

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 377**

51 Int. Cl.:

C07K 5/107 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2007 E 07870877 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.06.2009 EP 2064228**

54 Título: **Amidas de péptidos sintéticos**

30 Prioridad:

10.11.2006 US 858109 P

10.05.2007 US 928550 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.01.2013

73 Titular/es:

CARA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

1 PARROTT DRIVE

SHELTON, CT 06484, US

72 Inventor/es:

SCHTEINGART, CLAUDIO D.;

MENZAGHI, FREDERIQUE;

JIANG, GUANGCHENG;

ALEXANDER, ROBERTA VEZZA;

SUEIRAS-DIAZ, JAVIER;

SPENCER, ROBERT H.;

CHALMERS, DEREK T. y

LUO, ZHIYONG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 394 377 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

Amidas de péptidos sintéticos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a amidas de péptidos sintéticos que incorporan D-aminoácidos en la cadena peptídica y, más concretamente, a tales amidas de péptidos sintéticos que son agonistas de receptores opioides kappa y a su uso como agentes profilácticos y terapéuticos.

FUNDAMENTOS

10 Los receptores opioides kappa han sido propuestos como objetivos a intervenir para el tratamiento o prevención de una gran variedad de enfermedades y afecciones mediante la administración de agonistas de receptores opioides kappa. Véanse, por ejemplo, Jolivalt *et al.*, *Diabetologia*, 49(11):2775-85; Epub agosto. 19 de 2006), que describe la eficacia de la asimadolina, un agonista de receptores kappa, en la neuropatía diabética en roedores; y Bileviciute-Ljungar *et al.*, *Eur. J. Pharm.* 494:139-46 (2004) que describe la eficacia del agonista kappa U-50,488 en el modelo de dolor neuropático de la lesión constrictiva crónica (CCI, por sus siglas en inglés) en ratas y el bloqueo de sus efectos por parte del antagonista opioide, naloxona. Estos estudios respaldan el uso de agonistas de receptores opioides kappa para el tratamiento del dolor neuropático diabético, viral e inducido por quimioterapia. También ha sido examinado el uso de agonistas de receptores kappa para el tratamiento o prevención del dolor visceral, incluidas afecciones ginecológicas tales como calambres menstruales dolorosos y endometriosis. Véase, por ejemplo, Riviere, *Br. J. Pharmacol.* 141:1331-4 (2004).

20 Los agonistas de receptores opioides kappa también se han propuesto para el tratamiento del dolor, incluida la hiperalgesia. Se cree que la hiperalgesia se debe a cambios en el entorno de la terminal sensorial periférica que se producen tras una lesión tisular local. La lesión y la inflamación tisular (p. ej., abrasiones y quemaduras) pueden producir aumentos significativos en la excitabilidad de los nociceptores polimodales (fibras C) y en los mecanorreceptores de alto umbral (Handwerker *et al.* (1991) *Proceeding of the VIth World Congress on Pain*, Bond *et al.*, eds., Elsevier Science Publishers BV, págs. 59-70; Schaible *et al.* (1993) *Pain* 55:5-54). Se cree que la hiperalgesia subyace tras este aumento de excitabilidad y tras las respuestas exageradas de los aferentes sensoriales, donde la respuesta al dolor es el resultado de una respuesta exagerada a un estímulo. Se ha demostrado reiteradamente la importancia del estado hiperalgésico en el estado de dolor poslesión y parece ser responsable de una proporción mayoritaria del estado de dolor poslesión/inflamatorio. Véase, por ejemplo, Woold *et al.* (1993) *Anesthesia and Analgesia* 77:362-79; Dubner *et al.* (1994) *En, Textbook of Pain*, Melzack *et al.*, eds., Churchill-Livingstone, Londres, págs. 225-242.

30 Se han propuesto los receptores opioides Kappa como objetivos para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Véase, por ejemplo, Wu *et al.* "Cardioprotection of Preconditioning by Metabolic Inhibition in the Rat Ventricular Myocyte – Involvement of kappa Opioid Receptor" (1999) *Circulation Res* vol. 84: págs. 1388-1395. Véase también Yu *et al.* "Anti-Arrhythmic Effect of kappa Opioid Receptor Stimulation in the Perfused Rat Heart: Involvement of a cAMP-Dependent Pathway" (1999) *J Mol Cell Cardiol.* vol. 31(10): págs. 1809-1819.

35 También se ha descubierto que se puede prevenir el desarrollo o evolución de estas enfermedades y afecciones relacionadas con la neurodegeneración o con la muerte de células neuronales, o al menos se puede ralentizar, mediante el tratamiento con agonistas de receptores opioides kappa. Se cree que esta mejora se debe a la neuroprotección por parte de agonistas de receptores opioides kappa. Véase, por ejemplo, Kaushik *et al.* "Neuroprotection in Glaucoma" (2003) *J. Postgraduate Medicine* vol. 49 (1): págs. 90-95.

40 Se ha relacionado la presencia de receptores opioides kappa en células inmunitarias (Bidlak *et al.*, (2000) *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7(5):719-723) con la acción inhibitoria de un agonista de receptores opioides kappa, que se ha demostrado suprime la expresión de VIH-1. Véanse Peterson PK *et al.*, *Biochem Pharmacol.* 2001, 61(19):1145-51.

45 Walker, *Adv. Exp. Med. Biol.* 521:148-60 (2003) evalúa las propiedades antiinflamatorias de agonistas kappa para el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria y eczema. Bileviciute-Ljungar *et al.*, *Rheumatology* 45:295-302 (2006) describe la reducción del dolor y de la degeneración en la artritis inducida por el adyuvante de Freund por parte del agonista kappa U-50,488.

Wikstrom *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3742-7 (2005) describe el uso de un agonista kappa, TRK-820, para el tratamiento del prurito urémico e inducido por opiáceos, y Ko *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:173-9 (2003) describe la eficacia de U-50,488 en el prurito inducido por morfina en simios.

50 También se ha examinado de forma exhaustiva la aplicación de opioides periféricos, incluidos los agonistas kappa, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Véase, por ejemplo, Lembo, *Diges. Dis.* 24:91-8 (2006) para una discusión sobre el uso de opioides en el tratamiento de trastornos digestivos, incluido el síndrome del intestino irritable (SII), íleo y dispepsia funcional.

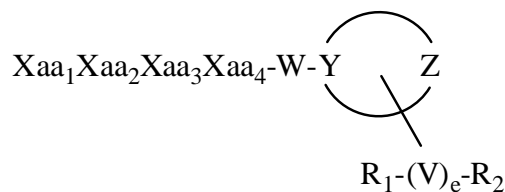
55 Se ha demostrado que los trastornos oftalmológicos, incluida la inflamación ocular y el glaucoma, son tratables con opioides kappa. Véase Potter *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309:548-53 (2004), que describe la función del potente agonista de receptores opioides kappa, brexazocina, en la reducción de la presión intraocular y el bloqueo de este efecto

por parte de la norbinaltorfimina (norBNI), el antagonista de receptores opioides kappa prototípico; y Dortch-Carnes *et al.*, *CNS Drug Rev.* 11(2):195-212 (2005). La patente de EE. UU. 6 191 126 de Gamache divulga el uso de agonistas opioides kappa para tratar el dolor ocular. También se ha demostrado que el dolor óptico es tratable mediante la administración de agonistas opioides kappa. Véase la patente de EE. UU. 6 174 878 que también es de Gamache.

5 Los agonistas opioides kappa aumentan la excreción renal de agua y disminuye la excreción urinaria de sodio (es decir, producen una diuresis selectiva de agua, que también se conoce como acuarenesis). Muchos investigadores, pero no todos, atribuyen este efecto a una supresión de la secreción de vasopresina de la pituitaria. Estudios que comparan opioides kappa supuestamente selectivos periféricamente y que actúan de forma central han concluido que los receptores opioides kappa del interior de la barrera hematoencefálica son los responsables de mediar este efecto. Otros investigadores han propuesto tratar la hiponatremia con péptidos nociceptina o conjugados peptídicos cargados que actúan periféricamente sobre el receptor de nociceptina, que está relacionado pero es diferente del receptor opioide kappa (D. R. Kapusta, *Life Sci.*, 60:15-21, 1997) (patente de EE. UU. N.º 5 840 696). Solicitud de patente de EE. UU. 20060052284. WO993251 describe antagonistas del KOR con una estructura química relacionada p. ej., H-D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-piperazinilo.

15 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención estipula amidas de péptidos sintéticos que poseen la fórmula de la Fórmula I siguiente y estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos, hidratos de sales de ácidos, N-óxidos y formas cristalinas isomórficas de las amidas de péptidos sintéticos de la Fórmula I:



20 **Fórmula I**

En la Fórmula I, Xaa₁ representa un aminoácido N-terminal que puede ser cualquiera de: (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, D-tert-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina o β(E)D-Ala, donde cada (A) y cada (A') son sustituyentes de anillo fenilo elegidos de forma independiente entre -H, -F, -Cl, -NO₂, -CH₃, -CF₃, -CN y -CONH₂, y donde cada (E) se elige de forma independiente entre los siguientes sustituyentes: ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, piridilo, tienilo y tiazolilo.

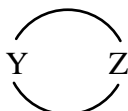
Xaa₂ es un segundo aminoácido que puede ser cualquiera de (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1-naftilalanina, D-2-naftilalanina, D-Tyr, (E)D-Ala o D-Trp; donde (A), (A') y (E) se eligen cada uno de forma independiente entre los sustituyentes enumerados anteriormente para cada uno de (A), (A') y (E).

Xaa₃ es un tercer aminoácido que puede ser cualquiera de D-norleucina, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-homoleucina, D-Val o D-Met, donde (E) se elige de forma independiente entre los sustituyentes enumerados anteriormente para (E).

Xaa₄ es un cuarto aminoácido que puede ser cualquiera de (B)₂D-arginina, (B)₂D-norarginina, (B)₂D-homoarginina, ζ-(B)D-homolisina, ácido D-2,3-diaminopropiónico, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂D-Lys, D-aminometilfenilalanina, amidino-D-aminometilfenilalanina, ácido γ-(B)₂D-γ-diaminobutírico, δ-(B)₂α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiónico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiónico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiónico, ácido α-amino-4-piperidineacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidineacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético o ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético, donde cada (B) es de forma independiente -H o C₁-C₄ alquilo y (B') es -H o (α-Me).

40 El resto conector, W puede ser cualquiera de las siguientes alternativas: (i) nulo, siempre que, cuando W sea nulo, Y sea N y esté enlazado al C terminal de Xaa₄ para formar una amida; (ii) -NH-(CH₂)_b- con b igual a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; o (iii) -NH-(CH₂)_c-O- con c igual a 2 ó 3, siempre que Y sea C. En cada una de las alternativas anteriores, (ii) y (iii), el átomo de N de W está enlazado al C terminal de Xaa₄ para formar una amida.

El resto



45

- 5 en la Fórmula I es un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros opcionalmente sustituido donde todos los heteroátomos del anillo en el anillo sustituyente son N, y donde Y y Z son cada uno de forma independiente C o N. Sin embargo, cuando el anillo heterocíclico sustituyente sea un anillo de seis, siete u ocho miembros, Y y Z deberán estar separados por al menos dos átomos del anillo. Además, cuando este anillo heterocíclico sustituyente posea un único heteroátomo en el anillo que sea N, entonces el anillo sustituyente será no aromático.
- El resto V en la Fórmula I es C₁-C₆ alquilo. El operador e es 0 ó 1, de forma que cuando e sea 0, entonces V será nulo, y R₁ y R₂ estarán unidos directamente al mismo o a diferentes átomos del anillo.
- 10 En la primera de cuatro realizaciones alternativas, el resto R₁ en la Fórmula I puede ser cualquiera de los siguientes grupos: -H, -OH, halo, -CF₃, -NH₂, -COOH, C₁-C₆ alquilo, amidino, amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, arilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, CN, CONH₂, COR', SO₂R', CONR'R", NHCOR', OR' o SO₂NR'R"; donde el heterociclilo opcionalmente sustituido está opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. Los restos R' y R" son cada uno de forma independiente H, C₁-C₈ alquilo, arilo o heterociclilo. Como alternativa, R' y R" se combinan para formar un anillo de 4 a 8 miembros, dicho anillo está
- 15 opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. El resto R₂ puede ser cualquiera de -H, amidino, amidino sustituido de forma única o doble por C₁-C₆ alquilo, -CN, -CONH₂, -CONR'R", -NHCOR', -SO₂NR'R" o -COOH.
- 20 En una segunda realización, los restos R₁ y R₂ juntos pueden formar un anillo sustituyente monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido que está enlazado a un único átomo del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z.
- En una tercera realización, los restos R₁ y R₂ junto con un único átomo del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros para formar una estructura espiro.
- 25 En una cuarta realización, los restos R₁ y R₂ junto con dos o más átomos del anillo adyacentes del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido fusionado con el anillo sustituyente que contiene Y y Z.
- 30 En la Fórmula I, cada uno de los anillos heterocíclicos sustituyentes de 4, 5, 6, 7, 8 y 9 miembros opcionalmente sustituidos que comprenden R₁ y R₂ puede estar sustituidos de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, fenilo opcionalmente sustituido, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. Además, cuando el anillo sustituyente de la Fórmula I que contiene Y y Z sea un anillo de seis o siete miembros que posea un único heteroátomo en el anillo, y e sea cero, entonces R₁ no será OH, y R₁ y R₂ no serán a la vez H.
- 35 Cuando el anillo sustituyente de la Fórmula I que contiene Y y Z sea un anillo de seis miembros en el cual existan dos heteroátomos en el anillo donde tanto Y como Z sean N y W sea nulo, entonces el resto -(V)_eR₁R₂ estará enlazado a un anillo del átomo que no sea Z. Es más, en las condiciones anteriores, si e es 0, entonces R₁ y R₂ no pueden ser a la vez -H. Por último, cuando Xaa₃ sea D-Nle, entonces Xaa₄ no podrá ser (B)₂D-Arg; y cuando Xaa₃ sea D-Leu o (dMe)D-Leu, entonces Xaa₄ no podrá ser δ-(B)₂α-(B')D-Orn.
- La invención también estipula un agonista de receptores opioides kappa selectivo (al cual se hace referencia en la presente de forma indiferente como agonista de receptores opioides kappa o simplemente como agonista kappa) que es una amida de péptido sintético de la invención, como se describió anteriormente.
- 40 La invención también estipula una composición farmacéutica, que incluye una amida de péptido sintético de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- También se estipula una amida de péptido sintético de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero. El método incluye la
- 45 administración al mamífero de una composición que incluye una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención. La invención también estipula los usos de amidas de péptidos sintéticos de la invención para la preparación de medicamentos y composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a receptores opioides kappa en un mamífero.
- 50 La invención estipula además amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con el receptor opioide kappa en un mamífero, donde una amida de péptido sintético de la invención se administra junto con una dosis reducida de un compuesto analgésico agonista opioide mu para producir un efecto terapéutico analgésico. El compuesto analgésico agonista opioide mu tiene un efecto secundario asociado (concretamente depresión respiratoria, sedación, euforia, antidiuresis, náusea, vómitos, estreñimiento y tolerancia física, dependencia y adicción). La dosis reducida del compuesto analgésico agonista opioide mu administrada mediante este método tiene menos efectos secundarios asociados que los efectos secundarios
- 55 asociados con la dosis del compuesto analgésico agonista opioide mu necesaria para lograr el mismo efecto terapéutico analgésico cuando se administra sola.

La invención también estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de la hiperalgesia periférica, donde el método incluye aplicar tópicamente o administrar localmente a un mamífero que requiera el tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que incluye una cantidad antihiperalgesicamente eficaz de una amida de péptido sintético de la invención en un vehículo formulada para aplicación tópica o administración local.

