis en fase sólida del tipo Merrifield. Pueden aplicarse tanto la estrategia Boc (*tert*-butiloxicarbonilo) como la estrategia Fmoc (9-fluoroenilmetiloxicarbonilo).

25

[0126] Los procedimientos de síntesis preferidos incluyen un procedimiento para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula IV (X-Z') que comprende las etapas de:

30

a) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de $N\alpha$, en la forma activada con una secuencia peptídica inmovilizada H-Z'-SSM, en lo que se forma un fragmento peptídico inmovilizado protegido en $N\alpha$,

35

b) eliminación de dicho grupo protector de $N\alpha$, con lo que se forma un fragmento peptídico protegido e inmovilizado con un extremo N desprotegido,

40

c) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido adicional con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de $N\alpha$, en la forma con el grupo carboxilo activado al extremo N del fragmento peptídico inmovilizado y repetición del procedimiento de eliminación y acoplamiento de las etapas b) y c) hasta obtener la secuencia peptídica deseada X y después

d) escisión del conjugado peptídico del material de soporte sólido;

45

y un procedimiento para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula V (Z-X) que comprende las etapas de:

50

a) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de $N\alpha$, en la forma activada a un material de soporte sólido (SSM), con lo que se forma un aminoácido protegido o un dipéptido protegido inmovilizados,

50

b) eliminación de dicho grupo protector de $N\alpha$, con lo que se forma un aminoácido o un fragmento peptídico inmovilizado con un extremo N desprotegido,

55

c) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido adicional con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de $N\alpha$, en la forma con el grupo carboxilo activado al extremo N del aminoácido o fragmento peptídico inmovilizado y repetición del procedimiento de eliminación y acoplamiento de las etapas b) y c) hasta obtener la secuencia peptídica deseada X,

60

d) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido adicional con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de $N\alpha$, en la forma con el grupo carboxilo activado al extremo N del fragmento peptídico inmovilizado y repetición del procedimiento de eliminación y acoplamiento de las etapas b) y d) hasta obtener la secuencia peptídica deseada Z y después

d) escisión del conjugado peptídico del material de soporte sólido,

y, además, un procedimiento para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula VI (Z-X-Z') que comprende las etapas de:

a) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de N α , en la forma con el grupo carboxilo activado a una secuencia peptídica inmovilizada H-Z'-SSM, con lo que se forma un fragmento peptídico protegido en N α ,

10

b) eliminación de dicho en el grupo protector de N α , con lo que se forma un fragmento peptídico inmovilizado con un extremo N desprotegido,

c) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido adicional con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de N α , en la forma con el grupo carboxilo activado al extremo N del fragmento peptídico inmovilizado y repetición del procedimiento de eliminación y acoplamiento de las etapas b) y c) hasta obtener la secuencia peptídica deseada X, y después

d) acoplamiento de un aminoácido o dipéptido adicional con los grupos protectores adecuados, incluido un grupo protector de N α , en la forma con el extremo carboxilo activado al extremo N del fragmento peptídico inmovilizado y repetición del procedimiento de eliminación y acoplamiento de las etapas b) y d) hasta obtener la secuencia peptídica deseada Z y después

d) escisión del conjugado peptídico del material de soporte sólido,

25

Procedimientos experimentales

Aparatos y estrategia de síntesis

30 **[0127]** Los péptidos se sintetizaron en lotes en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración, con 9-fluoroenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector del grupo N α -amino y con grupos protectores comunes adecuados para las funcionalidades de las cadenas laterales.

Disolventes

35

[0128] El disolvente DMF (*N,N*-dimetilformamida, Riedel-de Hën, Alemania) se purificó por paso a través de una columna rellena con una resina de intercambio catiónico fuerte (Lewatit S 100 MB/H de ácido fuerte, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y se analizó la presencia de aminas libres antes de su uso por adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH), que produce un color amarillo (anión Dhbt-O⁻) si hay aminas libres presentes. El disolvente DCM (diclorometano, calidad analítica, Riedel-de Hën, Alemania) se usó directamente sin purificación. El acetonitrilo (calidad para HPLC, Lab-Scan, Dublín, Irlanda) se usó directamente sin purificación.

40

Aminoácidos

45 **[0129]** Los aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron a Advanced Chem Tech (ACT) en formas adecuadas con las cadenas laterales protegidas.

Reactivos de acoplamiento

50 **[0130]** El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquirió de Riedel-de Hën, Alemania.

Soportes sólidos

[0131] Los péptidos se sintetizaron sobre resinas TentaGel S a 0,22-0,31 mmol/g. TentaGel S-Ram, TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc (Rapp Polymere, Alemania) se usaron en los casos en los que se prefirió un péptido amidado en el extremo C, mientras que TentaGel S PHB, TentaGel S PHB Lys(Boc)Fmoc se usaron cuando se prefirió un ácido carboxílico libre en el extremo C.

55

Catalizadores y otros reactivos

60

[0132] La diisopropiletilamina (DIEA) se adquirió a Aldrich, Alemania, la piperidina y la piridina a Riedel-de Hën, Fráncfort, Alemania. El etanoditiol se adquirió de Riedel-de Hën, Fráncfort, Alemania. Los compuestos 3,4-

dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) y 1-hidroxibenzotriazol (HObt) (HOAt) se obtuvieron de Fluka, Suiza. El anhídrido acético se obtuvo de Fluka.

Procedimientos de acoplamiento

5

[0133] Los aminoácidos se acoplaron como ésteres de HOAt o HOAt generados *in situ*, preparados a partir de los aminoácidos apropiados protegidos en Na y HOAt o HOAt por medio de DIC en DMF. Las acilaciones se comprobaron por la prueba de la ninhidrina a 80°C para evitar la desprotección de Fmoc durante la prueba (Larsen, B. D. y Holm, A., Int. J. Peptide Protein Res. 43, 1994, 1-9).

10

Desprotección del grupo protector del grupo Na-amino (Fmoc)

[0134] La desprotección del grupo Fmoc se realizó por tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min), seguido de lavado con DMF (5 x 15 ml, 5 min cada vez) hasta que dejó de detectarse color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF escurrida.

15

Acoplamiento de ésteres de Hobs

[0135] Una cantidad de 3 eq de aminoácido protegido en Na se disolvió en DMF junto con 3 eq de HOAt y 3 eq de DIC y después se añadió a la resina.

20

Acetilación del grupo amino N-terminal con anhídrido acético

[0136] Una cantidad de 40 eq de anhídrido acético se disolvió en DMF junto con 5 eq de piperidina y después se añadió a la resina.

25

[0137] La acilación se comprobó por la prueba de la ninhidrina, según se ha descrito anteriormente.

Trifluoroacetilación del grupo amino N-terminal con trifluoroacetato de etilo

[0138] Una cantidad de 30 eq de trifluoroacetato de etilo se disolvió en diclorometano junto con 10 eq de trietilamina y después se añadió a la resina. La acilación se comprobó por la prueba de la ninhidrina, según se ha descrito anteriormente.

30

Escisión del péptido de la resina con ácido

35

[0139] El péptido se escindió de las resinas por tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% (TFA, Riedel-de Hën, Fráncfort, Alemania) en agua (v/v) o con TFA al 95% y etanoditiol al 5% (v/v) a temperatura ambiente durante 2 h. Las resinas filtradas se lavaron con TFA al 95% en agua y los filtrados y los lavados se evaporaron a presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó a partir de ácido acético-agua. El producto liofilizado crudo se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y se identificó por espectrometría de masas (MS).

40

Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel (PEG-PS)

[0140] La resina TentaGel (1 g, 0,23-0,24 mmol/g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración. La resina se expandió en DMF (15 ml) y se trató con piperidina al 20% en DMF con el fin de eliminar el grupo Fmoc inicial, bien en el ligador TentaGel RAM o en el primer aminoácido en la resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc. La resina se escurrió y se lavó con DMF hasta que dejó de detectarse color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF escurrida. Los aminoácidos según la secuencia se acoplaron como ésteres de HOAt preformados, protegidos con Fmoc (3 eq) según se ha descrito anteriormente. Los acoplamientos continuaron durante 2 h, a menos que se especifique lo contrario. La resina se escurrió y se lavó con DMF (5 x 15 ml, 5 min cada vez) para eliminar el exceso de reactivos. Todas las acilaciones se comprobaron por la prueba de la ninhidrina según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, la resina con el péptido se lavó con DMF (3 x 15 ml, 5 min cada vez), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada vez) y finalmente con éter dietílico (3 x 15 ml, 1 min cada vez) y se secó en vacío. El péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente y el producto peptídico crudo se purificó y analizó según se describe a continuación.