La invención también estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de la hiponatremia o hipocalcemia y, de ese modo, tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la hiponatremia o hipocalcemia, tal como la insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, hipertensión o edema, y preferentemente donde un aumento de la secreción de vasopresina se asocia a dicha enfermedad o trastorno, donde el método incluye administrar a un mamífero una cantidad acuaréticamente eficaz de una amida de péptido sintético de la invención en un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Muestra el esquema general utilizado en la síntesis de los Compuestos (1), (6), (7) y (11). Los pasos a – s se llevaron a cabo con los siguientes reactivos o condiciones: a) homopiperazina, DCM; b) Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH o Fmoc-D-Dab(ivDde)-OH o Fmoc-D-Orn(Aloc)-OH o Fmoc-D-Orn(Cbz)-OH o Fmoc-D-Lys(Dde)-OH o Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, DIC, HOBT, DMF; c) piperidina 25% en DMF; d) Fmoc-D-Leu-OH o Fmoc-D-Nle-OH, DIC, HOBT, DMF; e) Fmoc-D-Phe-OH, DIC, HOBT, DMF; f) Cbz-D-Phe-OH, DIC, HOBT, DMF; g) hidrazina 4% en DMF; h) Pd(PPh₃)₄, CHCl₃/AcOH/NMM; i) O-NBS-Cl, colidina, NMP; j) dimetilsulfato, DBU, NMP; k) mercaptoetanol, DBU, NMP; l) Cbz-OSu, DMF; m) acetona, AcOH, NaBH(OAc)₃, TMOF; n) 1H-pirazol-1-carboxamida, DIEA, DMF; o) TFA 50% /DCM; p) yodhidrato de S-metil-N-metilisotiourea, DIEA, DMF; q) yodhidrato de 2-metil-2-imidazolina, DIEA, DMF; r) yodoetano, DIEA, DMF; s) TMSOTf/TFA/m-cresol.

Figura 2: Esquema general utilizado en la síntesis de los Compuestos (2) - (5), (8), (9) y (12) - (14). Los pasos a – k se llevaron a cabo con los siguientes reactivos o condiciones: a) N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina, DIEA, DCM; b) piperidina 25%/DMF; c) Fmoc-D-Lys(Dde)-OH, DIC, HOBT, DMF; d) Fmoc-D-Leu-OH, DIC, HOBT, DMF; e) Fmoc-D-Phe-OH, DIC, HOBT, DMF; f) Boc-D-Phe-OH, DIC, HOBT, DMF; g) hidrazina 4% en DMF; h) o-NBS-Cl, colidina, NMP; i) dimetilsulfato, DBU, NMP; j) mercaptoetanol, DBU, NMP; k) TFA/TIS/H₂O.

Figura 3: Esquema general utilizado en la síntesis del compuesto (15)-(24). Los pasos a – n se llevaron a cabo con los siguientes reactivos o condiciones: a) piperidina 35% , DMF; b) ácido 1-Boc-4-N-Fmoc-aminopiperidin-4-carboxílico, PyBOP, DIEA, DMF; c) (i) piperidina 35%, DMF; (ii) O-NBS-Cl, colidina, NMP; d) TFA 30% en DCM; e) Boc-D-Dap(Fmoc)-OH o Boc-D-Dab(Fmoc)-OH o Boc-D-Orn(Fmoc)-OH, PyBOP, DIEA, DMF; f) Boc-D-Leu-OH, PyBOP, DIEA, DMF; g) Boc-D-Phe-OH, PyBOP, DIEA, DMF; h) Boc-D-Phe-OH, PyBOP, DIEA, DMF; i) DBU 2%/DMF; j) 1H-pirazol-1-carboxamida, DIEA, DMF; k) (i) acetona, TMOF, (ii) NaBH(OAc)₃, DMF; l) mercaptoetanol, DBU, NMP; m) Cu(OAc)₂, piridina, DBU, DMF/H₂O; n) TFA 95%/H₂O.

Figura 4: Esquema general utilizado en la síntesis del compuesto (25)-(37). Los pasos a – h se llevaron a cabo con los siguientes reactivos o condiciones: a) EDCl, HOBT, DIEA, THF; b) TFA, DCM; c) Boc-D-Phe-OH, EDCl, HOBT, DIEA; d) H₂, Pd/C; e) D-Lys(Boc)-OAlI, TBTU, DIEA, DMF; f) Pd(PPh₃)₄, pirrolidina; g) HNRaRb, HBTU; h) HCl, dioxano.

Figura 5: Concentración en plasma y en el cerebro de ratas detectada tras la administración de 3 mg/kg del Compuesto (2) en el transcurso de un periodo de infusión de 5 minutos a través de un catéter en la vena yugular. Concentración del Compuesto (2) en ng/ml: círculos vacíos: plasma, círculos rellenos: cerebro.

Figura 6: Las concentraciones en plasma del Compuesto (6) tras la administración subcutánea de un único bolo de 1 mg/kg del compuesto a ratones ICR. El plasma se muestreó 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la inyección.

Figura 7: Las concentraciones en plasma del Compuesto (3) tras la administración intravenosa de un único bolo de 0.56 mg/kg del compuesto a monos cynomologos. El plasma se muestreó 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la inyección.

Figura 8: Curvas dosis-respuesta para el Compuesto (3) en ratones ICR en el ensayo de constricción abdominal inducida por ácido acético (círculos rellenos) y en el ensayo de locomoción (cuadrados rellenos).

Figura 9: Respuesta a la dosis de la supresión mediada por Compuesto (2) del ensayo de constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones cuando se suministra por vía intravenosa.

Figura 10: Efectos del Compuesto (2) sobre la hipersensibilidad mecánica inducida por la ligadura de los nervios medulares L5/L6 en ratas. Círculos vacíos – únicamente vehículo; círculos rellenos – 0.1 mg/kg del Compuesto (2); cuadrados vacíos – 0.3 mg/kg del Compuesto (2); cuadrados rellenos - 1.0 mg/kg del Compuesto (2). ** denota p < 0.01; *** denota p < 0.001 vs. vehículo (2 Way ANOVA, Bonferroni).

Figura 11: Efecto del Compuesto (2) en concentraciones diferentes sobre la hipersensibilidad abdominal inducida por pancreatitis en ratas. Se administró dicloruro de dibutilin o únicamente vehículo intravenosamente y se determinó la

hipersensibilidad mediante pruebas abdominales con un filamento de von Frey a intervalos de 30 minutos. La hipersensibilidad se expresó como el número de retiradas de diez pruebas. Círculos vacíos – únicamente vehículo; círculos rellenos – 0.1 mg/kg del Compuesto (2); cuadrados vacíos – 0.3 mg/kg del Compuesto (2); cuadrados rellenos – 1.0 mg/kg del Compuesto (2). ** denota $p < 0.01$; *** denota $p < 0.001$ vs. vehículo (2 Way ANOVA, Bonferroni).

- 5 Figura 12: Bloqueo del efecto del Compuesto (2) en la hipersensibilidad abdominal inducida por pancreatitis por parte de nor-BNI y metioduro de naloxona en ratas. Columna vacía – únicamente vehículo, columna rellena – 1 mg/kg del Compuesto (2) con metioduro de naloxona o nor-BNI según se indique. *** denota $p < 0.001$ vs. vehículo + vehículo (2 Way ANOVA, Bonferroni).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 10 Como se utiliza en esta descripción, el término “amida de péptido sintético” hace referencia a un compuesto de la invención que se ajusta a la fórmula I, o a un estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, hidrato de sal de ácido, N-óxido o forma isomórfica cristalina de éste. Cuando Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ especifican aminoácidos D en compuesto de la invención, los estereoisómeros de un compuesto de la invención que se ajuste a la Fórmula I están limitados a los compuestos que poseen aminoácidos en la configuración D donde se especifique en la Fórmula I. Los estereoisómeros de la invención incluyen los compuestos que poseen la configuración D o L en los centros quirales que no sean los carbonos alfa de los cuatro aminoácidos Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄. “Mezclas de estereoisómeros” se refiere a mezclas de tales estereoisómeros de la invención. Como se utiliza en la presente, “racematos” hace referencia a mezclas de estereoisómeros que poseen proporciones iguales de compuestos con configuración D y L en uno o más de los centros quirales que no sean los carbonos alfa de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ sin variar la quiralidad de los carbonos alfa de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄.

- La nomenclatura utilizada en la presente para definir péptidos se especifica en Schroder & Lubke, *The Peptides*, Academic Press, 1965, donde, conforme a la representación convencional, el N terminal aparece a la izquierda y el C terminal a la derecha. Cuando un residuo aminoacídico posea formas isoméricas, quedarán incluidas ambas formas isoméricas L y D del aminoácido a no ser que se indique lo contrario. Los aminoácidos se identifican normalmente en la presente por el código de tres letras estándar. El isómero D de un aminoácido viene especificado por el prefijo “D-” como en “D-Phe” que representa D-fenilalanina, el isómero D de fenilalanina. De forma análoga, el isómero L viene especificado por el prefijo “L-” como en “L-Phe.” Los péptidos se representan en la presente conforme al convenio habitual como secuencias de aminoácidos de izquierda a derecha: de N terminal a C terminal, a menos que se especifique lo contrario.

- 30 Como se utiliza en la presente, D-Arg representa D-arginina, D-Har representa D-homoarginina, la cual posee una cadena lateral más larga que D-Arg en un grupo metileno, y D-Nar representa D-norarginina, la cual posee una cadena lateral más corta que D-Arg en un grupo metileno. De forma análoga, D-Leu quiere decir D-leucina, D-Nle quiere decir D-norleucina y D-Hle representa D-homoleucina. D-Ala quiere decir D-alanina, D-Tyr quiere decir D-tirosina, D-Trp quiere decir D-triptofano y D-Tic quiere decir ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisquinolina-3-carboxílico. D-Val quiere decir D-valina y D-Met quiere decir D-metionina. D-Pro quiere decir D-prolina, Pro-amida quiere decir la forma D o L de prolinamida. D-Pro amida representa D-prolina con una amida formada en su grupo carboxi donde el nitrógeno de la amida puede estar sustituido por alquilo, como en –NR_aR_b, donde R_a y R_b son de forma independiente un grupo C₁-C₆ alquilo, o uno de R_a y R_b es -H. Gly quiere decir glicina, D-Ile quiere decir D-isoleucina, D-Ser quiere decir D-serina y D-Thr quiere decir D-treonina. (E)D-Ala quiere decir el isómero D de alanina que está sustituido por el sustituyente (E) en el carbono β. Los ejemplos de tales grupos sustituyentes (E) incluyen ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, piridilo, tienilo y tiazolo. Así pues, ciclopentil-D-Ala quiere decir el isómero D de alanina que está sustituido por ciclopentilo en el carbono β. De forma análoga, D-Ala(2-tienilo) y (2-tienil)D-Ala son ambos de forma intercambiable e indistinta el isómero D de alanina sustituida en el carbono β por tienilo que está unido a la posición 2 del anillo.

- 45 Como se utiliza en la presente, D-Nal quiere decir el isómero D de alanina sustituida por naftilo en el carbono β. D-2Nal quiere decir D-alanina sustituida por naftilo donde la unión a naftaleno se encuentra en la posición 2 de la estructura de anillo y D-1Nal quiere decir D-alanina sustituida por naftilo donde la unión a naftaleno se encuentra en la posición 1 de la estructura de anillo. (A)(A')D-Phe quiere decir D-fenilalanina sustituida en el anillo fenilo por uno o dos sustituyentes elegidos de forma independiente entre halo, nitro, metilo, halometilo (tal como, por ejemplo, trifluorometilo), perhalometilo, ciano y carboxamida. D-(4-F)Phe quiere decir D-fenilalanina que está sustituida por fluoro en la posición 4 del anillo fenilo. D-(2-F)Phe quiere decir D-fenilalanina que está sustituida por fluoro en la posición 2 del anillo fenilo. D-(4-Cl)Phe quiere decir D-fenilalanina que está sustituida por cloro en la posición 4 del anillo fenilo. (α-Me)D-Phe quiere decir D-fenilalanina que está sustituida por metilo en el carbono alfa. (α-Me)D-Leu quiere decir D-leucina que está sustituida por metilo en el carbono alfa.

- 55 Las designaciones (B)₂D-Arg, (B)₂D-Nar y (B)₂D-Har representan D-arginina, D-norarginina y D-homoarginina, respectivamente, cada una con dos grupos sustituyentes (B) en la cadena lateral. D-Lys quiere decir D-lisina y D-Hlys quiere decir D-homolisina. ζ-(B)D-Hlys, ε-(B)D-Lys y ε-(B)₂D-Lys representan D-homolisina y D-lisina, cada una con el grupo amino de la cadena lateral sustituido por uno o dos de los grupos sustituyentes (B), según se indique. D-Orn quiere decir D-ornitina y δ-(B)α-(B')D-Orn quiere decir D-ornitina sustituida por (B') en el carbono alfa y sustituida por (B) en el grupo amino δ de la cadena lateral.

D-Dap quiere decir ácido D-2,3-diaminopropiónico. D-Dbu representa el isómero D de ácido alfa, gamma-diaminobutírico y (B)₂D-Dbu representa ácido alfa, gamma-diaminobutírico que está sustituido por dos grupos sustituyentes (B) en el grupo amino gamma. A no ser que se indique lo contrario, cada grupo (B) de dichos residuos doblemente sustituidos se elige de forma independiente entre H- y C₁-C₄-alquilo. Como se utiliza en la presente, D-Amf quiere decir D-(NH₂CH₂)Phe, es decir, el isómero D de fenilalanina sustituido por aminometilo en su anillo fenilo y D-4Amf representa la D-Amf particular en la que el aminometilo está unido a la posición 4 del anillo. D-Gmf quiere decir D-Amf(amidino) que representa D-Phe donde el anillo fenilo está sustituido por -CH₂NHC(NH)NH₂. Amd representa amidino, -C(NH)NH₂ y las designaciones (Amd)D-Amf y D-Amf(Amd) se usan también de forma intercambiable por D-Gmf. Las designaciones Ily e Ior se utilizan respectivamente para hacer referencia a isopropil-Lys e isopropil-Orn, donde el grupo amino de la cadena lateral está alquilado por un grupo isopropilo.

Alquilo quiere decir un radical alcano que puede ser un grupo alquilo lineal, ramificado y cíclico, tal como, pero si limitarse a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, *t*-butilo, *sec*-butilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo o ciclohexiletilo. C₁-C₈ alquilo se refiere a grupos alquilo que tienen entre uno y ocho átomos de carbono. De forma análoga, C₁-C₆ alquilo se refiere a grupos alquilo que tienen entre uno y seis átomos de carbono. De forma análoga, C₁-C₄ alquilo se refiere a grupos alquilo que tienen entre uno y cuatro átomos de carbono. Alquilo inferior quiere decir C₁-C₆ alquilo. Me, Et, Pr, Ipr, Bu y Pn se usan de forma intercambiable para representar los grupos alquilo comunes: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo y pentilo, respectivamente. Aunque el enlace de un grupo alquilo se encuentra normalmente en un extremo de una cadena alquilo, el enlace puede encontrarse en cualquier otro lugar de la cadena, p. ej., 3-pentilo al que también se puede hacer referencia como etilpropilo o 1-etilprop-1-ilo. Sustituido por alquilo, tal como amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, indica que el resto pertinente está sustituido por uno o más grupos alquilo.

Cuando un resto específico es nulo, el resto no está presente, y en el caso en que se indique que tal resto está enlazado a otros dos restos, estos dos restos están conectados por un enlace covalente. Cuando un resto conector se muestre en la presente como unido a un anillo en cualquier posición del anillo y esté enlazado a otros dos restos, tales como R₁ y R₂, en el que caso en que se especifique que éste sea nulo, entonces los restos R₁ y R₂ se pueden unir de forma independiente a cualquier posición del anillo.

Los términos "heterociclo", "anillo heterocíclico" y "heterociclilo" se usan de forma intercambiable en la presente y hacen referencia a un anillo o anillo sustituyente que posee al menos un átomo en el anillo que no sea carbono, también conocido como un heteroátomo, que puede ser un átomo de nitrógeno, azufre u oxígeno. Cuando se especifique que un anillo posee cierto número de miembros, el número define el número de átomos del anillo sin hacer referencia a ningún sustituyente o átomos de hidrógeno enlazados a los átomos del anillo. Los heterociclos, anillos heterocíclicos y restos heterociclilo pueden incluir heteroátomos múltiples seleccionados de forma independiente entre un átomo de nitrógeno, azufre u oxígeno en el anillo. Los anillos pueden estar sustituidos en cualquier posición disponible. Por ejemplo, pero sin carácter limitante, los anillos de 6 y 7 miembros suelen estar sustituidos en la posición 4 del anillo y los anillos de 5 miembros suelen estar sustituidos en la posición 3, cuando el anillo está unido a la cadena de la amida peptídica en la posición 1.

El término "saturado" hace referencia a la ausencia de enlaces dobles o triples y el uso del término en relación con anillos describe anillos que no poseen enlaces dobles o triples dentro del anillo, pero no excluye la presencia de enlaces dobles o triples en sustituyentes enlazados al anillo. El término "no aromático" hace referencia en el contexto de un anillo particular a una ausencia de aromaticidad en tal anillo, pero no excluye la presencia de enlaces dobles dentro del anillo, incluidos enlaces dobles que forman parte de un anillo aromático fusionado al anillo aromático en cuestión. Tampoco se excluye que un átomo del anillo de un anillo sustituyente heterocíclico saturado se enlace por un doble enlace a un átomo que no pertenece al anillo, tal como, por ejemplo, un átomo de azufre del anillo se enlace por un doble enlace a un sustituyente con un átomo de oxígeno. Como se utilizan en la presente, heterociclos, anillos heterocíclicos y restos heterociclilo también incluyen anillos saturados, parcialmente insaturados y heteroaromáticos, y estructuras de anillos bicíclicos fusionados, a no ser que se especifique lo contrario. Un heterociclo, anillo heterocíclico o resto heterociclilo se puede fusionar a un segundo anillo, que puede ser un anillo saturado, parcialmente insaturado o aromático, dicho anillo puede ser un heterociclo o un carbociclo. Cuando se indique, dos sustituyentes se pueden tomar opcionalmente juntos para formar un anillo adicional. Los anillos pueden estar sustituidos en cualquier posición disponible. Un heterociclo, anillo heterocíclico y resto heterociclilo pueden, donde se indique, estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones del anillo por uno o más sustituyentes elegidos de forma independiente, como por ejemplo, C₁-C₆ alquilo, C₃-C₈ cicloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, halo C₁-C₆ alquilo, fenilo opcionalmente sustituido, arilo, heterociclilo, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. Los sustituyentes opcionales adecuados del sustituyente de fenilo incluyen, por ejemplo, pero sin carácter limitante, uno o más grupos seleccionados entre C₁-C₃ alquilo, C₁-C₃ alcoxi, halo C₁-C₃ alquilo, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino.

D-Phe y D-Phe sustituida son ejemplos de un aminoácido adecuado para el residuo Xaa₁ en la Fórmula I. El anillo fenilo puede estar sustituido en cualquiera de las posiciones 2, 3 y/o 4. Ejemplos particulares de sustituciones permitidas incluyen, por ejemplo, cloro o flúor en la posición 2 ó 4. Además, el carbono alfa puede estar metilado. También se pueden utilizar otros residuos equivalentes que representan cambios conservativos de D-Phe. Estos incluyen D-Ala(ciclohexilo), D-Ala(tienilo), D-Tyr y D-Tic. El residuo en la segunda posición, Xaa₂, también puede ser D-Phe o D-Phe sustituida, tales sustituciones incluyen un sustituyente en la posición del carbono 4 del anillo fenilo o en ambas posiciones 3 y 4. Como alternativa, Xaa₂ puede ser D-Trp, D-Tyr o D-alanina sustituidos por naftilo. El residuo en la tercera posición, Xaa₃, puede ser cualquier residuo aminoacídico apolar, como por ejemplo, D-Nle, D-Leu, (α-Me)D-Leu,

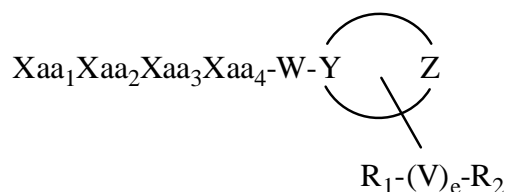
D-Hle, D-Met o D-Val. Sin embargo, D-Ala (ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo) o D-Phe se puede utilizar como Xaa₃. El residuo de la cuarta posición, Xaa₄, puede ser cualquier residuo aminoacídico cargado positivamente, como por ejemplo, D-Arg y D-Har, que puede estar opcionalmente sustituido por grupos alquilo inferior, tales como uno o dos grupos etilo. Como alternativa, se pueden utilizar D-Nar y cualesquiera otros residuos equivalentes, como por ejemplo, D-Lys o D-Orn (cualquiera de éstos puede estar alquilado en el grupo amino ω, por ejemplo, por grupos metilo o isopropilo, o metilado en el grupo carbono α). Además, D-Dbu, D-4-Amf (los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos por amidino) y D-Hlys son también aminoácidos adecuados en esta posición.

Los compuestos de la invención contienen uno o más centros quirales, cada uno de los cuales posee dos disposiciones espaciales posibles (configuraciones) de los cuatro sustituyentes que rodean al átomo de carbono central. Estos se conocen como *estereoisómeros* y más específicamente como *enantiómeros* (todos los centros quirales invertidos) o *diastereoisómeros* (dos o más centros quirales, al menos uno de los centros quirales permanece igual). En una realización específica de la invención, los aminoácidos que componen el esqueleto tetrapeptídico, Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄, se especifica que son D-aminoácidos, es decir, de configuración opuesta a la de los que se encuentran generalmente en mamíferos. La referencia a estereoisómeros de las amidas de péptidos sintéticos de la invención concierne a los centros quirales aparte de a los carbonos alfa de los D-aminoácidos que componen Xaa₁-Xaa₄. Así pues, los estereoisómeros de amidas de péptidos sintéticos que son realizaciones de la invención donde se especifica que cada Xaa₁-Xaa₄ son D-aminoácidos, no incluye L-aminoácidos o mezclas racémicas de los aminoácidos en estas posiciones. De forma análoga, la referencia a los racematos en la presente concierne a un centro aparte de a los carbonos alfa de D-aminoácidos que componen Xaa₁-Xaa₄. Los centros quirales en las amidas de péptidos sintéticos de la invención para las cuales un estereoisómero puede tomar la configuración R o S incluyen los centros quirales del resto enlazado al carboxi terminal de Xaa₄ y también los centros quirales de cualquier sustituyente de las cadenas laterales aminoacídicas de Xaa₁-Xaa₄.

Las amidas de péptidos sintéticos de la invención descritas en la presente (referidas también de forma intercambiable como compuestos de amidas de péptidos sintéticos, compuestos de la invención, Compuesto (número) o simplemente "los compuestos") se pueden utilizar o preparar de formas alternativas. Por ejemplo, muchos compuestos que contienen grupos amino se puede utilizar o preparar como una sal de ácido. A menudo, tales sales mejoran las propiedades de aislamiento y manipulación del compuesto. Por ejemplo, según los reactivos, las condiciones de reacción y análogos, se pueden utilizar o preparar compuestos tales como las amidas de péptidos sintéticos descritas en la presente, por ejemplo, como las sales clorhídricas o de tosilato. Las formas cristalinas isomórficas, todas las formas quirales y racémicas, N-óxidos, hidratos, solvatos e hidratos de sales de ácidos, también se contemplan dentro del ámbito de la presente invención.

Ciertas amidas ácidas o básicas de péptidos sintéticos de la presente invención pueden existir como zwitteriones. Todas las formas de estos compuestos de amidas sintéticas, incluidas como base libre, ácido libre y zwitteriones, se contemplan dentro del ámbito de la presente invención. Se sabe con certeza en la materia que los compuestos que contienen tanto grupos amino como carboxilo suelen existir en equilibrio con sus formas zwitteriónicas. Por lo tanto, para cualquier compuesto descrito en la presente que contenga, por ejemplo, tanto grupos amino como carboxilo, se sobreentenderá que incluye el zwitterión correspondiente.

En ciertas realizaciones las amidas de péptidos sintéticos de la invención se ajustan a la Fórmula I:



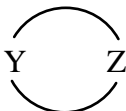
Fórmula I

En tales realizaciones, Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄ es un resto tetrapeptídico donde Xaa₁ es el aminoácido en el amino terminal, que puede ser (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic, D-tert-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina o β-(E)D-Ala, donde cada (A) y cada (A') son sustituyentes de anillo fenilo seleccionados de forma independiente entre -H, -F, -Cl, -NO₂, -CH₃, -CF₃, -CN y -CONH₂, y (E) se selecciona entre cualquiera de ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, tienilo, piridilo o tiazolilo. El segundo aminoácido en la cadena tetrapeptídica, Xaa₂, puede ser cualquiera de (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala o D-Trp. El tercer aminoácido en la cadena tetrapeptídica, Xaa₃, puede ser D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Val o D-Met. El cuarto aminoácido en la cadena tetrapeptídica, Xaa₄, puede ser cualquiera de los siguientes: (B)₂D-Arg, (B)₂D-Nar, (B)₂D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-(B)₂D-Dbu, δ-(B)₂α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3-(4-piperidil)propiónico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiónico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiónico, ácido α-amino-4-piperidinacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido trans-α-amino-4-metilamino ciclohexanoacético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético o ácido

trans- α -amino-4-guanidinociclohexanoacético, donde cada (B) se puede elegir de forma separada entre -H y un C₁-C₄ alquilo, y (B') puede ser -H o un grupo (α -Me).

En ciertas realizaciones de la invención, el grupo conector W opcional está ausente (es decir, nulo), siempre que en tal caso Y sea N. En otras realizaciones, W es -N-(CH₂)_b con b igual a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otras realizaciones más, W es -N-(CH₂)_c-O- con c igual a 2 ó 3, siempre que en tales realizaciones Y sea C.

En realizaciones particulares de la invención, el resto



en la Fórmula I es un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros opcionalmente sustituido, donde todos los heteroátomos del anillo en el anillo sustituyente son N, y donde Y y Z son cada uno de forma independiente C o N, y no son átomos adyacentes. En tales realizaciones, cuando este anillo heterocíclico sustituyente es un anillo de seis, siete u ocho miembros, los átomos Y y Z del anillo están separados por al menos otros dos átomos del anillo. En tales realizaciones, cuando este anillo heterocíclico sustituyente posea un único heteroátomo en el anillo que sea N, el anillo sustituyente será no aromático.

En ciertas realizaciones particulares de la invención, un resto conector, V está directamente unido al anillo que contiene Y y Z. V es un C₁-C₆ alquilo que puede estar sustituido por los grupos R₁ y R₂. El sustituyente R₁ puede ser cualquiera de -H, -OH, halo, -CF₃, -NH₂, -COOH, C₁-C₆ alquilo, amidino, amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, arilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, -CONH₂, -COR', -SO₂R', -CONR'R'', -NHCOR', OR' o -SO₂NR'R''. El heterociclilo opcionalmente sustituido puede estar sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. Los restos R' y R'' son cada uno de forma independiente H, C₁-C₈ alquilo, arilo o heterociclilo. Como alternativa, R' y R'' se combinan para formar un anillo de 4 a 8 miembros, dicho anillo está opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino. El sustituyente R₂ puede ser cualquiera de -H, amidino, amidino sustituido de forma única o doble por C₁-C₆ alquilo, -CN, -CONH₂, -CONR'R'', -NHCOR', -SO₂NR'R'' o -COOH.

En otras realizaciones particulares, V no está presente y los grupos sustituyentes R₁ y R₂ están directamente enlazados al mismo o a diferentes átomos del anillo del anillo heterocíclico que contiene Y y Z.

En un aspecto alternativo de ciertas realizaciones, los restos R₁ y R₂ juntos pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido que está enlazado a un único átomo del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z. En una realización particular, los restos R₁ y R₂ forman un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido que está enlazado directamente a un único átomo del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z.

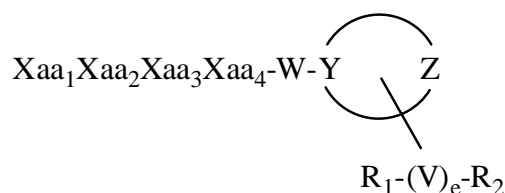
En un segundo aspecto alternativo de ciertas realizaciones, los restos R₁ y R₂ junto con un único átomo del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros para formar una estructura espiro.

En un tercer aspecto alternativo de ciertas realizaciones, los restos R₁ y R₂ junto con dos o más átomos del anillo adyacentes del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido fusionado con el anillo sustituyente que contiene Y y Z.

En realizaciones particulares, cada uno de los anillos heterocíclicos sustituyentes de 4, 5, 6, 7, 8 y 9 miembros opcionalmente sustituidos que comprenden R₁ y R₂ puede estar sustituidos de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente entre C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, fenilo opcionalmente sustituido, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino.

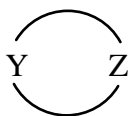
En ciertas realizaciones particulares, cuando el anillo sustituyente que contiene Y y Z es un anillo de seis o siete miembros que incluye un único heteroátomo en el anillo, y cuando uno de Y y Z sea C y el otro sea N, y e sea cero, entonces R₁ no será -OH, y R₁ y R₂ no serán a la vez -H. Además, cuando el anillo sustituyente que contiene Y y Z sea un anillo de seis miembros en el cual existan dos heteroátomos en el anillo donde tanto Y como Z sean N y W sea nulo, entonces el resto -(V)_eR₁R₂ estará enlazado a un anillo del átomo que no sea Z. Es más, si e es cero, entonces R₁ y R₂ no pueden ser a la vez -H. Por último, cuando Xaa₃ sea D-Nle, entonces Xaa₄ no podrá ser (B)₂D-Arg; y cuando Xaa₃ sea D-Leu o (α Me)D-Leu, entonces Xaa₄ no podrá ser δ -(B)₂ α -(B')D-Orn.