55

Condiciones de HPLC

[0141] El análisis de gradiente de HPLC se realizó mediante un sistema de HPLC Hewlett Packard HP 1100, compuesto de una bomba cuaternaria HP 1100, un inyector automático HP 1100, una columna con termostato HP 1100 y un detector de longitud de onda múltiple HP 1100. El software Hewlett Packard Chemstation para LC (rev. A.06.01) se usó para el control instrumental y la adquisición de datos. Se usaron la columna y el sistema también

60

para HPLC siguientes:

Columna: VYDAC 238TP5415, C-18, 5 mm, 300 Å, 150 x 4,6 mm.

Tampón: A: TFA al 0,1% en MQW; B: TFA al 0,085% en MQW, 10% de MQW, 90% de MeCN.

Gradiente: 0-1,5 min, 0% de B

- 5
1,5-25 min, 50% de B
25-30 min, 100% de B
30-35 min, 100% de B
35-40 min, 0% de B

Flujo: 1 ml/min, temperatura del horno: 40°C, detección UV: $\lambda = 215$ nm

10

Purificación del péptido crudo por HPLC

[0142] Los productos peptídicos crudos se purificaron mediante un sistema PerSeptive Biosystems VISION Workstation. El software VISION 3.0 se usó para el control instrumental y la adquisición de datos. Se usaron la

15 columna y el sistema tampón para HPLC siguientes:

Columna: Kromasil KR 100 Å, 10 mm C-8, 250 x 50,8 mm.

Sistema tampón: tampones: A: TFA al 0,1% en MQW; B: TFA al 0,085% en 10% de MQW, 90% de MeCN.

Gradiente: 0-37 min, 0-40% de B

20 Flujo: 35 ml/min, detección UV: $\lambda = 215$ nm y 280 nm.

Espectroscopia de masas

[0143] Los péptidos se disolvieron en metanol de calidad de gradiente superior (Labscan, Dublín, Irlanda), agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) y ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania) (50:50:0,1, v/v/v) para dar concentraciones entre 1 y 10 mg/ml. Las disoluciones de péptidos (20 ml) se analizaron en el modo de polaridad positiva por ESI-TOF-MS mediante un espectrómetro de masas LCT (Micromass, Manchester, RU).

25

Preparación y uso de los anticuerpos

[0144] Los anticuerpos de la invención pueden prepararse por técnicas generalmente conocidas en el campo. Los anticuerpos preferidos se generan contra una muestra purificada de un péptido o conjugado peptídico como antígeno. Los péptidos o conjugados peptídicos adecuados para generar tales anticuerpos se desvelan a lo largo de la solicitud, incluidos los ejemplos 22-23, a continuación. Aunque la mayoría de los anticuerpos policlonales de la invención presentan una unión excepcionalmente buena y específica, para algunas aplicaciones puede ser igualmente útil o más útil el empleo de anticuerpos monoclonales. Véase generalmente Harlow, E. y D. Lane en Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. (descripción de procedimientos para la producción y uso de anticuerpos policlonales y monoclonales).

35

[0145] Generalmente, los anticuerpos pueden prepararse por inmunización de un mamífero con una muestra purificada o semipurificada de un péptido o conjugado peptídico como antígeno, según se proporcionan en este documento, solos o complejados con un vehículo. Los mamíferos adecuados incluyen los animales típicos de laboratorio como ovejas, cabras, conejos, cobayas, ratas y ratones. Las ratas y los ratones, especialmente los ratones se prefieren para la obtención de anticuerpos monoclonales. El antígeno puede administrarse al mamífero por cualquiera de una serie de vías adecuadas, como la inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intracutánea. El intervalo óptimo de inmunización, la dosis de inmunización, etc. pueden variar en intervalos relativamente amplios y pueden determinarse empíricamente, basados en esta descripción. Los procedimientos típicos implican la inyección del antígeno varias veces a lo largo de una serie de meses. Los anticuerpos se recogen del suero del animal inmunizado por técnicas estándar y se someten a cribado para encontrar los anticuerpos específicos para el péptido o conjugado peptídico usado como antígeno. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en las células que producen anticuerpos y estas células pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales mediante las técnicas estándar de fusión para la formación de células de hibridoma. Véase G. Kohler y col., Nature, 256:456 (1975). Típicamente, esto implica la fusión de una célula productora de anticuerpos con una línea celular inmortal como células de mieloma para producir una célula híbrida. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden producirse a partir de células por el procedimiento de Huse y col., Science, 256: 1275 (1989).

50

55

[0146] Véase también Harlow, E. y D. Lane, anteriormente, para información adicional relativa a la producción y el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se han descrito diversas estrategias adecuadas para la purificación de anticuerpos que pueden usarse según esta invención.

60

[0147] En las realizaciones en las que se desean anticuerpos monoclonales, un protocolo adecuado proporciona la inmunización de un ratón por vía intraperitoneal con una composición que comprende un conjugado

peptídico purificado durante un periodo de aproximadamente dos a siete meses. Después, pueden extraerse células del bazo del ratón inmunizado. El suero del ratón inmunizado se analiza para determinar los títulos de anticuerpos específicos para un conjugado peptídico particular antes de la escisión de las células del bazo. Las células escindidas del bazo del ratón se fusionan después con una línea linfocítica homogénea o heterogénea (preferentemente homogénea) apropiada que tiene un marcador como la deficiencia de hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT) o la deficiencia de timidina-cinasa (TK). Preferentemente, como línea celular linfocítica se emplean células de mieloma. Las células de mieloma y las células del bazo se mezclan, por ejemplo en una relación entre las células de mieloma y las células del bazo de 1 a 4. Las células pueden fusionarse por el procedimiento del polietilenglicol (PEG). Véase G. Kohler y col., Nature, anteriormente. El hibridoma así clonado se cultiva en un medio de cultivo, por ejemplo RPMI-1640. Véase G. E. More y col., Journal of American Medical Association, 199: 549 (1967). Los hibridomas crecidos después del procedimiento de fusión se someten a cribado por radioinmunoanálisis o por enzimoimmunoanálisis para detectar la secreción de los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno empleado, por ejemplo, se seleccionan los anticuerpos que se unen al conjugado peptídico purificado, pero no a otros péptidos de control no relacionados. Preferentemente, para el cribado se emplea ELISA o un enzimoimmunoanálisis relacionado. Los hibridomas que muestran resultados positivos en dicho cribado pueden amplificarse y clonarse por el procedimiento de dilución limitada. Preferentemente se realizan otros cribados para seleccionar los anticuerpos que se unen al conjugado peptídico en disolución. Los anticuerpos aislados pueden purificarse posteriormente por prácticamente cualquier técnica inmunológica adecuada, incluida la cromatografía de afinidad.

20 **[0148]** El peso molecular de los anticuerpos de la invención puede variar en función de varios factores, como el uso previsto y si el anticuerpo incluye una toxina, una sustancia farmacéutica o un marcador detectable o similar conjugado o fusionado de manera recombinante. En general, un anticuerpo de la invención tendrá un peso molecular entre aproximadamente 20 y 150 kDa. Tales pesos moleculares pueden determinarse fácilmente por procedimientos de determinación del tamaño molecular como la electroforesis en gel SDS-PAGE, seguida de tinción de las proteínas o por análisis de inmunotransferencia.

[0149] Los conjugados peptídicos preferidos para la producción de los anticuerpos policlonales de la invención se desvelan, por ejemplo, en los ejemplos 22-23.

30 **[0150]** Con la expresión "unión específica" o una expresión relacionada referida a la asociación entre un anticuerpo y un péptido o conjugado peptídico como antígeno quiere decirse que el anticuerpo forma un complejo inmunológico con el antígeno particular y no con otros antígenos (como conjugados peptídicos relacionados y no relacionados). Los procedimientos para detectar y opcionalmente cuantificar tal unión específica incluyen los enzimoimmunoanálisis estándar, por ejemplo ELISA y los ensayos de captura de anticuerpos y de captura de antígenos. Los anticuerpos preferidos de la invención se unen específicamente a un péptido o conjugado peptídico sujeto como antígeno. Véase, por ejemplo, el ejemplo 23 a continuación.

[0151] Los ejemplos siguientes se proporcionan para señalar aspectos preferidos de la invención y no se pretende que sean indicativos del alcance de la invención.

40 Ejemplos de síntesis

Ejemplo 1. Síntesis del compuesto 1: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

45 **[0152]** La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 390 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 210 mg de producto peptídico con una pureza superior al 95% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 55 1.780,25, M calculada 1.780,11).

Ejemplo 2. Síntesis del compuesto 1A: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ x 9 AcOH (acetato). Intercambio del contraión trifluoroacetato por acetato en el compuesto 1.