En ciertas realizaciones, la presente invención estipula también una amida de péptido sintético de fórmula:



o un estereoisómero, racemato, sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, hidrato de sal de ácido, N-óxido o forma isomórfica cristalina de ésta; donde Xaa₁ se selecciona del grupo que consiste en (A)(A')D-Phe, (α-Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic, D-fenilglicina, D-homofenilalanina y β-(E)D-Ala, donde (A) y (A') son cada uno sustituyentes de anillo fenilo seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en -H, -F, -Cl, -NO₂, -CH₃, -CF₃, -CN y -CONH₂, y donde (E) se selecciona del grupo que consiste en ciclobutilo, ciclohexilo, ciclohexilo, piridilo, tienilo y tiazolilo; Xaa₂ se selecciona del grupo que consiste en (A)(A')D-Phe, (α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala y D-Trp; Xaa₃ se selecciona del grupo que consiste en D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Val y D-Met; Xaa₄ se selecciona del grupo que consiste en (B)₂D-Arg, (B)₂D-nArg, (B)₂D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-(B)₂D-Dbu, δ-(B)₂α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiónico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiónico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiónico, ácido (R)-α-amino-4-piperidinacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético y ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético, donde cada (B) se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en H y C₁-C₄ alquilo, y (B') es H o (α-Me). El grupo W se selecciona del grupo que consiste en:

nulo, siempre que cuando W sea nulo, Y será N;
 -N-(CH₂)_b- con b igual a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; y
 -N-(CH₂)_c-O- con c igual a 2 ó 3, siempre que Y sea C;
 y el resto



es un anillo sustituyente heterocíclico de 4-8 miembros saturado opcionalmente sustituido que contiene uno o dos átomos de nitrógeno, en el cual ningún átomo del anillo aparte de Y y Z es un heteroátomo, Y es C o N, Z es C o N, y al menos uno de Y y Z es N, y siempre que, en el caso de un anillo heterocíclico de 4 ó 5 miembros, Y o Z sea C, y en el caso de un heterociclo que contiene dos átomos de nitrógeno, Y y Z estén separados por uno o más átomos de carbono;

V es C₁-C₆ alquilo, y e es 0 ó 1, donde cuando e sea 0, entonces V será nulo, y R₁ y R₂ están unidos directamente al mismo o a diferentes átomos del anillo;

R₁ es H, OH, -NH₂, -COOH, C₁-C₆ alquilo, amidino, amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, dihidroimidazol, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, -CONH₂, -CONR'R'', -NHCOR', -OR o -SO₂NR'R'', donde R' y R'' son cada uno de forma independiente H o C₁-C₈ alquilo, o R' y R'' se combinan para formar un anillo de 4 a 8 miembros, dicho anillo está opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente del grupo que consiste en C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN y -COOH, amidino; y R₂ es H, amidino, amidino sustituido de forma única o doble por C₁-C₆ alquilo, -CN, -CONH₂, -CONR'R'', -NHCOR', -SO₂NR'R'' o -COOH.

siempre que cuando el resto de anillo que contiene Y y Z sea un anillo de seis o siete miembros y cuando uno de Y y Z sea C y e sea cero, entonces R₁ no será OH, y R₁ y R₂ no serán a la vez H; siempre que cuando el resto de anillo que contiene Y y Z sea un anillo de seis miembros, tanto Y como Z sean N y W sea nulo, entonces -(V)_eR₁R₂ estará enlazado a un átomo del anillo aparte de Z; y cuando e es cero, entonces R₁ y R₂ no serán ambos -H; y por último, siempre que cuando Xaa₃ sea D-Nle, entonces Xaa₄ no podrá ser (B)₂D-Arg, y cuando Xaa₃ sea D-Leu o (αMe)D-Leu, entonces Xaa₄ no podrá ser δ-(B)₂α-(B')D-Orn;

En una realización, la presente invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde Xaa₁Xaa₂ es D-Phe-D-Phe, Xaa₃ es D-Leu o D-Nle y Xaa₄ se elige entre (B)₂D-Arg, D-Lys, (B)₂D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-(B)₂D-Dbu y δ-(B)₂α-(B')D-Orn. En un aspecto particular de la realización anterior, Xaa₄ se elige entre D-Lys, (B)₂D-Har, ε-(B)D-Lys y ε-(B)₂-D-Lys.

En otra realización, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde W es nulo, Y es N y Z es C. En un aspecto particular de la realización anterior, el anillo sustituyente que contiene Y y Z es un anillo saturado de seis miembros que comprende un único heteroátomo en el anillo.

En otra realización, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde Y y Z son ambos N, y son los únicos heteroátomos del anillo en el anillo sustituyente que contiene Y y Z.

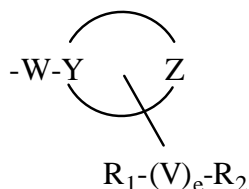
En otra realización, cuando el resto de anillo que contiene Y y Z sea un anillo de seis miembros saturado que incluye dos heteroátomos y W sea nulo, entonces Z será un átomo de carbono.

5 En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde R_1 y R_2 junto con cero, uno o dos átomos del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z comprenden un anillo sustituyente heterocíclico monocíclico o bicíclico de 4-9 miembros. En un aspecto particular de la realización anterior, R_1 y R_2 junto con un átomo del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z comprenden un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros el cual forma con el anillo sustituyente que contiene Y y Z una estructura espiro y W es nulo.

10 En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde e es cero, y R_1 y R_2 están enlazados directamente al mismo átomo del anillo.

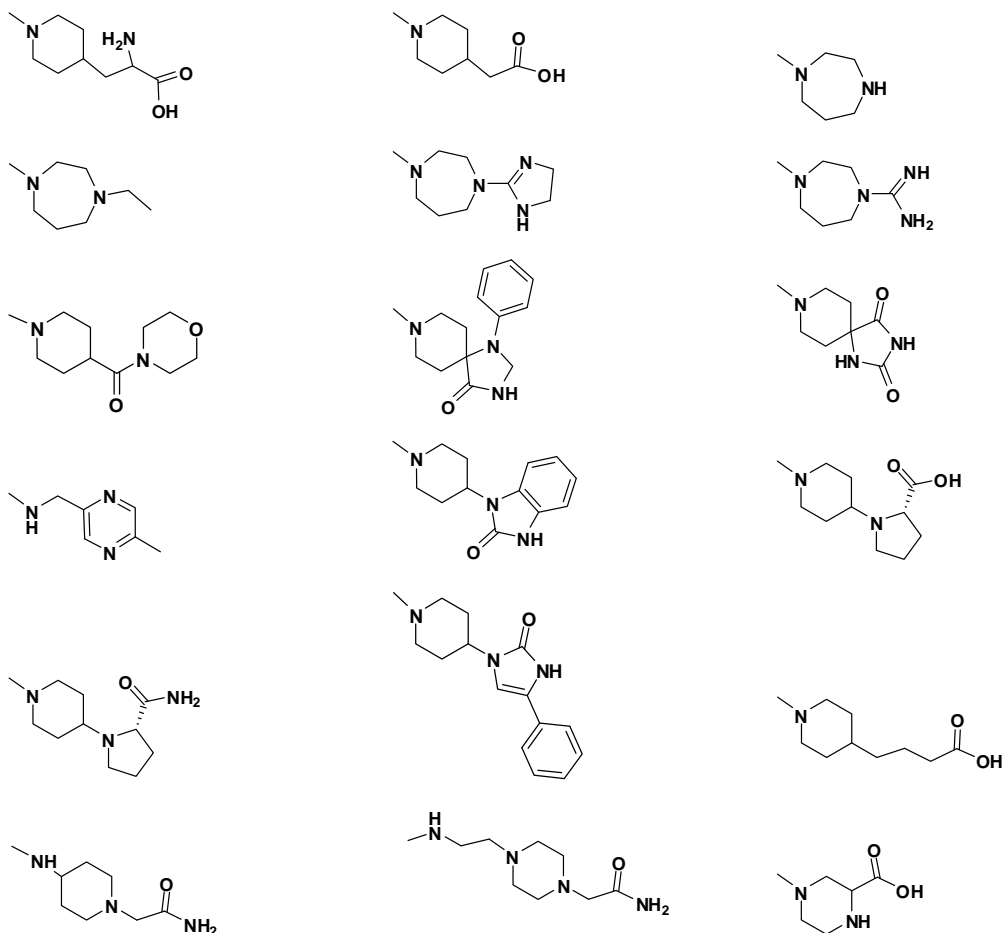
En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, donde R_1 es H, OH, $-NH_2$, $-COOH$, $-CH_2COOH$, C_1-C_3 alquilo, amidino, amidino sustituido por C_1-C_3 alquilo, dihidroimidazol, D-Pro, D-Pro-amida o $CONH_2$ y donde R_2 es H, $COOH$ o C_1-C_3 alquilo.

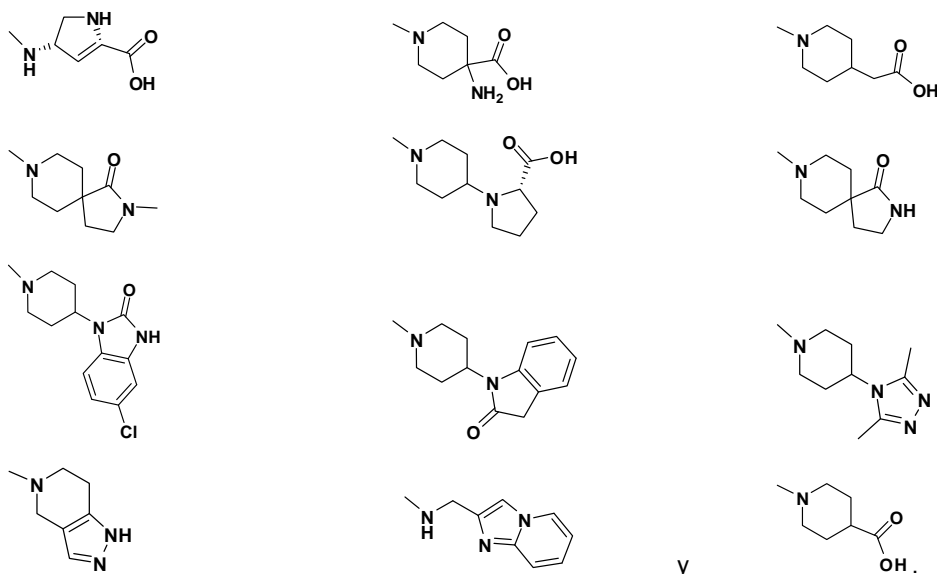
15 En otra realización, la presente invención estipula una amida de péptido sintético de Fórmula I, donde el resto:



se selecciona del grupo que consiste en:

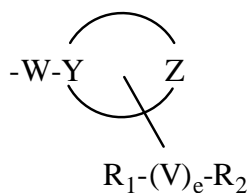
20





y

5 En otra realización más, la presente invención estipula una amida de péptido sintético de Fórmula I, donde el resto:



no es ni un resto prolina, ni un resto prolina sustituido, ni tampoco un resto prolina donde R₁ o R₂ contiene un resto amida.

10 En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de Fórmula I, donde se estipula que cuando W sea nulo, el anillo sustituyente que contiene Y y Z sea un anillo saturado de 5 miembros con únicamente un heteroátomo en el anillo, e sea cero y R₁ o R₂ esté enlazado a un carbono del anillo adyacente a Y, entonces R₁ se seleccionará del grupo que consiste en -H, -OH, halo, -CF₃, -NH₂, C₁-C₆ alquilo, amidino, amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, arilo, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, CN, -SO₂R', -NHCOR', -OR' y -SO₂NR'R'', y R₂ se seleccionará del grupo que consiste en -H, amidino, amidino sustituido de forma única o doble por C₁-C₆ alquilo, -CN, -NHCOR' y -SO₂NR'R''.

15 En otra realización más, la presente invención estipula una amida de péptido sintético de Fórmula I que posee una CE₅₀ de menos de aproximadamente 500 nM para un receptor opioide kappa. En un aspecto particular, la amida de péptido sintético tiene una CE₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM para un receptor opioide kappa. En un aspecto más particular, la amida de péptido sintético tiene una CE₅₀ de menos de aproximadamente 20 nM para un receptor opioide kappa. En el aspecto más particular, la amida de péptido sintético tiene una CE₅₀ de menos de aproximadamente 1 nM para un receptor opioide kappa. Los compuestos de la realización anterior pueden tener un CE₅₀ que es al menos 10 veces mayor para un receptor opioide mu y para uno delta que para un receptor opioide kappa, preferentemente al menos 100 veces mayor, y más preferentemente al menos 1000 veces mayor (p. ej., una CE₅₀ de menos de aproximadamente 1 nM para un receptor opioide kappa y valores de CE₅₀ mayores de 1000 nM para un receptor opioide mu y para un receptor opioide delta).

20 En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, la cual en una concentración eficaz no exhibe más de aproximadamente el 50% de inhibición de cualquiera de las P₄₅₀ CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 o CYP 2D6 por parte de la amida de péptido sintético en una concentración de 10 uM tras 60 minutos de incubación con microsomas hepáticos humanos.

25 En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I, la cual en una dosis de aproximadamente 3 mg/kg en ratas alcanza una concentración en plasma máxima de la amida de péptido sintético que es al menos aproximadamente cinco veces mayor que la concentración máxima en el cerebro. En un aspecto particular de la realización anterior, la amida de péptido sintético posee una DE₅₀ para un efecto sedativo en un ensayo de reducción de locomoción en un ratón al menos de aproximadamente diez veces la DE₅₀ de la amida de péptido sintético para un efecto analgésico en un ensayo de constricción abdominal en un ratón.

En otra realización más, la invención estipula una amida de péptido sintético de la Fórmula I que presenta al menos aproximadamente el 50% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de una dosis de aproximadamente 3 mg/kg de la amida de péptido sintético en una rata.

5 En una realización, la invención estipula una composición farmacéutica que incluye una amida de péptido sintético de la Fórmula I y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención estipula un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero; el método incluye administrar al mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de acuerdo con la Fórmula I suficiente para tratar o prevenir la enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa.

10 Se pueden emplear varios ensayos para evaluar si las amidas de péptidos sintéticos de la invención exhiben alta afinidad y selectividad para el receptor opioide kappa, bioactividad *in vivo* de duración prolongada y carencia de efectos secundarios en el SNC. Los ensayos para receptores son de uso común en el campo y se han clonado varios receptores opioides kappa de diferentes especies, así como receptores opioides mu y delta. Tanto los receptores opioides kappa como los receptores opioides mu y delta son receptores clásicos acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. Aunque estos receptores clonados permiten el cribado de un compuesto candidato particular, p. ej., un péptido o derivado peptídico, las fuentes naturales de receptores opioides de mamíferos son útiles para el cribado, como se documenta en el campo (Dooley CT *et al.* Selective ligands for the mu, delta, and kappa opioid receptors identified from a single mixture based tetrapeptide positional scanning combinatorial library. *J. Biol. Chem.* 273:18848-56, 1998). Por lo tanto, el cribado frente a receptores opioides kappa y mu, de origen natural o recombinante, se puede llevar a cabo para determinar la selectividad de las amidas de péptidos sintéticos de la invención por receptores opioides kappa en comparación con receptores opioides mu.

25 En una realización particular, las amidas de péptidos sintéticos de la invención son agonistas selectivos de receptores opioides kappa. La potencia de las amidas de péptidos sintéticos de la invención como agonistas para un receptor particular se puede medir como una concentración para la cual se consigue la mitad del efecto máximo expresada como un valor de CE₅₀. Se puede determinar la potencia de las amidas de péptidos sintéticos de la invención como agonistas opioides kappa, expresada como el porcentaje de efecto máximo observable, mediante varios métodos de uso común en el campo. Véanse, por ejemplo, Endoh T *et al.*, 1999, Potent Antinociceptive Effects of TRK-820, a Novel κ-Opioid Receptor Agonist, *Life Sci.* 65 (16) 1685-94; y Kumar V *et al.*, Synthesis and Evaluation of Novel Peripherally Restricted κ-Opioid Receptor Agonists, 2005 *Bioorg Med Chem Letts* 15: 1091-1095.

30 A continuación se proporcionan ejemplos de tales técnicas de ensayo para la determinación de los valores de CE₅₀. Los expertos en la materia estarán familiarizados con muchos métodos de ensayo estándares para la caracterización de ligandos. Véanse, por ejemplo, Waldhoer *et al.*, (2004) *Ann. Rev. Biochem.* 73:953-990, Satoh & Minami (1995) *Pharmac. Ther.* 68(3):343-364 y las referencias citadas en estos.

35 En ciertas realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención son agonistas de receptores opioides kappa con un CE₅₀ de menos de aproximadamente 500 nM. En otras realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos tienen un CE₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM como agonistas de receptores opioides kappa. En otras realizaciones más, las amidas de péptidos sintéticos tienen un CE₅₀ de menos de aproximadamente 10 nM como agonistas de receptores opioides kappa. En realizaciones particulares las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen un CE₅₀ de menos de aproximadamente 1.0 nM, menos de aproximadamente 0.1 nM, o menos de aproximadamente 0.1 nM, o incluso menos de aproximadamente 0.01 nM como agonistas de receptores opioides kappa.

40 En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención son muy selectivas para receptores kappa en comparación con receptores opioides mu. En ciertas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen valores de CE₅₀ para el receptor opioide mu que son al menos aproximadamente cien veces mayores que los valores de CE₅₀ correspondientes para el receptor opioide kappa. En ciertas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen valores de CE₅₀ para el receptor opioide mu que son al menos aproximadamente mil veces mayores que los valores de CE₅₀ correspondientes para el receptor opioide kappa. Como alternativa, la selectividad de las amidas de péptidos sintéticos de la invención se puede expresar como una CE₅₀ mayor para un receptor opioide mu que para un receptor opioide kappa. Por lo tanto, en realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen valores de CE₅₀ mayores de aproximadamente 10 uM para el receptor opioide mu y valores de CE₅₀ de menos de aproximadamente 10 nM y, en otras realizaciones, de menos de aproximadamente 1.0 nM o incluso de menos de aproximadamente 0.01nM para el receptor opioide kappa. En otra realización, la amida de péptido sintético particular puede tener una CE₅₀ de menos de aproximadamente 1 nM para un receptor opioide kappa y una CE₅₀ mayor de aproximadamente 1000 nM para un receptor opioide mu y para un receptor opioide delta.

55 Otra propiedad de las amidas de péptidos sintéticos de la invención es su propiedad característica de baja inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀. Las isoenzimas citocromo P₄₅₀ constituyen una extensa familia de proteínas hemo-tiolato responsables de la inactivación oxidativa metabólica de muchos compuestos terapéuticos y de otros bioactivos. Normalmente, actúan como oxidasas terminales en cadenas de transferencia de electrones multicomponentes, también conocidas como sistemas de monooxigenasas que contienen citocromos P₄₅₀.

Más de cincuenta isoenzimas citocromo P₄₅₀ diferentes han sido identificadas y se han clasificado en familias agrupadas según su conexión genética tal como se determinó por homología de secuencias de ácidos nucleicos. Las isoenzimas más abundantes entre las isoenzimas citocromo P₄₅₀ en células humanas son las isoenzimas 1A2 y 3A4, aunque las isoenzimas 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 y 2E1 también contribuyen significativamente a la inactivación oxidativa de los compuestos terapéuticos administrados. A pesar de que la inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ puede ser útil en la prolongación del tiempo tras la administración *in vivo* durante el cual se mantiene una concentración eficaz de las amidas de péptidos sintéticos de la invención, también prolonga la persistencia de cualquier compuesto terapéutico administrado conjuntamente que esté sujeto a oxidación por parte de citocromos P₄₅₀. Este aumento en la persistencia puede hacer que el compuesto terapéutico administrado conjuntamente persista pasado el periodo óptimo para la terapia, o puede hacer que la concentración *in vivo* exceda los niveles deseados o tolerados de forma segura. Tales aumentos en la persistencia y/o en la concentración son difíciles de cuantificar con precisión y preferentemente se evitarán. Los compuestos terapéuticos que muestran poca o ninguna inhibición de la actividad de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ no presentan este problema potencial y se pueden administrar de forma más segura junto con otros compuestos terapéuticos sin riesgo de afectar a la velocidad de inactivación del compuesto terapéutico administrado conjuntamente por parte de las isoenzimas citocromo P₄₅₀.

Algunas realizaciones particulares de las amidas de péptidos sintéticos de la invención muestran una baja inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ en concentraciones terapéuticas de las amidas de péptidos sintéticos, mientras que otras esencialmente no muestran ninguna inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ en concentraciones terapéuticas. En algunas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos en concentraciones de 10 uM muestran menos de aproximadamente el 50% de inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 o CYP2D6. En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos en concentraciones de 10 uM muestran menos de aproximadamente el 20% de inhibición de cualquiera de estas isoenzimas citocromo P₄₅₀. En realizaciones muy particulares, las amidas de péptidos sintéticos en concentraciones de 10 uM muestran menos de aproximadamente el 10% de inhibición de cualquiera de estas isoenzimas citocromo P₄₅₀.

En otra realización, las amidas de péptidos sintéticos de la invención en una concentración eficaz no exhiben más de aproximadamente el 50% de inhibición de cualquiera de los citocromos P₄₅₀ CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 o CYP 2D6 por parte de las amidas de péptidos sintéticos en concentraciones de 10 uM tras 60 minutos de incubación con microsomas hepáticos humanos.

Cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un paciente mamífero o humano en una concentración terapéuticamente eficaz, exhiben una penetración baja o esencialmente nula a través de la barrera hematoencefálica. Los receptores opioides kappa (a los que se hace referencia de aquí en adelante de forma intercambiable como receptores kappa) están distribuidos en tejidos periféricos, incluida la piel y los tejidos somáticos, así como también en las vísceras en humanos y en otros mamíferos. Los receptores kappa también se localizan en el cerebro. La activación de los receptores kappa en tejidos periféricos produce la supresión de dolor y de respuestas inflamatorias, mientras que la activación de los receptores kappa en el cerebro produce efectos sedativos y puede originar fuerte disforia y alucinaciones. En ciertas realizaciones, cuando la amida de péptido sintético de la invención se administra en una concentración terapéuticamente eficaz, exhibe una penetración baja o esencialmente nula a través de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, minimiza o incluso obvia completamente los efectos sedativos alucinógenos de muchos otros agonistas kappa que muestran alguna penetración a través de la barrera hematoencefálica.

Una medida útil del grado en que las amidas de péptidos sintéticos de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica es la proporción de la concentración en plasma máxima respecto a la concentración en tejido cerebral. En realizaciones particulares, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran en una dosis de aproximadamente 3 mg/kg, éstas exhiben una concentración de las amidas de péptidos sintéticos al menos aproximadamente cinco veces menor en el cerebro que en el plasma en el momento en que se alcance la concentración en plasma máxima.

Otra medida útil del grado en que las amidas de péptidos sintéticos de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica es la relación de la dosis requerida para conseguir un efecto sedativo y la dosis requerida para conseguir un efecto analgésico. Los efectos analgésicos y sedativos de la estimulación de receptores kappa por parte de agonistas de receptores kappa se pueden medir mediante ensayos estándares con los cuales estarán familiarizados los expertos en la materia.

En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una DE₅₀ para un efecto sedativo que es al menos aproximadamente diez veces la DE₅₀ para un efecto analgésico. En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una DE₅₀ para un efecto sedativo que es al menos aproximadamente treinta veces la DE₅₀ para un efecto analgésico. En otras realizaciones particulares más, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una DE₅₀ para un efecto sedativo que es al menos aproximadamente cincuenta veces la DE₅₀ para un efecto analgésico.

En otra realización, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una DE₅₀ para un efecto sedativo en un ensayo de reducción de locomoción en un ratón al menos de aproximadamente diez veces la DE₅₀ de la amida de péptido sintético para un efecto analgésico en un ensayo de constricción abdominal en un ratón.

Otro factor útil para pronosticar el grado en que se esperaría que las amidas de péptidos de la invención atravesasen la barrera hematoencefálica viene dado por los valores de permeabilidad membranal a las amidas de péptidos sintéticos en una célula humana o en otra célula de un mamífero cuando se suministran en una concentración terapéutica relevante. En ciertas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos de la invención exhiben a concentraciones terapéuticamente relevantes una capacidad baja o esencialmente nula de penetración en una monocapa de células debidamente cultivadas humanas o de otros mamíferos. Este parámetro de permeabilidad se puede expresar como una permeabilidad aparente, P_{app} , que representa la permeabilidad de la monocapa celular particular a un compuesto de interés. Se puede utilizar cualquier monocapa celular cultivable de mamífero adecuada para determinar su permeabilidad a un compuesto particular de interés, aunque se suelen utilizar con frecuencia ciertas líneas celulares para este propósito. Por ejemplo, la línea celular Caco-2 es un adenocarcinoma de colon humano que se puede utilizar como un sistema de análisis de un cultivo monocapa para la determinación de la permeabilidad membranal a compuestos de la invención. En ciertas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una P_{app} de menos de aproximadamente 10^{-6} cm/sec. En otras ciertas realizaciones, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen una P_{app} de menos de aproximadamente 10^{-7} cm/sec.

En una realización, las amidas de péptidos sintéticos de la invención en una dosis de 3 mg/kg en ratas alcanzan una concentración en plasma máxima de la amida de péptido sintético y exhiben una concentración al menos cinco veces menor en el cerebro que dicha concentración en plasma máxima.

En otra realización, las amidas de péptidos sintéticos de la invención tienen al menos aproximadamente el 50% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de una dosis de aproximadamente 3 mg/kg de la amida de péptido sintético en una rata.

En una realización, la amida de péptidos sintético de la invención exhibe una acción de duración prolongada en un mamífero, tal como un ser humano. En un aspecto, la amida de péptido sintético tiene una acción de una duración que es al menos aproximadamente el 50% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de 0.1 mg/kg de la amida de péptido sintético. En otro aspecto, la amida de péptido sintético tiene una acción de una duración que es al menos aproximadamente el 75% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de 0.1 mg/kg de la amida de péptido sintético. En un aspecto particular, la amida de péptido sintético tiene una acción de una duración que es al menos aproximadamente el 90% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de 0.1 mg/kg de la amida de péptido sintético. En un específico particular, la amida de péptido sintético tiene una acción de una duración que es al menos aproximadamente el 95% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración de 0.1 mg/kg de la amida de péptido sintético.

En otra realización, la invención estipula una composición farmacéutica que incluye una amida de péptido sintético de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. La invención estipula métodos, composiciones o formas de dosificación que emplean y/o contienen amidas de péptidos sintéticos de la invención que son selectivas para el receptor opioide kappa. En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención exhiben una fuerte afinidad por el receptor opioide kappa y tienen una gran potencia como agonistas de receptores opioides kappa.

Un profármaco de un compuesto tal como las amidas de péptidos sintéticos de la invención incluye derivados farmacéuticamente aceptables los cuales tras ser administrados se pueden convertir por acción del metabolismo u otros procesos en una forma del compuesto biológicamente activa. Los profármacos son particularmente deseables en los casos en que el profármaco tiene propiedades más favorables que el compuesto activo en lo referente a biodisponibilidad, estabilidad o idoneidad para una formulación particular.

Como se utiliza en la presente, una enfermedad, afección o trastorno asociado con receptores opioides kappa, es cualquier enfermedad, afección o trastorno que se puede prevenir o tratar mediante la activación de un receptor opioide kappa. En un aspecto, las amidas de péptidos sintéticos de la invención son agonistas de receptores opioides kappa que activan al receptor opioide kappa. En algunas realizaciones, un médico puede elegir una dosis y vía de administración particulares de la amida de péptido sintético de la invención para prevenir o curar completamente la enfermedad, afección o trastorno. En otras realizaciones, una dosis y vía de administración particulares de la amida de péptido sintético de la invención elegidas por el médico alivian o reducen uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno.

Como se utiliza en la presente, "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" de la amida de péptido sintético de la invención hace referencia a una cantidad del compuesto como se describe en la presente que puede ser terapéuticamente eficaz para inhibir, prevenir o tratar un síntoma de una enfermedad, trastorno, afección o efecto secundario particular. Como se utiliza en la presente, una "dosis reducida" de un compuesto analgésico agonista opioide mu hace referencia a una dosis que cuando se usa en combinación con un agonista opioide kappa, tal como una amida de péptido sintético de la invención, es menor de la que normalmente se suministraría a un paciente particular, con el propósito de reducir uno o más efectos secundarios del compuesto. Se puede elegir la reducción de la dosis de forma que la disminución del efecto analgésico o de otro efecto terapéutico del compuesto sea un arreglo aceptable en vista del/de los efecto/s secundario/s reducido/s, cuando dicha disminución de dichos efectos analgésicos o de otros efectos terapéuticos del analgésico agonista opioide mu esté completamente, o al menos parcialmente, y más preferentemente completamente compensada por el efecto analgésico o por otro efecto terapéutico de una amida de péptido sintético de la invención. La administración de un compuesto analgésico agonista opioide mu junto con una amida de péptido sintético de la invención que actúa

como agonista opioide kappa también permite la incorporación de una dosis reducida de la amida de péptido sintético y/o del compuesto analgésico agonista opioide mu para conseguir el mismo efecto terapéutico que una dosis de la amida de péptido sintético o del compuesto analgésico agonista opioide mu si se administra solo.

5 Como se utiliza en la presente, "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para el contacto con tejidos de seres humanos y de animales sin producir toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones, proporcionales a una relación beneficio-riesgo que sea razonable para la afección a tratar.

10 Como se utiliza en la presente, "dosis unitaria" hace referencia a una unidad físicamente discreta presentada en dosis unitarias para un individuo o afección a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto/s activo/s de amida de péptido sintético calculada para producir el/los efecto/s deseado/s, asociado/s opcionalmente con un portador farmacéutico. La especificación para las formas de dosificación unitarias puede venir dictada por (a) las características únicas del/de los compuesto/s activo/s y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de síntesis de tal/es compuesto/s activo/s. La unidad de dosificación se expresa como el peso del compuesto por unidad de peso corporal, por ejemplo, en miligramos de compuesto por kilogramos de peso corporal del sujeto o paciente (mg/kg). Como alternativa, la dosis se puede expresar como la cantidad de compuesto por unidad de peso corporal por unidad de tiempo (mg/kg/día) en un régimen de dosificación particular. Como otras alternativas, la dosis se puede expresar como la cantidad de compuesto por unidad de área superficial corporal (mg/m²) o por unidad de área superficial corporal por unidad de tiempo (mg/m²/día). Para formulaciones tópicas, la dosis se puede expresar de modo convencional para tal formulación, p. ej., una tira de media pulgada de pomada aplicada al ojo, donde la concentración de compuesto en la formulación se expresa como un porcentaje de la formulación.

20 Como se utiliza en la presente, "sales farmacéuticamente aceptables" hace referencia a derivados de compuestos en los cuales el compuesto de partida se modifica mediante la síntesis de sales de ácidos o de bases de este. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos o minerales de residuos básicos, tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos y análogos. 25 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto de partida obtenidas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, tales sales atóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y análogos; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos, tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, 30 hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y análogos. Estas sales fisiológicamente aceptables se preparan mediante métodos de uso común en la materia, p. ej., al disolver bases que contienen aminas libres con un exceso del ácido en alcohol acuoso, o al neutralizar un ácido carboxílico libre con una base metálica alcalina, tal como un hidróxido, o con una amina. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable de una amida de péptido sintético se puede formar a 35 partir de cualquier amida peptídica de este tipo que posea grupos funcionales ácidos, básicos o ambos. Por ejemplo, una amida peptídica que posea un grupo ácido carboxílico puede formar un anión carboxilato apareado con un catión, tal como un catión de sodio o potasio, en presencia de una base farmacéuticamente adecuada. De forma análoga, una amida que posea un grupo funcional amina puede formar una sal en presencia de un ácido farmacéuticamente adecuado tal como HCl.

40 Un ejemplo de un solvato farmacéuticamente aceptable de una amida de péptido sintético es una combinación de una amida peptídica con moléculas de solvente, lo cual da lugar a un complejo de tales moléculas de solvente asociadas con la amida peptídica. Son hidratos particularmente adecuados de los compuestos aquellos que poseen actividad comparable o aquellos que se reconvierten en el compuesto activo tras la administración. Un N-óxido farmacéuticamente 45 aceptable de una amida de péptido sintético que contiene una amina es aquel compuesto en el que el átomo de nitrógeno de la amina está enlazado a un átomo de oxígeno.

Una forma cristalina, isomórfica cristalina o amorfa farmacéuticamente aceptable de una amida de péptido sintético de la invención puede ser cualquier forma cristalina o no cristalina de una forma ácida, básica, zwitteriónica, sal o hidrato farmacéuticamente aceptables, o cualquier otra forma fisiológicamente compatible, estable y adecuada de la amida de péptido sintético de acuerdo con la invención.

50 Las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas. Las composiciones pueden incluir una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético en un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Los excipientes, portadores y/o diluyentes convencionales para usar en composiciones farmacéuticas son generalmente inertes y constituyen el grueso de la preparación.