60 **[0153]** El producto peptídico sintético purificado del compuesto 1 se aísla como trifluoroacetato, Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ x 9 TFA, debido a la presencia de ácido trifluoroacético (0,1% v/v) en

los tampones usados en la HPLC para la purificación del producto peptídico sintético crudo.

[0154] Con el fin de intercambiar el contraión trifluoroacetato por acetato, se hizo pasar una disolución del péptido a través de una columna rellena de una resina de intercambio iónico de base fuerte en el acetato (Dowex 1 x 8).

[0155] Una cantidad de 1 g del compuesto 1 se disuelve en 40 ml de agua. La disolución se hace pasar a través de una columna que contiene 40 ml de una resina de intercambio iónico de base fuerte en el acetato (Dowex 1 x 8, capacidad 1,33 meq/ml de resina). La resina se lavó después con 4 x 30 ml de agua y el eluato se recogió y liofilizó, con un resultado de 792 mg de acetato (higroscópico) con una pureza del 98% según el análisis de HPLC.

Ejemplo 3. Síntesis del compuesto 1C: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ x 9 HCl (cloruro). Intercambio del contraión trifluoroacetato (tfa) por cloruro (Cl⁻) en el compuesto 1.

[0156] Una cantidad de 100 mg del compuesto 1 se disolvió en 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y la disolución resultante se liofilizó. El resto se disolvió en 50 ml de agua y se liofilizó de nuevo, con un resultado de 74 mg de cloruro con una pureza del 97% según HPLC.

Ejemplo 4: Síntesis del compuesto 2: Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0157] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la lisina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 231 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 126 mg de producto peptídico con una pureza superior al 93% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.780,25, M calculada 1.780,11).

Ejemplo 5. Síntesis del compuesto 3: H-Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0158] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la asparagina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 212 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 112 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 2.497,25, M calculada 2.497,35).

Ejemplo 6. Síntesis del compuesto 4: Ac-Arg-Tyr-Asn-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0159] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 502 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 272 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.731,25, M calculada 1.731,09).

Ejemplo 7. Síntesis del compuesto 5: Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Trp-Arg-Tyr-Tyr-Asn-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0160] La resina TentaGel S RAM seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes

sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la lisina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 586 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 365 mg de producto peptídico con una pureza superior al 99% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.738,0, M calculada 1.738,05).

Ejemplo 8. Síntesis del compuesto 6: Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Trp-Arg-Tyr-Tyr-Arg-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0161] La resina TentaGel S RAM seca (0,23 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la lisina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 437 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 257 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.780,0, M calculada 1.780,11).

Ejemplo 9. Síntesis del compuesto 7: Ac-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Trp-D-Arg-D-Tyr-D-Tyr-D-Arg-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0162] La resina TentaGel S RAM seca (0,23 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la D-lisina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 410 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 263 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.780,13, M calculada 1.780,11).

Ejemplo 10. Síntesis del compuesto 8: Ac-D-Arg-D-Tyr-D-Tyr-D-Arg-D-Trp-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-D-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0163] La resina TentaGel S RAM seca (0,23 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la D-arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 419 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 205 mg de producto peptídico con una pureza superior al 97% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.780,0, M calculada 1.780,11).

Ejemplo 11. Síntesis del compuesto 9: Ac-Lys-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0164] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la lisina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 445 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 287 mg de producto peptídico con una pureza superior al 96% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.752,0, M calculada 1.752,1).

Ejemplo 12. Síntesis del compuesto 10: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0165] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 376 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 134 mg de producto peptídico con una pureza superior al 97% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.707,0, M calculada 1.707,11).

Ejemplo 13. Síntesis del compuesto 11: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0166] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 429 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 260 mg de producto peptídico con una pureza superior al 96% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.723,0, M calculada 1.723,05).

Ejemplo 14. Síntesis del compuesto 12: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0167] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 426 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 266 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.651,88, M calculada 1.652,01).

Ejemplo 15. Síntesis del compuesto 13: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0168] La resina TentaGel S RAM seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 465 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 313 mg de producto peptídico con una pureza superior al 91% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.883,0, M calculada 1.883,12).

Ejemplo 16. Síntesis del compuesto 15: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Cys-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0169] La resina TentaGel S RAM seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado "Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron

según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 249 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 190 mg de producto peptídico con una pureza superior al 94% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.114,50, M calculada 1.114,55).

5

Ejemplo 17. Síntesis del compuesto 16: H-Cys-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0170] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la cisteína N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de la desprotección final del grupo Fmoc, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 359 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 242 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.240,76, M calculada 1.240,78).

Ejemplo 18. Síntesis del compuesto 17: H-Cys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0171] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la cisteína N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de la desprotección final del grupo Fmoc, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 287 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 205 mg de producto peptídico con una pureza superior al 90% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 888,5, M calculada 888,61).

Ejemplo 19. Síntesis del compuesto 18: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ en TentaGel S RAM.

[0172] La resina TentaGel S RAM seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 465 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 313 mg de producto peptídico con una pureza superior al 91% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.883,00, M calculada 1.883,12).

Ejemplo 20. Síntesis del compuesto 14: Tfa-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0173] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se trifluoroacetiló según se ha descrito anteriormente. La reacción se continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 392 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 105 mg de producto peptídico con una pureza superior al 96% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.834,25, M calculada 1.834,08).

55

Ejemplo 21: Síntesis del compuesto CE1: Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ en TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc.

[0174] La resina TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se trató como se describe en el apartado “Síntesis de péptidos en lotes sobre la resina TentaGel” hasta finalizar el acoplamiento de la arginina N-terminal. Todos los acoplamientos se continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló según se ha descrito anteriormente. El acoplamiento se continuó durante la noche. Las

60

acilaciones se comprobaron según se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido se escindió de la resina según se ha descrito anteriormente. El rendimiento de producto crudo fueron 143 mg. Después de la purificación mediante HPLC preparativa, según se ha descrito anteriormente, se recogieron 52 mg de producto peptídico con una pureza superior al 97% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M encontrada 1.011,54, M calculada 1.011,54).

Ejemplo 22. Producción de inmunógenos.

[0175] Se han generado anticuerpos específicos contra el compuesto 1 mediante conjugación de los péptidos correspondientes al extremo N (Ac-RYYRWKC-NH₂), el extremo (H-CAPPSKKKKKK-NH₂) y el compuesto 13, que es una molécula de longitud completa con un resto Cys terminal para adaptarse a la química de acoplamiento (Ac-RYYRV11KKKKKKKGNH₂). Ac-RYYRWKC-NH₂ y H-CAPPSKKKKKK-NH₂ se acoplaron a hemocianina de lapa californiana (KLH) y a una albúmina de suero bovino cationizada disponible comercialmente (Supercarrier, Pierce Chemical). Los conjugados con KLH y Supercarrier resultantes se combinaron y se inyectaron en conejos. El compuesto 13 se conjugó con el derivado proteico purificado (PPD) y se inyectó en una cabra preinmunizada con BCG. Las inmunizaciones se realizaron siguiendo los protocolos estándar de inmunización inicial del inmunógeno en el adyuvante completo de Freund, seguido de un régimen de refuerzo con una emulsión del inmunógeno en el adyuvante incompleto de Freund y hemorragia de prueba hasta que los títulos de los anticuerpos alcanzaron niveles aceptables. Los anticuerpos se purificaron en una etapa por cromatografía de afinidad en una columna G específica para las inmunoglobulinas de la subclase IgG.

Ejemplo 23. Producción de anticuerpos

[0176] Los anticuerpos se prepararon según las líneas generales discutidas previamente. Se han generado cuatro anticuerpos policlonales representativos contra péptidos que se ajustan a las fórmulas generales descritas en las reivindicaciones. Estos comprenden un péptido que incorpora la secuencia del extremo N del compuesto 1, dos péptidos que incorporan la secuencia del extremo C del compuesto 1, así como un péptido que incorpora la secuencia completa del compuesto 1. Estos péptidos se designan compuestos 15, 16, 17 ó 18, respectivamente y tienen las secuencias siguientes: Ac-RYYRWKKKKKKK-NH₂ (compuesto 15); CAPPSKKKKKK-NH₂ (compuesto 16); CKKKKKK-NH₂ (compuesto 17) y Ac-RYYRWKKKKKKK-NH₂ (compuesto 18). Los anticuerpos policlonales dirigidos contra los compuestos 15, 16 y 17 se generaron en conejos y contra el compuesto 18 en cabra. Estos anticuerpos policlonales son muy específicos y producen los títulos indicados en la tabla acompañante cuando los anticuerpos se evalúan en un análisis estándar de tipo ELISA, con el compuesto 1 como antígeno y con detección colorimétrica del anticuerpo unido mediante un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra IgG, disponible en el comercio. Los ensayos preliminares con varios de los anticuerpos han indicado también la ausencia de reacciones cruzadas con antígenos con poca similitud de secuencia con el compuesto 1 en el análisis ELISA estándar descrito anteriormente. La tabla 7 se muestra a continuación.