55 En una realización particular, la amida de péptido sintético es un agonista de receptores opioides kappa. En otra realización, la amida de péptido sintético es un agonista selectivo de receptores opioides kappa. El objetivo puede ser un receptor kappa en el paciente o sujeto que requiere tal tratamiento o prevención. Ciertas amidas de péptidos sintéticos agonistas de receptores opioides kappa de la invención actúan de forma periférica y muestran poco o ningún efecto sobre el SNC en dosis terapéuticamente eficaces.

El excipiente o portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier sustancia atóxica compatible adecuada como vehículo para suministrar la amida de péptido sintético de la invención. Los excipientes o portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua estéril (preferentemente sin pirógenos), salino, tampón fosfato salino (PBS), agua/etanol, agua/glicerol, agua/sorbitol, agua/polietilenglicol, propilenglicol, alcohol cetilestearílico, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, lactosa, glucosa, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona (PVP), ácido cítrico, ácido tartárico, aceites, sustancias grasas, ceras o mezclas adecuadas de cualquiera de los anteriores.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede formular como una forma de dosificación líquida, semisólida o sólida. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede presentar en forma de una solución para inyecciones, gotas, jarabe, spray, suspensión, comprimido, parche, cápsula, apósito, supositorio, pomada, crema, loción, gel, emulsión, aerosol o en una forma particulada, tal como pellets o gránulos, opcionalmente prensados en forma de comprimidos o pastillas, empaquetados en cápsulas o suspendidos en un líquido. Los comprimidos pueden contener aglutinantes, lubricantes, diluyentes, colorantes, saborizantes, humectantes y pueden estar recubiertos de una capa entérica para soportar el ambiente ácido del estómago y disolverse en las condiciones más alcalinas del lumen intestinal. Como alternativa, los comprimidos pueden estar recubiertos de una capa azucarada o de una película con una película hidrosoluble. También se pueden incorporar a las composiciones farmacéuticas adyuvantes, agentes tamponantes, agentes dispersantes farmacéuticamente aceptables y análogos.

Los aglutinantes incluyen, por ejemplo, almidón, mucílago, gelatina y sacarosa. Los lubricantes incluyen talco, licopodio, magnesio y estearato cálcico/ácido esteárico. Los diluyentes incluyen lactosa, sacarosa, manitol, sal, almidón y caolín. Los humectantes incluyen propilenglicol y monoestearato de sorbitán.

Como se utiliza en la presente, "aplicación o administración local" hace referencia a la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en el lugar en el que se presenta la afección dolorosa o inflamatoria, tal como una articulación inflamada. Dicha aplicación local incluye intraarticular, tal como aplicación intraarticular, por medio de una inyección, a través de un catéter o suministro como integrante de un dispositivo biocompatible. Así pues, "aplicación local" se refiere a la aplicación a una zona interna del cuerpo determinada, tal como, por ejemplo, una articulación, una zona de tejidos blandos (tales como músculos, tendones, ligamentos, zonas intraoculares u otras zonas internas carnosas) u otras zonas internas del cuerpo. En particular, como se utiliza en la presente, "aplicación local" hace referencia a aplicaciones que no proporcionan sustancialmente suministro sistémico y/o administración sistémica de los agentes activos en las presentes composiciones. Además, como se utiliza en la presente, se pretende que "administración local" haga referencia a aplicaciones a zonas determinadas del cuerpo, es decir, además de a las grandes cavidades del cuerpo (tales como, por ejemplo, la cavidad peritoneal y/o pleural).

Como se utiliza en la presente, "aplicación tópica" hace referencia a la superficie corporal, tal como la piel, ojos, mucosa y labios, que puede estar en o sobre cualquier parte del cuerpo, incluida, pero sin limitarse a, la epidermis, cualquier otra dermis o cualquier otro tejido corporal. "Administración o aplicación tópica" implica el contacto directo de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención con tejido, tal como piel o membrana, particularmente la córnea o la mucosa oral, vaginal o anorrectal. Por lo tanto, a efectos de la presente "aplicación tópica" se refiere a la aplicación al tejido de una superficie corporal accesible, tal como, por ejemplo, la piel (el integumento o capa exterior) y la mucosa (las superficies que producen, secretan y/o contienen mucosidades). En particular, "aplicación tópica" hace referencia a aplicaciones que proporcionan poca o sustancialmente ningún suministro sistémico del compuesto activo en las presentes composiciones. Las superficies mucosas ejemplares incluyen las superficies mucosas oculares, la boca (tal como los labios, lengua, encías, mejillas, paladar y zona sublingual), laringe, esófago, bronquios, tráquea, conductos nasales, vagina y recto/ano.

Para la administración oral, se puede administrar un principio activo en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación sólidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El/los componente/s activo/s se puede/n encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y análogos. Los ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar un color, sabor, estabilidad, capacidad tamponante, dispersión u otras características conocidas deseables son óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y análogos. Se pueden utilizar diluyentes similares para crear comprimidos. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación prolongada para la liberación continua de medicación en el transcurso de un periodo de varias horas. Los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar o de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido del ambiente, o de un recubrimiento entérico para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral contienen colorante o saborizante para aumentar la aceptación de los pacientes. Para facilitar la estabilidad y a la absorción, los péptidos de la invención se pueden liberar de una cápsula tras atravesar el ambiente proteolítico severo del estómago. Los métodos para aumentar la estabilidad y la absorción tras la administración oral están ampliamente documentados en la materia (p. ej., Mahato RI. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 20:153-214, 2003).

Las formas de dosificación tales como pastillas, comprimidos masticables y chicle posibilitan una acción terapéutica más rápida en comparación con las formas de dosificaciones por vía oral de los compuestos de amidas de péptidos sintéticos de la invención con una absorción bucal significativa. Las formulaciones en chicles son preparaciones sólidas de dosis

única con una base que consiste principalmente en goma, destinadas a ser masticadas pero no tragadas, y que contienen uno o más compuestos de la invención que se liberan al masticar y se utilizan con el propósito de tratar localmente el dolor y la inflamación bucal o para el suministro sistémico tras la absorción a través de la mucosa bucal. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6 322 828 de Athanikar y Gubler de título: Process for manufacturing a pharmaceutical chewing gum.

Para la administración nasal, los agonistas de receptores opioides kappa se pueden formular como aerosoles. El término "aerosol" incluye cualquier fase en suspensión propulsada por gas de los compuestos de la presente invención que se puede inhalar hasta los conductos bronquiales o nasales. De forma específica, "aerosol" incluye una suspensión propulsada por gas de microgotas de los compuestos de la presente invención, que se puede presentar en un inhalador o nebulizador de dosis controlada, o en un vaporizador. Aerosol también incluye una composición de polvo seco de un compuesto de la presente invención suspendido en el aire o en otro gas portador, que se puede suministrar por insuflación a partir de un dispositivo inhalador, por ejemplo, véase Ganderton & Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313; y Raeburn *et al.* (1992) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 27:143-159.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en una formulación adecuada para el suministro sistémico, como por ejemplo, mediante suministro intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmico, intravaginal, intrarrectal, intrapulmonar u oral. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular de forma adecuada para el suministro local, tal como, por ejemplo, para el suministro tópico, iontoforético o para el suministro transdérmico a través de parches recubiertos, difundidos o impregnados con la formulación, y para la aplicación local a las articulaciones, como por ejemplo por inyección intraarticular.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para ser inyectadas, productos estériles, solubles y secos listos para ser combinados con un solvente justo antes de ser usados, incluidos los comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para ser inyectadas, productos estériles, insolubles y secos listos para ser combinados con un vehículo justo antes de ser usados y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas y de ahí que se formulen para el suministro por inyección, infusión o utilizando bombas implantables. Las formulaciones útiles de la invención para la administración intravenosa, subcutánea e intramuscular incluyen preparaciones en microcápsulas con propiedades de liberación controlada (R. Pwar *et al.* Protein and peptide parenteral controlled delivery. *Expert Opin Biol Ther.* 4(8):1203-12, 2004) o encapsulación en liposomas, de lo cual son una forma ejemplar los liposomas con recubrimiento de polietileno. Está documentado en la materia que dichos liposomas poseen un tiempo de circulación en la vasculatura prolongado (p. ej., Koppal, T. "Drug delivery technologies are right on target", *Drug Discov. Dev.* 6, 49-50, 2003).

Para la administración oftalmológica, la presente invención estipula un método de tratamiento del glaucoma o del dolor y la inflamación oftálmicos, que comprende administrar al ojo de un paciente que lo requiera una cantidad terapéuticamente eficaz de una amida de péptido sintético de la invención. La amida de péptido sintético se puede administrar tópicamente con un portador farmacéutico compatible con los ojos o de forma no sistémica utilizando una lente de contacto o un implante intraocular que puede contener opcionalmente polímeros que proporcionen una liberación prolongada de la amida de péptido sintético. Dichos portadores farmacéuticos compatibles con los ojos pueden incluir adyuvantes, conservantes antimicrobianos, surfactantes y soluciones viscosas, etc. Se sabe en la materia que altas concentraciones de muchos compuestos producen irritación ocular y que las concentraciones bajas producen menor irritación, por lo tanto, la formulación se suele diseñar de modo que incluya las concentraciones eficaces menores de compuesto activo, conservante, surfactante y/o solución viscosa, esta última poseerá preferentemente una tensión superficial alta para reducir la irritación ocular al mismo tiempo que aumenta la retención de soluciones oftalmológicas en la superficie del ojo. Dicha liberación controlada de las amidas de péptidos sintéticos de la invención puede durar de 6 meses a 1 año para los implantes o periodos más cortos (3-14 días) para las lentes de contacto. Dichos implantes pueden ser bombas osmóticas, matrices biodegradables o dispositivos intraoculares de liberación prolongada. Dichas composiciones tópicas pueden incluir una solución tamponada salina con o sin liposomas.

Las soluciones poliméricas acuosas, suspensiones acuosas, pomadas y geles se pueden utilizar para formulaciones tópicas de las amidas de péptidos sintéticos de la invención para aplicaciones oculares. Las formulaciones acuosas también pueden contener liposomas para crear una reserva de la amida de péptido sintético. Algunas de estas formulaciones tópicas son geles que aumentan la retención precorneal sin los inconvenientes e impedimentos visuales asociados con las pomadas. El portador farmacéutico compatible con los ojos puede incluir un polímero sintético biodegradable. Las composiciones en microesferas biodegradables autorizadas para el uso en seres humanos incluyen los poliláctidos: ácido poliláctico, ácido poliglicólico y ácido poli(láctico-co-glicólico). Otras formulaciones biodegradables incluyen, pero no se limitan a: poli(anhídrido-co-imida), ácido poli(láctico-glicólico), polietil-2-cianoacrilato, policaprolactona, polihidroxitirato valerato, polioctoéster y óxido de polietileno/teraftalato de polibutileno. La implantación o inyección intraocular de composiciones de liberación prolongada que incluyen una amida de péptido sintético de la invención puede proporcionar un control prolongado (que variará de meses a años) de la presión intraocular y de este modo se evita o se reduce la necesidad de preparaciones tópicas. Se divulgan en la Patente de EE. UU. 7 122 579 de Schwartz *et al.* y en la Patente de EE. UU. 7 105 512 de Morizono *et al.* los métodos útiles para formular y dispensar medicamentos oftálmicos. Gulsen y Chauhan divulgan métodos para formular medicamentos oftálmicos en lentes de contacto en *Ophthalmic drug delivery through contact lenses Investigative Ophthalmology and Visual Science*, (2004) 45:2342-2347.

Las preparaciones para el suministro transdérmico se incorporan dentro de un dispositivo adecuado para dicho suministro, dicho dispositivo utiliza, p. ej., iontoforesis (Kalia YN *et al.* Iontophoretic Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:619-58, 2004) o una superficie que penetra en la dermis (Prausnitz MR. Microneedles for Transdermal Drug Delivery, *Adv Drug Deliv Rev.* 56:581-7, 2004), son útiles para mejorar el suministro transdérmico de fármacos tal como está documentado en la materia. Se divulgan un dispositivo de electrotransporte y sus métodos operativos en la Patente de EE. UU. 6 718 201. Los métodos para el uso de iontoforesis para estimular el suministro transdérmico de péptidos se divulgan en la Patente de EE. UU. 6 313 092 y en la Patente EE. UU. 6 743 432.

Como se utilizan en la presente, los términos “electrotransporte”, “iontoforesis” y “iontoforético” hacen referencia al suministro a través de una superficie corporal (p. ej., piel o mucosa) de uno o más compuestos farmacéuticamente activos por medio de una fuerza electromotriz aplicada a un agente que contiene reservas. El compuesto puede ser suministrado por electromigración electroporación, electroosmosis o cualquier combinación de éstas. También se ha hecho referencia a la electroosmosis como electrohidroquinesis, electroconvección y osmosis eléctricamente inducida. En general, la electroosmosis de un compuesto en un tejido resulta de la migración de solvente en el que el compuesto está contenido, como resultado de la aplicación de una fuerza electromotriz sobre la reserva de especies terapéuticas, tales como, por ejemplo, el flujo de solvente inducido por electromigración de otras especies iónicas. Durante el proceso de electrotransporte, pueden aparecer ciertas modificaciones o alteraciones de la piel, tales como la formación de poros que existen de forma temporal en la piel, también conocida como “electroporación.” Cualquier transporte de especies asistido eléctricamente mejorado mediante modificaciones o alteraciones sobre la superficie corporal (p. ej., la formación de poros en la piel) se incluye también en el término “electrotransporte” como se utiliza en la presente. Por lo tanto, como se utilizan en la presente, aplicados a los compuestos de la presente invención, los términos “electrotransporte”, “iontoforesis” e “iontoforético” hacen referencia (1) al suministro de agentes cargados por electromigración, (2) al suministro de agentes no cargados mediante el proceso de electroosmosis, (3) al suministro de agentes cargados o no cargados por electroporación, (4) al suministro de agentes cargados mediante los procesos de electromigración y electroosmosis combinados, y/o (5) al suministro de una mezcla de agentes cargados y no cargados mediante los procesos de electromigración y electroosmosis combinados. Los dispositivos de electrotransporte generalmente emplean dos electrodos. Ambos electrodos se ubican en contacto eléctrico estrecho con una porción de la piel corporal. Un electrodo, llamado electrodo activo o donante, es el electrodo a partir del cual se suministra el agente terapéutico al cuerpo. El otro electrodo, llamado electrodo auxiliar o de retorno, sirve para cerrar el circuito eléctrico a través del cuerpo. Junto con la piel del paciente, el circuito se completa mediante la conexión de los electrodos a una fuente de energía eléctrica, p. ej., una batería, y normalmente a un circuito capaz de controlar la corriente que pasa por el dispositivo.

Dependiendo de la carga eléctrica del compuesto a suministrar transdérmicamente, el ánodo o el cátodo puede ser el electrodo activo o donante. Por lo tanto, si el compuesto a transportar está cargado positivamente, p. ej., el compuesto ejemplificado en el Ejemplo 1 en la presente, entonces el electrodo positivo (el ánodo) será el electrodo activo y el electrodo negativo (el cátodo) servirá de electrodo auxiliar, lo cual completa el circuito. Sin embargo, si el compuesto a ser suministrado está cargado negativamente, entonces el electrodo catódico será el electrodo activo y el electrodo anódico será el electrodo auxiliar. Los dispositivos de electrotransporte requieren además una reserva o fuente del agente terapéutico que va a ser suministrado al cuerpo. Tales reservas de fármacos se conectan al ánodo o al cátodo del dispositivo de electrotransporte para proporcionar una fuente fija o renovable de una o más de las especies o agentes deseados. El montaje de cada electrodo comprende un electrodo eléctricamente conductor en relación transmisora de iones con una reserva de líquido iónicamente conductor que en uso se coloca en contacto con la piel del paciente. Reservas de gel como las descritas en Webster (Patente de EE. UU. 4 383 529) son una forma de reserva ya que los geles hidratados son más fáciles de manejar y de fabricar que recipientes llenos de líquido. El agua es un solvente líquido que se puede utilizar en tales reservas, en parte debido a que las sales de los compuestos de péptidos de la invención son hidrosolubles, y por otra parte debido a que el agua no resulta irritante para la piel, lo cual permite de este modo un contacto prolongado entre la reserva de hidrogel y la piel. Para el electrotransporte, los péptidos sintéticos de la invención se pueden formular con potenciadores del flujo, tales como surfactantes iónicos o cosolventes que no sean agua (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 4 722 726 y la Solicitud de Patente Europea 278 473, respectivamente). Como alternativa, la capa externa (es decir, el estrato córneo) de la piel se puede perturbar mecánicamente antes del suministro mediante electrotransporte a su través, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. 5 250 023.