Tabla 7

Inmunógeno	Antígeno en ELISA	Título de anticuerpo
15	Compuesto 1	1:750.000
16	Compuesto 1	1:200.000
17	Compuesto 1	1:350.000
17	Glucagón	sin reacción
18	Compuesto 1	1:2.000

[0177] Véanse los ejemplos y la discusión anteriores para más información relativa a los compuestos conjugados peptídicos desvelados en este ejemplo.

[0178] Aunque la invención se ha descrito con referencia realizaciones específicas, es posible construir modificaciones y variaciones de la invención sin apartarse del alcance de la invención, el cual se define en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado peptídico de la fórmula general I



5 en la que

X representa un hexapéptido con la secuencia aminoacídica (RK)YY(RK)(WI)(RK), en la que los restos aminoacídicos alternativos en las posiciones 1, 4, 5 y 6 se muestran entre paréntesis y en la que cada resto aminoacídico en dicho hexapéptido puede estar en la forma L o D;

10

Z representa una cadena peptídica cargada de 4 a 20 restos aminoacídicos con la configuración D o L o está ausente; y

Z' representa una cadena peptídica cargada de 4 a 20 restos aminoacídicos con la configuración D o L o está ausente, teniendo en cuenta que Z y Z' no estén ausentes a la vez;

15

R₁ representa H o un grupo acilo;

R₂ representa NR₃R₄, en que cada uno de R₃ y R₄ representan independientemente hidrógeno, alcoxi C(1-6), ariloxi o alquilo; o R₂ representa OH;

20

en que los conjugados peptídicos de la fórmula I pueden estar ligados opcionalmente a una fracción de transporte; o una sal, hidrato o solvato del mismo o un derivado del mismo esterificado en el extremo C con un ácido orgánico o inorgánico adecuado.

25

2. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el número de restos aminoacídicos en Z y Z' está en el intervalo de 5 a 10.

3. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que los restos aminoacídicos en Z y Z' presentan la configuración L.

30

4. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que los restos aminoacídicos de Z se seleccionan del grupo que consta de Q, T, S, P, N, E y D.

5. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el aminoácido N-terminal de Z se selecciona del grupo que consta de Q, T, N y S y los restos aminoacídicos restantes se seleccionan del grupo que consta de P, D y E.

35

6. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que Z se selecciona del grupo que consta de N(E)₇, N(E)₆, N(E)₅, N(E)₃, S(E)₇, S(E)₆, S(E)₅, S(E)₃, NP(E)₄, NP(E)₅, N(D)₇, N(D)₆, N(D)₅, N(D)₃, Q(E)₇, Q(E)₅, Q(E)₃, QN(D)₇, Q(D)₆, C(D)₅, y Q(D)₃.

40

7. Un conjugado peptídico según la reivindicación 1 con la fórmula general III



45

8. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes ligado además a una fracción de transporte, en que dicha fracción de transporte se selecciona preferentemente del grupo que consta de los restos 49-57 del péptido tat del VIH, los restos 49-56 del péptido tat del VIH, la secuencia tat YGRKKRRQRRR, un péptido de poliarginina con 6 a 20 restos, como R₆ y secuencias de péptidos transductores, como las secuencias peptídicas siguientes YARKARRQARR, YARAAARQARA, YARAARRAARR, YARAARRAARA, YARRRRRRRRR y YAAARRRRRRR.

50

9. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que Z' representa una cadena peptídica cargada positivamente.

55

10. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que R₁ representa acetilo o trifluoroacetilo.

11. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que R₂ representa NH₂ o R₂ representa NR₃R₄, en que cada uno de R₃ y R₄ representan de manera independiente hidrógeno, metilo o etilo.

60

12. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicho hexapéptido X se selecciona del grupo que consta de KYRWK, RYRW, RYRW, RYRW (todos D), RYRIK, RYRI, RYKIK, RYKIR, RYKWR y RYKWK.
- 5 13 Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicho hexapéptido X es KYRWK o RYRW.
14. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que los restos aminoácidos de Z' se seleccionan del grupo que consta de A, G, K, H y R, preferentemente K.
- 10 15. Un conjugado peptídico según la reivindicación precedente, en que Z' se selecciona del grupo que consta de A(K₄)G, K₅G, AK₅, K₁₀, K₉, K₈, K₇, K₆, K₅ y K₄.
16. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además un resto de cisteína terminal.
- 15 17. Un conjugado peptídico según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consta de
- 20 compuesto 1: Ac-RYRWKKKKKKK-NH₂
 compuesto 2: Ac-KKKKKKRYRWK-NH₂
 compuesto 3: H-NEEEEEERYRWKKKKKKK-NH₂
 compuesto 8: Ac-RYRWKKKKKKK-NH₂ (todos D)
 compuesto 9: Ac-KYRWKKKKKKK-NH₂
 compuesto 10: Ac-RYRIKKKKKKK-NH₂
 25 compuesto 11: Ac-RYRWKAKKKKKK-NH₂
 compuesto 12: Ac-RYRWKKKKKKK-NH₂
 compuesto 13: Ac-RYRWKKKKKKKC-NH₂
 compuesto 14: Tfa-RYRWKKKKKKK-NH₂
- 30 el ácido libre C-terminal del mismo, derivados esterificados del mismo y sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables del mismo.
18. Un conjugado peptídico según la reivindicación 17, que es el compuesto 1A: Ac-RYRWKKKKKKK-NH₂ x 9 CH₃COOH o el compuesto 1C: Ac-FtYRWKKKKKKK-NH₂ x 9 HCl.
- 35 19. Un conjugado peptídico X-Z' seleccionado del grupo que consta de RYRWKAK₅, KYRWK₆, RYRWK₆, RYRWK₆, RYRIK₆ y RYRWK₆ o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado acetilado en el extremo N o amidado o esterificado en el extremo C del mismo.
- 40 20. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que es Ac-RYRWK₆-NH₂ (compuesto 1) o una sal, hidrato o solvato del mismo.
21. Una sustancia biológicamente activa que comprende un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que está cargado positivamente y un contraión cargado negativamente seleccionado del grupo que consta de aniones farmacéuticamente aceptables, preferentemente CH₃COO⁻, CF₃COO⁻, Cl⁻, SO₃²⁻, maleato y oleato.
- 45 22. Una composición farmacéutica que comprende como compuesto activo un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una sustancia activa según se define en la reivindicación 21 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 50 23. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22 que comprende además un vehículo líquido seleccionado del grupo que consta de jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácido graso, polioxietileno y agua para la administración por vía parenteral.
- 55 24. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22 o la reivindicación 23 que contiene en una dosis unitaria una cantidad de dicho conjugado peptídico en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg.
- 60 25. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22 en una forma adaptada para la administración solo por vía periférica.

26. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para el uso en un procedimiento de tratamiento médico.
27. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológica según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de hiponatremia o hipopotasemia.
28. Uso según la reivindicación 27, en que dicha hiponatremia o hipopotasemia está asociada con insuficiencia cardíaca.
29. Uso según la reivindicación 28, en que dicha hiponatremia o hipopotasemia está asociada con un tratamiento diurético intensivo con tiazidas y/o diuréticos del asa.
30. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para la diuresis acuosa selectiva.
31. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una afección con retención de agua, como insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática, síndrome nefrótico e hipertensión.
32. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la insuficiencia orgánica múltiple.
33. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la insuficiencia renal aguda.
34. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el uso en el tratamiento de estados patológicos asociados con una elevada actividad de nociceptina.
35. Uso de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una sustancia biológicamente activa según la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de edemas, opcionalmente en combinación con un diurético.
36. Uso según la reivindicación 35, en que el edema está asociado con insuficiencia cardíaca coronaria.
37. Uso según la reivindicación 35, en que dicho diurético es un diurético del asa.
38. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia peptídica de la fórmula I o III.
39. Una célula hospedadora recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 38 y es capaz de expresar dicha secuencia polipeptídica.
40. Un procedimiento para la producción de un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 con una secuencia polipeptídica natural que comprende:
- la introducción de una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 38 y un marcador seleccionable, contenidos dentro de una construcción de ácido nucleico o un vector, en una célula hospedadora para obtener una célula hospedadora recombinante;
- la selección de dicha célula hospedadora recombinante;
- el cultivo de dichas células hospedadoras recombinantes en condiciones que permitan la producción de dicha secuencia polipeptídica;
- el aislamiento de dicha secuencia polipeptídica del cultivo;

opcionalmente la escisión de dicha secuencia polipeptídica mediante una proteasa adecuada para obtener dicho conjugado peptídico.

41. Un procedimiento para sintetizar un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 por medio de técnicas de síntesis peptídica en fase de disolución o en fase sólida.
42. Un procedimiento para mejorar la estabilidad en el plasma sanguíneo de un hexapéptido con la secuencia (RK)YY(RK)(WI)(RK), en la que los restos aminoacídicos alternativos en las posiciones 1, 4, 5 y 6 se muestran entre paréntesis y en que cada resto aminoacídico en dicho hexapéptido puede estar en la forma L o D; en que el procedimiento comprende la ligación de una secuencia peptídica Z' por medio de un enlace peptídico al extremo C de dicho hexapéptido para formar un péptido conjugado, en que Z' representa una cadena peptídica cargada con 4 a 20 restos aminoacídicos en la configuración D o L y en que dicho procedimiento no se realiza *in vivo*.
- 15 43. Un procedimiento según la reivindicación 42, en que dicha secuencia Z' se selecciona del grupo que consta de secuencias K₅, K₆ y K₅C sin ramificar.

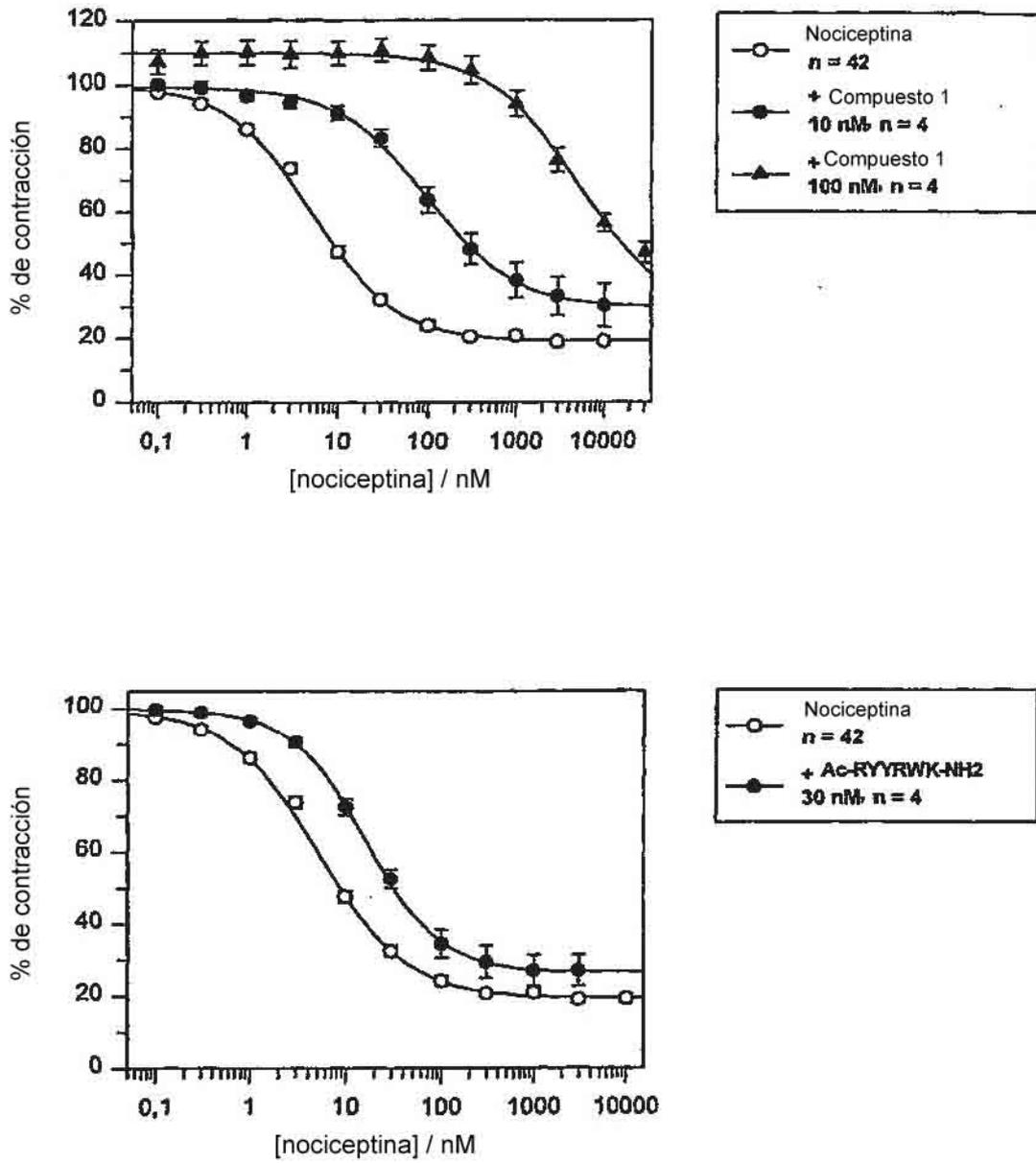


Fig. 1

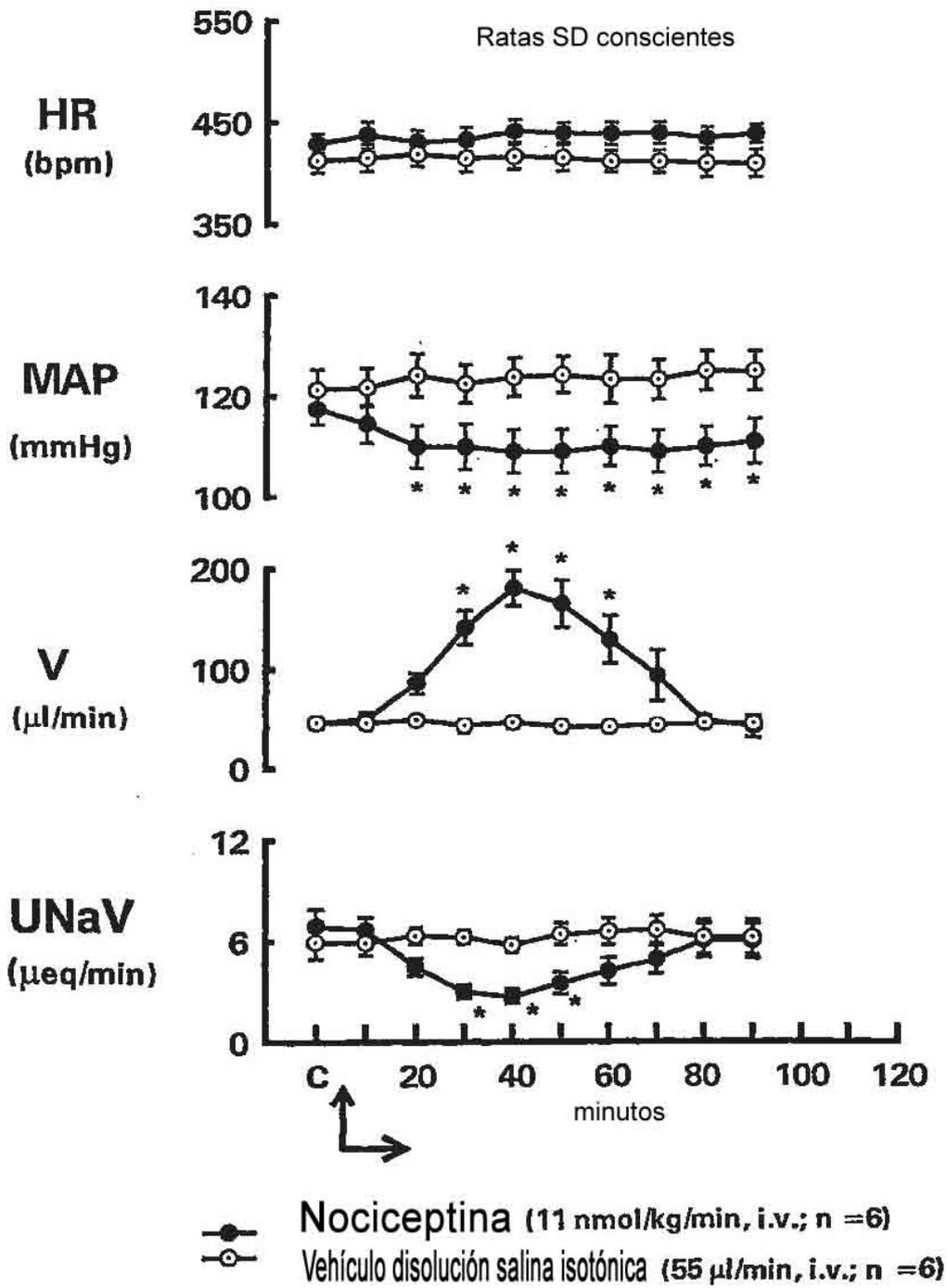


Fig. 2

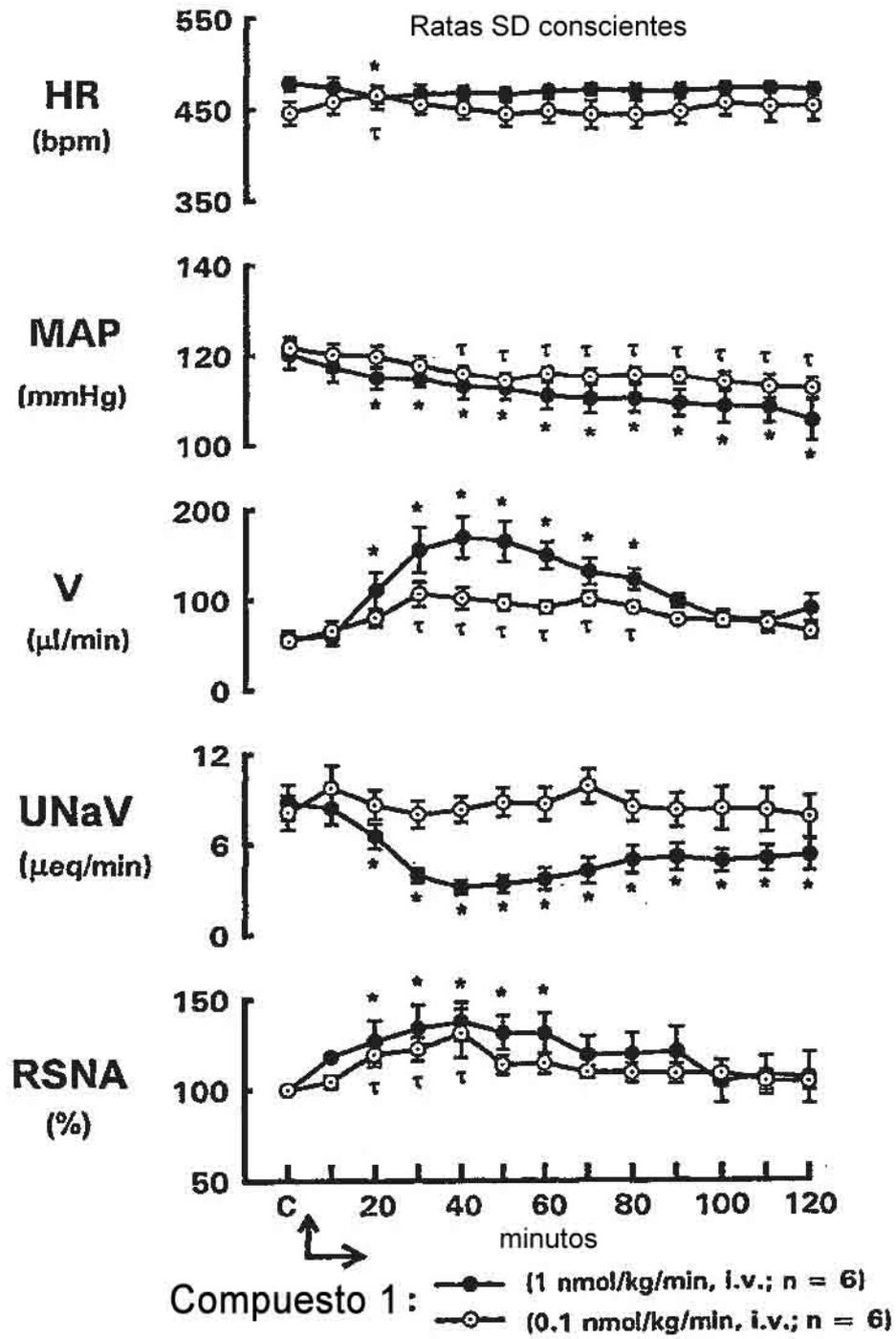


Fig. 3

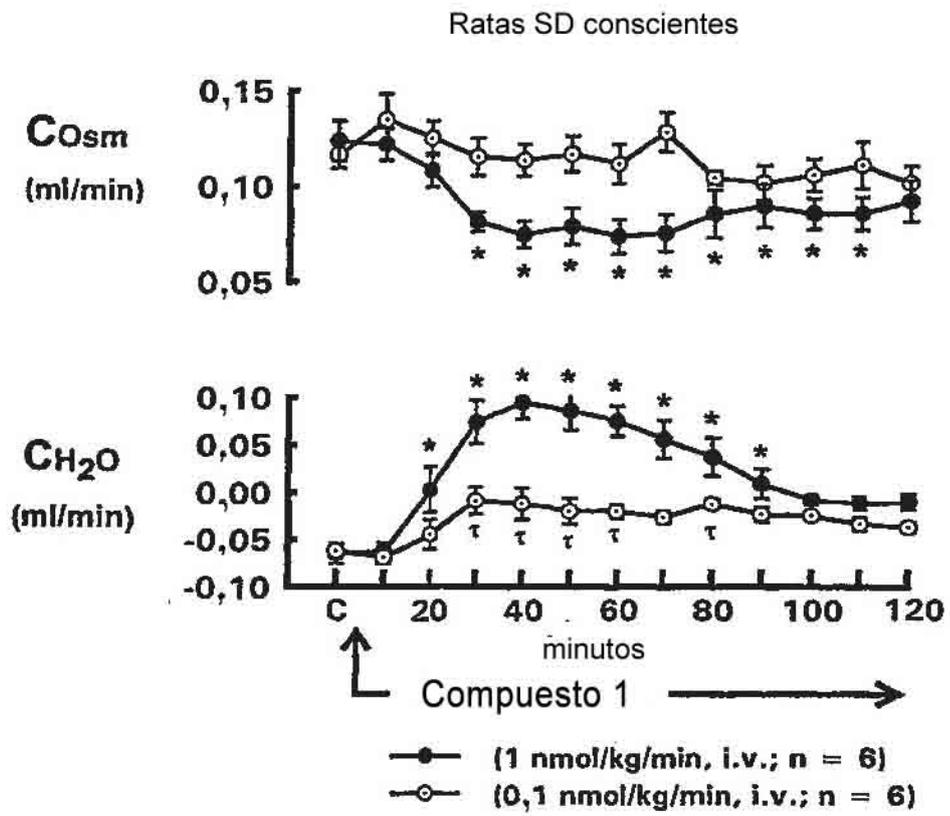


Fig. 4

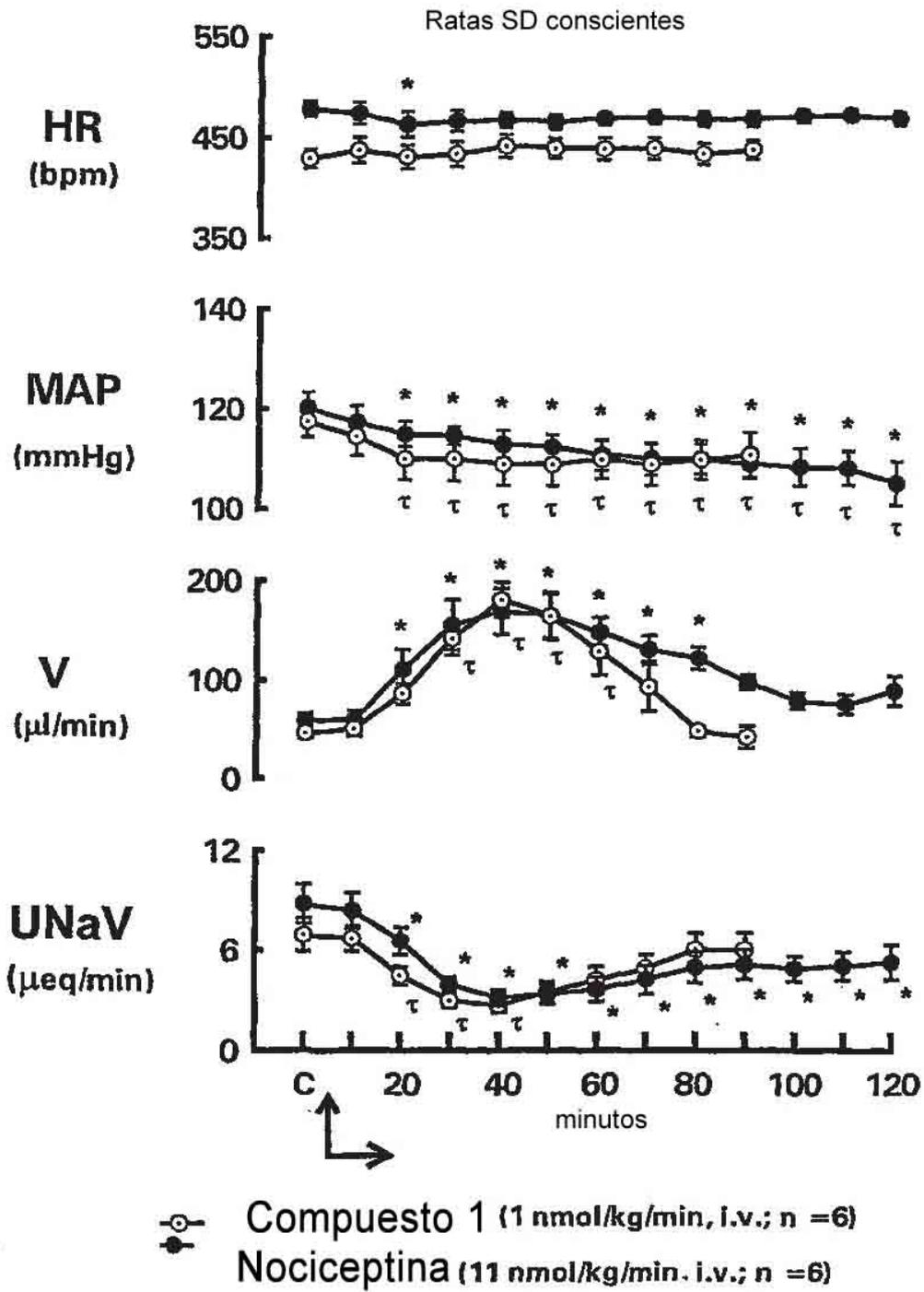


Fig. 5

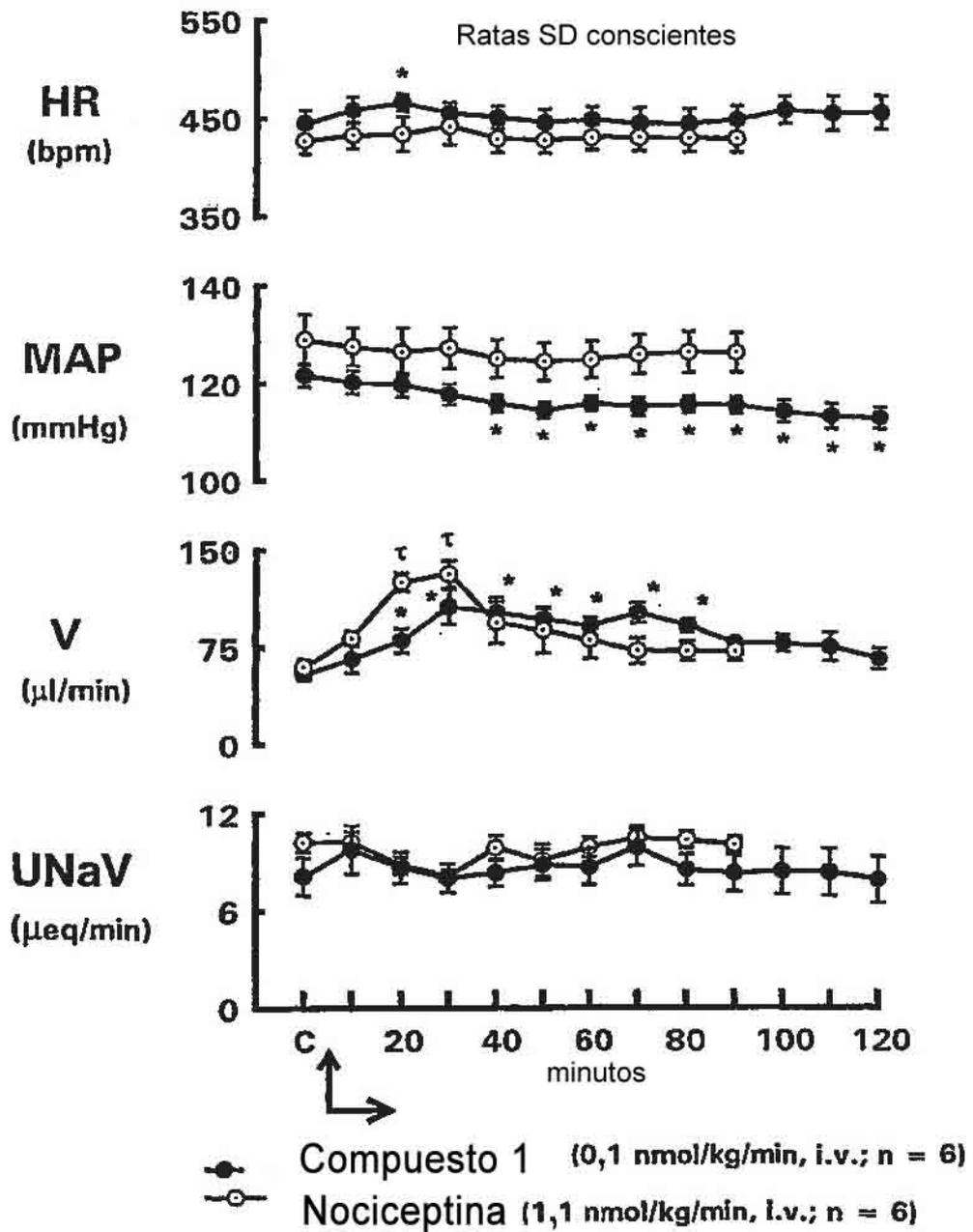
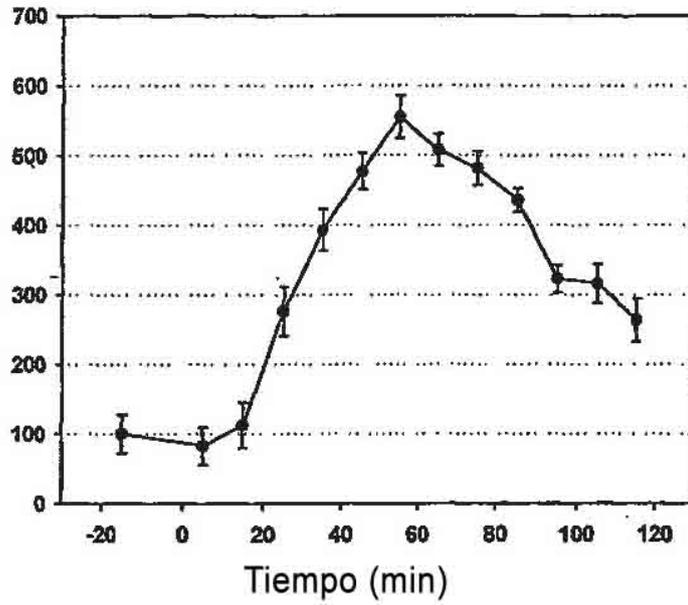