De forma periférica, las amidas de péptidos sintéticos que son debidamente adecuadas para el electrotransporte se pueden seleccionar midiendo su flujo de electrotransporte a través de la superficie corporal (p. ej., la piel o mucosa), p. ej., en comparación con un péptido de ensayo estandarizado con características de flujo de electrotransporte conocidas, p. ej., la hormona liberadora de tirotrópina (R. Burnette *et al.*, *J. Pharm. Sci.* (1986) 75:738) o vasopresina (Nair *et al.*, *Pharmacol Res.* 48:175-82, 2003). El flujo de electrotransporte transdérmico se puede determinar utilizando varios métodos *in vivo* o *in vitro* de uso común en la materia. Los métodos *in vitro* incluyen sujetar con abrazaderas un trozo de piel de un mamífero adecuado (p. ej., piel de un cadáver humano) entre el compartimento donante y el receptor de una celda de flujo de electrotransporte, con laparte del estrato córneo del trozo de piel mirando hacia el compartimento donante. Una solución líquida o gel que contiene el fármaco a suministrar se coloca en contacto con el estrato córneo, y se aplica una corriente eléctrica a los electrodos, un electrodo en cada compartimento. El flujo transdérmico se calcula muestreando la cantidad de fármaco en el compartimento receptor. Dos modelos utilizados con éxito para optimizar el suministro de fármacos mediante electrotransporte transdérmico son el modelo de la piel de cerdo aislada (Heit MC *et al.* Transdermal iontophoretic peptide delivery: *in vitro* and *in vivo* studies with luteinizing hormone releasing hormone. *J.*

Pharm. Sci. 82:240-243, 1993) y el uso de piel sin pelo aislada de roedores o cobayas sin pelo, por ejemplo, véase Hadzija BW *et al.* Effect of freezing on iontophoretic transport through hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 387-390, 1992. Los compuestos de la invención para el suministro iontoforético transdérmico pueden tener uno, o normalmente, dos nitrógenos cargados, para facilitar su suministro.

5 Otros dispositivos de suministro transdérmico útiles emplean el suministro de alta velocidad a presión para conseguir penetrar en la piel sin necesidad de usar una aguja. El suministro transdérmico se puede mejorar, como se sabe en la técnica, mediante el uso de potenciadores químicos, a los cuales se hace referencia en la materia a veces como “potenciadores de difusión”, es decir, compuestos que se administran junto con el fármaco (o en algunos casos se utilizan para pretratar la piel, antes de administrar el fármaco) para aumentar la permeabilidad del estrato córneo y de ese modo proporcionar una penetración mejorada del fármaco a través de la piel. Los potenciadores de la penetración química son compuestos que son inocuos y que sirven meramente para facilitar la difusión del fármaco a través del estrato córneo, bien sea por difusión pasiva o por un proceso que funciona mediante energía tal como electrotransporte. Véase, por ejemplo, Meidan VM *et al.* Enhanced iontophoretic delivery of buspirone hydrochloride across human skin using chemical enhancers. *Int. J. Pharm.* 264:73-83, 2003.

15 Las formas de dosificación farmacéutica para la administración rectal incluyen supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para un efecto sistémico. “Supositorios rectales”, como se utiliza en la presente, hace referencia a cuerpos sólidos para insertar en el recto que se derriten a temperatura corporal liberando uno o más principios farmacológica o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales incluyen bases o vehículos y agentes que aumentan el punto de fusión de los supositorios. Los ejemplos de bases incluyen crema de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax, (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. También se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes que aumentan el punto de fusión de supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar por el método de compresión o por moldeado. Los supositorios rectales normalmente pesan de aproximadamente 2 gm a aproximadamente 3 gm. Los comprimidos y cápsulas para la administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia o sustancias farmacéuticamente aceptables y por los mismos métodos que las formulaciones para la administración oral.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes capturadores o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen cloruro sódico para inyecciones, solución de Ringer para inyecciones, dextrosa isotónica para inyecciones, agua estéril para inyecciones, dextrosa y solución de Ringer lactato para inyecciones. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacterioestáticas o fungistáticas se deben añadir a preparaciones parenterales envasadas en recipientes multidosis que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílicos de ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfito de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaina. Los agentes de suspensión y de dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (Tween 80). También se puede incorporar un agente capturador o quelante de iones metálicos tal como EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua y el pH se puede ajustar a un pH fisiológicamente compatible mediante la adición de hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico.

45 El principio activo se puede administrar todo de una sola vez o se puede dividir en varias dosis más pequeñas a administrar en intervalos de tiempo o como una formulación de liberación controlada. El término “formulación de liberación controlada” engloba formulaciones que permiten el suministro continuo de una amida de péptido sintético de la invención a un sujeto durante un periodo de tiempo, por ejemplo, de varios días a semanas. Tales formulaciones se pueden administrar subcutáneamente o intramuscularmente y permiten una liberación continua estable de una cantidad predeterminada de compuesto en el sujeto con el tiempo. La formulación de liberación controlada de una amida de péptido sintético puede ser, por ejemplo, una formulación de un fármaco que contenga microcápsulas poliméricas, como las descritas en las Patentes de EE. UU. N.ºs 4 677 191 y 4 728 721, incorporadas a la presente por referencia. La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de forma que la administración proporcione una cantidad eficaz para producir un efecto deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y afección del paciente o animal, como se sabe en la materia. Para cualquier sujeto particular, se pueden ajustar regímenes de dosificación específicos con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones. Por lo tanto, los intervalos de concentración indicados en la presente son únicamente ejemplares y no tienen el propósito de limitar el ámbito o la práctica de la invención que se reivindica.

Las preparaciones de dosis unitarias parenterales incluyen el envasado en una ampolla o preenvasado en una jeringa con, o sin una aguja para el suministro. Todas las preparaciones para la administración parenteral son normalmente estériles, como es práctica habitual en la materia. De forma ilustrativa, la infusión intravenosa de una solución tamponada

acuosa estéril que contiene un compuesto activo es un modo eficaz de administración. En otra realización una solución o suspensión acuosa o aceitosa estéril que contiene el material activo se puede inyectar según se requiera para producir el efecto farmacológico deseado.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden suministrar o administrar intravenosamente, transdérmicamente, transmucosalmente, intranasalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, oral o tópicamente (tal como, por ejemplo, al ojo). Las composiciones se pueden administrar para el tratamiento profiláctico de individuos que padecen, o que corren el riesgo de padecer, una enfermedad o trastorno. Para aplicaciones terapéuticas, normalmente se administra una composición farmacéutica a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en una cantidad suficiente para inhibir, prevenir o aliviar la enfermedad o trastorno. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”.

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un mamífero con propósitos profilácticos o terapéuticos en cualquiera de las formulaciones o modos de suministro descritos anteriormente. El mamífero puede ser cualquier mamífero, tal como un mamífero domesticado o asilvestrado, o incluso un mamífero salvaje. El mamífero puede ser cualquier primate, ungulado, canino o felino. Por ejemplo, y sin limitar, el mamífero puede ser una mascota o un animal de compañía, tal como un perro o un gato; un mamífero de gran valor, tal como un caballo purasangre o un animal de competición; un animal de granja, tal como una vaca, una cabra, una oveja o un cerdo; o un primate, tal como un simio, gorila, orangután, lémur, mono o chimpancé. El ser humano es un mamífero adecuado para la profilaxis o el tratamiento utilizando las composiciones farmacéuticas de la invención.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un mamífero que padece una enfermedad o afección tratable mediante la activación del receptor opioide kappa. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como profilácticos a un mamífero que corre el riesgo de contraer o desarrollar una enfermedad o afección evitable mediante la activación del receptor opioide kappa. Las enfermedades o afecciones que se pueden tratar o prevenir mediante la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, sin limitar, cualquier afección que se puede aliviar mediante la activación del receptor opioide kappa, incluidas afecciones tales como dolor, inflamación, prurito, hiponatremia, hipocalemia, insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, hipertensión, edema, íleo, tos y glaucoma.

20 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar junto con o pueden incluir uno o más de otros compuestos terapéuticos o adyuvantes, tales como, pero sin limitarse a, otros opioides, cannabinoides, antidepresivos, anticonvulsivos, neurolépticos, antihistamínicos, acetaminofeno, corticosteroides, agentes bloqueadores de canales iónicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y diuréticos, muchos de los cuales son sinérgicos en efecto con las amidas de péptidos sintéticos de la invención.

25 Los opioides adecuados, incluyen, sin limitar, alfentanil, alfaprodina, anileridina, bremazocina, buprenorfina, butorfanol, codeína, conorfona, dextromoramida, dextropropoxifeno, dezocina, diamorfina, dihidrocodeína, dihidromorfina, difenoxilato, dipipanona, doxipicomina, etoheptacina, etilcetazocina, etilmorfina, etorfina, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, cetobemidona, levometadil, levorfanol, lofentanil, loperamida, meperidina (petidina), meptacina, metadona, morfina, morfina-6-glucurónido, nalbufina, nalorfina, nicomorfina, oxycodona, oximorfona, pentazocina, fenazocina, fenoperidina, piritramida, propiram, propoxifeno, remifentanil, sufentanil, tilidato, tonazocina y tramadol.

30 Una realización de la invención es la formulación y/o administración conjuntas de un opioide con actividad agonista sustancial en el receptor opioide mu, tal como morfina, fentanil, hidromorfona u oxycodona, junto con una amida de péptido sintético de la invención, con el propósito de un efecto ahorrador de la dosis opioide mu, donde la dosis del opioide mu se reduce para minimizar los efectos secundarios de opioide mu comunes, particularmente en pacientes que no han sido tratados previamente con opioides. Tales efectos secundarios incluyen estreñimiento, náusea, vómitos, sedación, depresión respiratoria, prurito (picor), confusión mental, desorientación e impedimentos cognitivos, retención urinaria, espasmo biliar, delirio, espasmos mioclónicos y convulsiones. La selección de la dosis de opioide mu reducida requiere juicio de un experto clínico y depende de las características únicas de varios opioides mu, así como también las características del paciente, tales como la intensidad del dolor, edad del paciente, enfermedad coexistente, régimen de fármaco actual e interacciones potenciales con fármacos, resultados de tratamientos anteriores y preferencias del paciente (McCaffery, M. y Pasero, C., *Pain Clinical Manual*, Segunda Edición, Mosby, 1999).

35 Los cannabinoides adecuados para la administración con o incorporados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen cualquier cannabinoide natural, tal como, por ejemplo, tetrahidrocanabinol (THC), o un derivado de THC, o un cannabinoide sintético, tal como, por ejemplo, levonantradol, marinol, nabilona, rimonabant o savitex.

40 Los antidepresivos adecuados que se pueden administrar junto con o incorporados a las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, antidepresivos tricíclicos, tales como imipramina, desipramina, trimipramina, protriptilina, nortriptilina, amitriptilina, doxepina y clomipramina; antidepresivos atípicos, tales como amoxapina, maprotilina, trazodona, bupropión y venlafaxina; inhibidores específicos de la captación de serotonina, tales como fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram y fluvoxamina; inhibidores específicos de la captación de norepinefrina, tales como reboxetina; o antidepresivos de doble acción, tales como nefazodona y mirtazapina.

Los neurolépticos adecuados que se pueden administrar junto con o incorporados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen cualquier neuroléptico, por ejemplo, un compuesto con actividad antagonista del receptor D2 de dopamina, tal como domperidona, metaclopramida, levosulpirida, sulpirida, tietilperazina, ziprasidona, zotepina, clozapina, clorpromazina, acetofenazina, carfenazina, clorprotixeno, flufenazina, loxapina, mesoridazina, molindona, perfenazina, pimozida, piperacetazina, perclorperazina, tioridazina, tiotixeno, trifluoperazina, triflupromazina, pipamperona, amperozida, quietiapina, melperona, remoxiprida, haloperidol, risperidona, olanzepina, sertindol, ziprasidona, amisulprida, proclorperazina y tiotixeno.

También se pueden incorporar de forma útil anticonvulsivos, tales como fenobarbital, fenitoína, primidona, carbamazepina, etosuximida, lamotrigina, ácido valproico, vigabatrin, felbamato, gabapentina, levetiracetam, oxcarbazepina, remacemida, tiagabina y topiramato, a las composiciones farmacéuticas de la invención.

También se pueden incorporar relajantes musculares, tales como metocarbamol, orfenadrina, carisoprodo, meprobamato, carbamato de clorfenesin, diazepam, clordiazepóxido y clorzoxazona; agentes antimigrañas, tales como sumitriptán, analépticos, tales como cafeína, metilfenidato, anfetamina y modafinil; antihistamínicos, tales como clorfeniramina, ciproheptadina, prometazina y pirlamina, así como también corticosteroides, tales como metilprednisolona, betametasona, hidrocortisona, prednisolona, cortisona, dexametasona, prednisona, alclometasona, clobetasol, clocortolona, desonida, desoximetasona, diflorasona, fluocinolona, fluocinonida, flurandrenolida, fluticasona, flormetalona, halcinonida, halobetasol, loteprednol, mometasona, prednicarbo y triamcinolona en las composiciones farmacéuticas de la invención.

También se pueden administrar junto con o incorporar agentes bloqueadores de canales iónicos, tales como, por ejemplo, el bloqueador de canales de sodio, carbamazepina, usado comúnmente en el tratamiento de tinitus, arritmia, ictus isquémico y epilepsia en las composiciones farmacéuticas de la invención. Como alternativa, o además, se pueden emplear también bloqueadores de canales iónicos de calcio, tales como ziconotida, al igual que antagonistas del canal iónico asociado con el receptor NMDA, tales como ketamina. Existen evidencias de que al menos algunos de estos bloqueadores de canales iónicos pueden potenciar los efectos analgésicos del agonista kappa y reducir de este modo la dosis requerida para el alivio del dolor afectivo. Véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 2000, *Pain* 84: 271-81.

Los AINE adecuados, u otros compuestos no opioides con actividad antiinflamatoria y/o analgésica, que se pueden administrar junto con o incorporar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: derivados de ácido aminoarilcarboxílico, tales como etofenamato, ácido meclofenámico, ácido mefanámico, ácido niflúmico; derivados de ácido arilacético, tales como acemetacina, amfenac, cinmetacina, clopirac, diclofenac, fenclorfenac, fenclorac, ácido fenclózico, fentiazac, glucametacina, isoxepac, lonazolac, ácido metiazínico, naproxina, oxametacina, proglumetacina, sulindac, tiaramida y tolmetina; derivados de ácido arilbutírico, tales como butibufeno y fenbufeno; ácidos arilcarboxílicos, tales como clidanac, quetorolac y tinoridina; derivados de ácido arilpropiónico, tales como ácido buclóxico, carprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, oxaprozina, derivados de ácido fenilalcanoico, tales como flurbiprofeno, piquetoprofeno, piroprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico y ácido tiaprofénico; ácidos piranocarboxílicos, tales como etodolac; pirazoles, tales como mepirizol; pirazolonas, tales como clofezona, feprazona, mofebutazona, oxifinbutazona, fenilbutazona, fenilpirazolidinonas, suxibuzona y tiazolinobutazona; derivados de ácido salicílico, tales como aspirina, bromosaligenin, diflusinal, fendosal, salicilato de glicol, mesalamina, 1-naftilsalicilato, salicilato de magnesio, olsalazina y salicilamida, salsalato y sulfasalazina; tiazinacarboxamidas, tales como droxicam, isoxicam y piroxicam, otros como ácido α -acetamidocaproico, acetaminofeno, s-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazac, bucoloma, carbazonas, cromolin, difenpiramida, ditazol, hidroxicloquinina, indometacina, quetoprofeno y su metabolito activo ácido 6-metoxi-2-naftilacético; guaiazuleno, aminoalquilésteres heterocíclicos del ácido micofenólico y derivados, nabumetona, nimesulida, orgoteína, oxaceprol, derivados de oxazol, paranilina, pifoxima, 2-sustituido-4, 6-di-terciario-butil-s-hidroxi-1,3-pirimidinas, proquazona y tenidap, e inhibidores de cox-2 (ciclooxigenasa II), tales como celecoxib o rofecoxib.