Fig. 6

Tasa de flujo urinario



Excreción de sodio y potasio

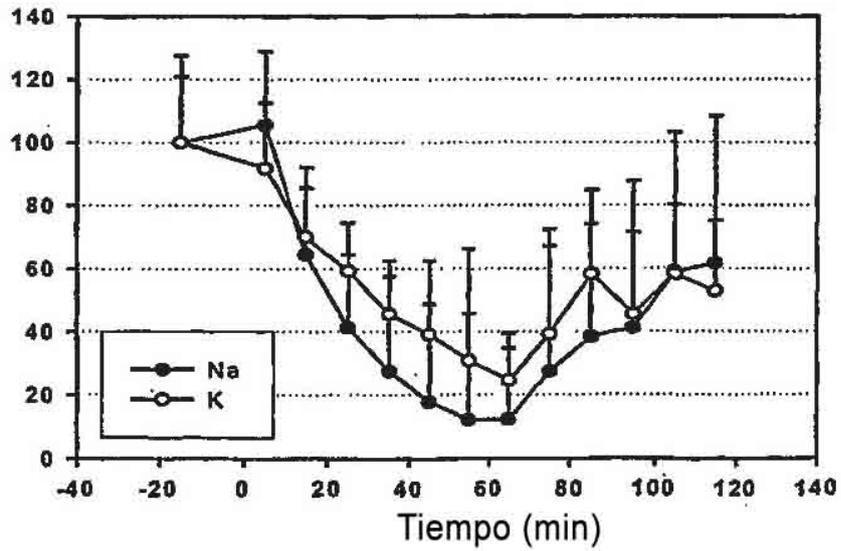


Fig. 7

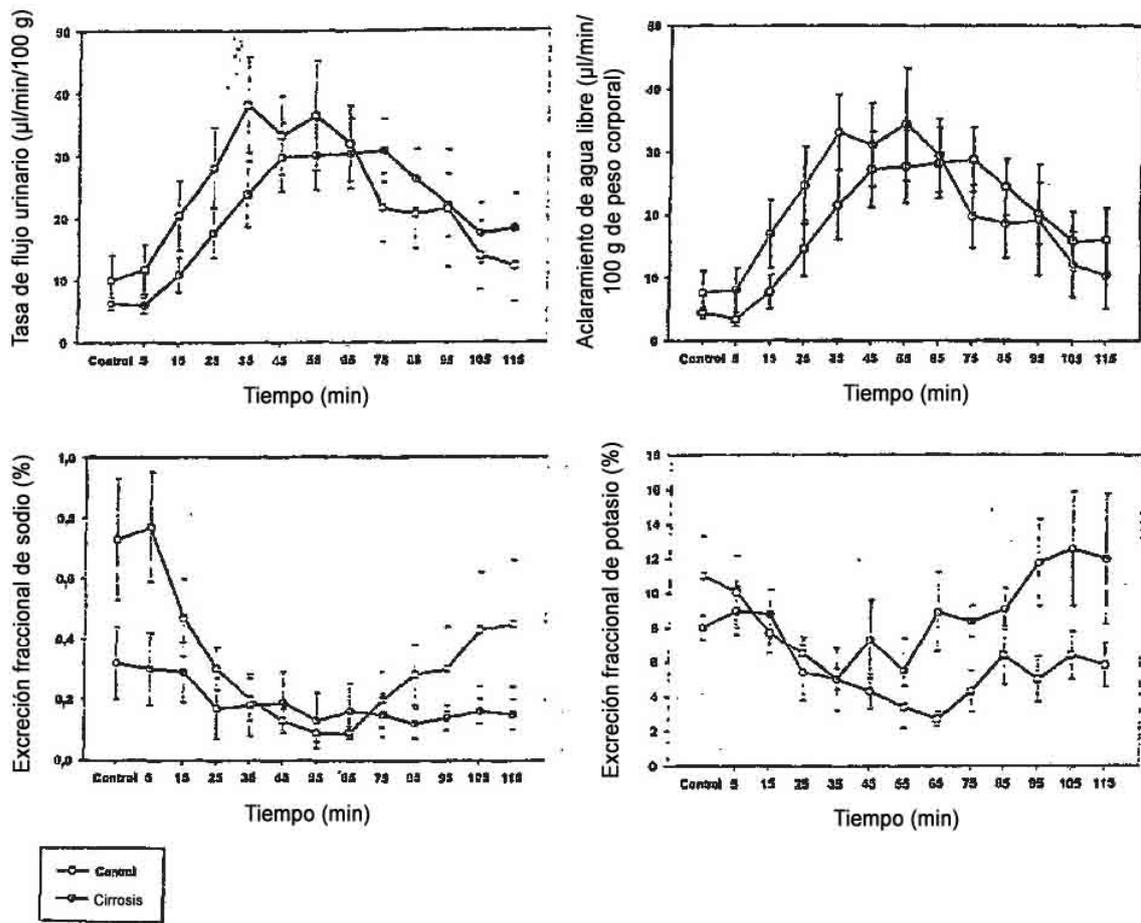


FIGURA 8

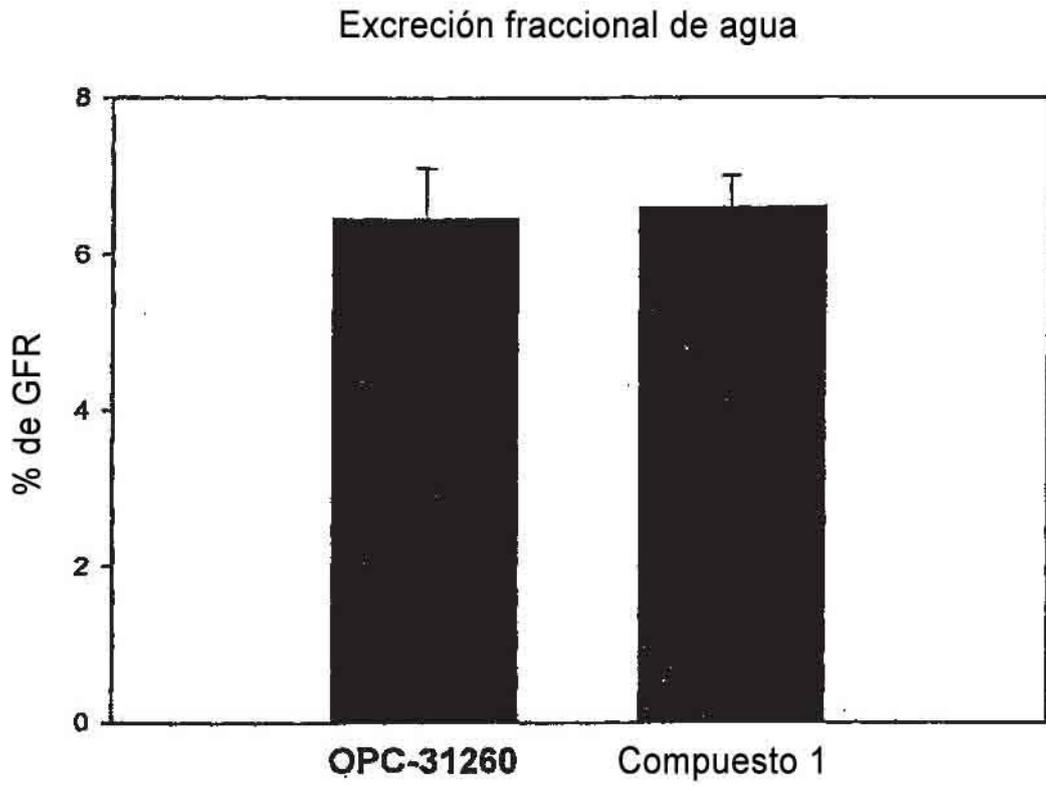


Fig. 9

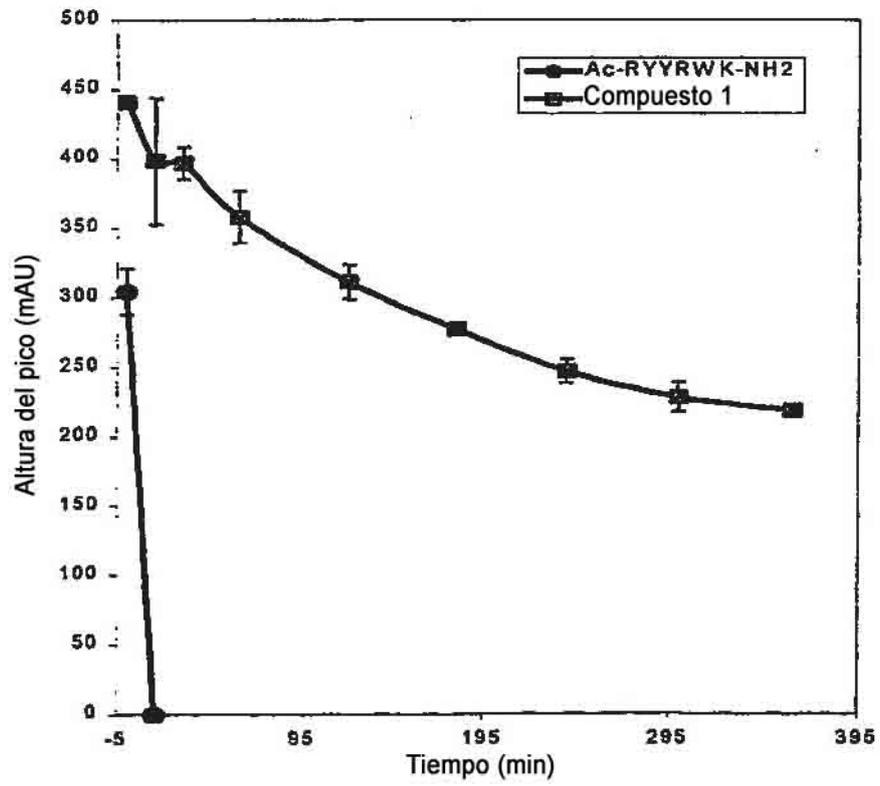


Fig. 10