Los diuréticos adecuados que se pueden administrar junto con o incorporados a las preparaciones farmacéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, inhibidores de anhidrasa carbónica, tales como acetazolamida, diclorfenamida y metazolamida; diuréticos osmóticos, tales como glicerina, isosorbida, manitol y urea; inhibidores de $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ simporte (diuréticos de asa), tales como furosemida, bumetanida, ácido etacrínico, torsemida, axosemida, piretanida y tripamida; inhibidores de $\text{Na}^+ \text{-Cl}^-$ simporte (tiazida y diuréticos similares a tiazida), tales como bendroflumetiazida, clortiazida, hidroclortiazida, hidroflumetazida, meticlotiazida, politiazida, triclormetiazida, clortalidona, indapamida, metolazona y quinetazona; y, además, inhibidores de canales epiteliales de Na^+ renales tales como amilorida y triamtereno, y antagonistas de receptores mineralocorticoides (antagonistas de aldosterona), tales como espironolactona, canrenona, canrenoato de potasio y eplerenona, que, juntos, se clasifican también como diuréticos libres de K^+ . Una realización es una formulación y/o administración conjunta de un diurético de asa o tiazídico junto con una amida de péptido sintético de la invención con el propósito de un efecto ahorrador de la dosis de diurético de asa o tiazídico, donde la dosis del diurético de asa o tiazídico se reduce para minimizar la retención de agua no deseada y prevenir o reducir la hiponatremia, particularmente en el contexto de la insuficiencia cardíaca congestiva, así como también otras afecciones donde reducir la retención de fluidos corporales y normalizar el balance de sodio puede ser beneficioso para un paciente que lo requiera. Véase, R M Reynolds *et al.* Disorders of sodium balance, Brit. Med. J. 2006;332:702-705.

La hiponatremia asociada con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección donde la hiponatremia (afección con nivel de sodio bajo) esté presente, p. ej., en seres humanos, cuando la concentración de sodio

en el plasma descienda por debajo de 135 mmol/L, una anomalía que pueda ocurrir en aislamiento o, más frecuentemente, como una complicación de otras afecciones, o como consecuencia de usar medicamentos que pueden causar una reducción drástica de sodio.

5 Otra realización es la formulación y administración conjunta de un diurético ahorrador de potasio, p. ej., un antagonista de receptores mineralocorticoides, tal como espironolactona o eplerenona, junto con una amida de péptido sintético de la invención, con el propósito de posibilitar una dosis reducida de dicho diurético ahorrador de potasio, donde la dosis de dicho diurético se reduce para minimizar la hipercalemia o acidosis metabólica, p. ej., en pacientes con cirrosis hepática.

10 En realizaciones particulares, las amidas de péptidos sintéticos de la invención exhiben una acción de duración prolongada cuando se administran en dosis terapéuticamente relevantes *in vivo*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un mamífero en una dosis de 3 mg/kg de la amida de péptido sintético mantienen al menos aproximadamente el 50% de la eficacia máxima en un ensayo de dependencia del receptor opioide kappa 3 horas después de la administración. En otras realizaciones, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un mamífero en una dosis de 0.1 mg/kg de la amida de péptido sintético mantienen al menos aproximadamente el 50% de la eficacia máxima en un ensayo de dependencia del receptor opioide kappa 3 horas después de la administración. La eficacia máxima se define de forma operacional como el nivel más alto de eficacia determinado para el ensayo de dependencia del receptor opioide particular para todos los agonistas ensayados.

20 En ciertas realizaciones, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un mamífero en una dosis de 0.1 mg/kg mantienen al menos aproximadamente el 75% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración. En ciertas realizaciones más, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un mamífero en una dosis de 0.1 mg/kg mantienen al menos aproximadamente el 90% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración. En ciertas realizaciones, cuando las amidas de péptidos sintéticos de la invención se administran a un mamífero en una dosis de 0.1 mg/kg mantienen al menos aproximadamente el 95% de la eficacia máxima 3 horas después de la administración.

25 La invención estipula además un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero, donde el método incluye administrar al mamífero una composición que contiene una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención. El mamífero puede ser cualquier mamífero, tal como un mamífero domesticado o asilvestrado, o incluso un mamífero salvaje. Como alternativa, el mamífero puede ser un primate, un ungulado, un canino o un felino. Por ejemplo, y sin limitar, el mamífero puede ser una mascota o un animal de compañía, tal como un animal de gran valor, como un purasangre, o un animal de competición; un animal de granja, tal como una vaca, una cabra, una oveja o un cerdo; o un primate, tal como un simio o mono. En un aspecto particular, el mamífero es un ser humano.

35 Un experto en la materia puede determinar la cantidad eficaz de acuerdo con métodos rutinarios. Por ejemplo, una cantidad eficaz se puede determinar como la unidad de dosificación suficiente para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con receptores kappa en el mamífero. Como alternativa, la cantidad eficaz se puede determinar como una cantidad suficiente para aproximarse a la concentración CE₅₀ o una cantidad suficiente para aproximarse dos o tres veces o hasta aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez veces a la concentración CE₅₀ en un fluido corporal terapéuticamente relevante del mamífero, por ejemplo, cuando el fluido corporal esté en directa aposición respecto a un objetivo tisular, tal como el fluido sinovial de una articulación inflamada en un paciente que padece artritis reumatoide.

45 En una realización la amida de péptido sintético de la invención es una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de la amida de péptido sintético de la invención y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición farmacéutica incluye una amida de péptido sintético de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir una afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero, tal como un ser humano. En otro aspecto la afección asociada con receptores opioides kappa es dolor, inflamación, prurito, edema, íleo, tos o glaucoma.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención incluye además uno o más de los siguientes compuestos: un opioide, un canabinoide, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un neuroléptico, un corticosteroide, un agente bloqueador de canales iónicos o un fármaco antiinflamatorio no esteroide (AINE).

50 Las composiciones farmacéuticas que incluyen una amida de péptido sintético de la invención y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable se pueden utilizar para tratar o prevenir una o más enfermedades, trastornos o afecciones asociados con receptores opioides kappa.

55 La enfermedad, trastorno o afección asociada con receptores opioides kappa, evitable o tratable con las amidas de péptidos sintéticos de la invención puede ser cualquier afección asociada con receptores opioides kappa, incluido, pero sin limitarse a, dolor agudo o crónico, inflamación, prurito, hiponatremia, edema, íleo, tos y glaucoma. Por ejemplo, el dolor asociado con receptores opioides kappa puede ser dolor neuropático, dolor somático, dolor visceral o dolor cutáneo. Algunas enfermedades, trastornos o afecciones se asocian con más de una forma de dolor, p. ej., el dolor posoperatorio

puede presentar todos o cualquiera de los componentes de dolor neuropático, somático visceral y cutáneo, según el tipo y la extensión del procedimiento quirúrgico empleado.

La inflamación asociada con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección inflamatoria incluida, pero sin limitarse a, sinusitis, tenosinovitis debida a la artritis reumatoide, bursitis, tendinitis, epicondilitis lateral, capsulitis adhesiva, osteomielitis, inflamación osteoartrítica, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome del intestino irritable (SII), inflamación ocular, inflamación otítica o inflamación autoinmune.

El prurito asociado con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección prurítica, tal como, por ejemplo, prurito ocular, p. ej., asociado con conjuntivitis, prurito otítico, prurito asociado con una enfermedad renal terminal, en la cual muchos pacientes reciben diálisis renal, y otras formas de colestasis, incluida cirrosis biliar primaria, colestasis intrahepática del embarazo, enfermedad colestática hepática crónica, uremia, colestasis maligna, ictericia, así como también afecciones dermatológicas tales como eccema (dermatitis), incluida dermatitis atópica o de contacto, psoriasis, policitemia vera, liquen plano, liquen simple crónico, pediculosis (piojos), tirotoxicosis, tinea pedis, urticaria, sarna, vaginitis, prurito anal asociado con hemorroides, así como también, prurito causado por picaduras de insectos y prurito inducido por fármacos, tal como prurito inducido por opioides mu.

El edema asociado con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección edematosa, tal como, por ejemplo, edema debido a la enfermedad cardíaca congestiva o a un síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (ADH, por sus siglas en inglés).

El íleo asociado con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección iléica, pero no se limita a íleos posoperatorios o a la disfunción intestinal inducida por opioides.

El dolor neuropático asociado con receptores opioides kappa puede ser cualquier dolor neuropático, tal como, por ejemplo, neuralgia trigeminal, dolor diabético, dolor vírico, tal como el dolor asociado con el herpes zoster, dolor inducido por la quimioterapia, dolor provocado por un cáncer metastásico invasor de los nervios, dolor neuropático asociado con una lesión traumática y procedimientos quirúrgicos, así como también variantes del dolor de cabeza que se cree que poseen un componente neuropático, p. ej., migraña.

El dolor asociado con receptores opioides kappa incluye también dolor ocular, p. ej., tras la queratectomía fotorrefractiva (PRK, por sus siglas en inglés), laceración ocular, fractura de suelo orbitario, quemaduras químicas, abrasión o irritación corneal, o asociado con conjuntivitis, úlceras corneales, escleritis, episcleritis, escleroqueratitis, herpes zoster oftálmico, queratitis intersticial, iritis aguda, queratoconjuntivitis sicca, celulitis orbitaria, pseudotumor orbitario, pénfigo, tracoma o uveitis.

El dolor asociado con receptores opioides kappa también incluye dolor de garganta, particularmente el asociado a afecciones inflamatorias, tales como rinitis alérgica, bronquitis aguda, resfriado común, úlceras de contacto, lesiones causadas por el virus del herpes simple, mononucleosis infecciosa, gripe, cáncer laríngeo, laringitis aguda, gingivitis ulcerosa necrotizante aguda, absceso peritonsilar, quemaduras faríngeas, faringitis, laringofaringitis por reflujo, sinusitis aguda y amigdalitis.

Además, el dolor asociado con receptores opioides kappa puede ser dolor artrítico, dolor provocado por cálculos renales, por cálculos en el tracto urinario, por cálculos biliares y dolor provocado por cálculos en las vías renales, calambre uterino, dismenorrea, endometriosis, mastitis, dispepsia, dolor posquirúrgico (tal como, por ejemplo, de una apendicetomía, cirugía colorrectal abierta, intervención de una hernia, prostatectomía, resección de colon, gastrectomía, esplenectomía, colectomía, colostomía, laparoscopia pélvica, ligadura de trompas, histerectomía, vasectomía o colecistectomía), dolor posprocedimiento médico (tal como, por ejemplo, tras una colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia, o biopsia cervical o endometrial), dolor otítico, dolor intercurrente debido al cáncer y dolor asociado con un trastorno GI, tal como EII o SII u otras afecciones inflamatorias, particularmente viscerales (p. ej., enfermedad por reflujo gastroesofágico, pancreatitis, polinefritis aguda, colitis ulcerativa, pielonefritis aguda, colecistitis, cirrosis, absceso hepático, hepatitis, úlcera duodenal o gástrica, esofagitis, gastritis, gastroenteritis, colitis, diverticulitis, obstrucción intestinal, quiste ovárico, enfermedad pélvica inflamatoria, úlcera perforada, peritonitis, prostatitis, cistitis intersticial), o exposición a agentes tóxicos, tales como toxinas insecticidas, o fármacos tales como salicilatos o AINE.

La presente invención estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero, tal como un ser humano, donde el método incluye administrar al mamífero una composición que contiene una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención. En otra realización la afección asociada con receptores opioides kappa es dolor, inflamación (tal como inflamación artrítica reumatoide, inflamación osteoartrítica, inflamación debida a la EII, inflamación debida al SII, inflamación ocular, inflamación otítica o inflamación autoinmune), prurito (tal como dermatitis atópica, prurito asociado con la diálisis renal, prurito ocular, prurito otítico, prurito causado por picaduras de insectos o prurito inducido por opioides), edema, íleo, tos o glaucoma. En un aspecto, el dolor es un dolor neuropático (tal como neuralgia trigeminal, migraña, dolor diabético, dolor vírico, dolor inducido por la quimioterapia o dolor provocado por un cáncer metastásico), un dolor somático, un dolor visceral o un dolor cutáneo. En otro aspecto, el dolor es un dolor artrítico, dolor provocado por cálculos renales, calambre uterino, dismenorrea, endometriosis, dispepsia, dolor posquirúrgico, dolor posprocedimiento médico, dolor ocular, dolor otítico, dolor intercurrente debido al cáncer o dolor

asociado con un trastorno GI tal como EII o SII. En otro aspecto, el dolor es un dolor asociado con cirugía, donde la cirugía es laparoscopia pélvica, ligadura de trompas, histerectomía y colecistectomía. Como alternativa, el dolor puede ser un dolor asociado con un procedimiento médico, como por ejemplo, colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia o biopsia endometrial. En un aspecto específico, la dermatitis atópica puede ser psoriasis, eccema o dermatitis de contacto. En otro aspecto específico, el íleo es un íleo posoperatorio o una disfunción intestinal inducida por opioides.

El dolor asociado con receptores opioides kappa incluye la hiperalgesia, la cual se cree que se debe a cambios en el entorno de la terminal sensorial periférica que se producen tras una lesión tisular local. La lesión y la inflamación tisular (p. ej., abrasiones y quemaduras) pueden producir aumentos significativos en la excitabilidad de los nociceptores polimodales (fibras C) y en los mecanorreceptores de alto umbral (Handwerker *et al.* (1991) *Proceeding of the VIth World Congress on Pain*, Bond *et al.*, eds., Elsevier Science Publishers BV, págs. 59-70; Schaible *et al.* (1993) *Pain* 55:5-54). Se cree que la hiperalgesia subyace tras este aumento de excitabilidad y tras las respuestas exageradas de los aferentes sensoriales, donde la respuesta al dolor es el resultado de una respuesta exagerada a un estímulo. Se ha demostrado reiteradamente la importancia del estado hiperalgésico en el estado de dolor poslesión y parece ser responsable de una proporción mayoritaria del dolor poslesión/inflamatorio. Véase, por ejemplo, Woold *et al.* (1993) *Anesthesia and Analgesia* 77:362-79; Dubner *et al.* (1994) en, *Textbook of Pain*, Melzack *et al.*, eds., Churchill-Livingstone, Londres, págs. 225-242.

En otra realización la afección asociada con receptores opioides kappa es dolor, inflamación (tal como inflamación artrítica reumatoide, inflamación osteoartrítica, inflamación debida a la EII, inflamación debida al SII, inflamación ocular, inflamación otítica o inflamación autoinmune), prurito (tal como dermatitis atópica, prurito asociado con la diálisis renal, prurito ocular, prurito otítico, prurito causado por picaduras de insectos o prurito inducido por opioides), edema, íleo, tos o glaucoma. En un aspecto, el dolor es un dolor neuropático (tal como neuralgia trigeminal, migraña, dolor diabético, dolor vírico, dolor inducido por la quimioterapia o dolor provocado por un cáncer metastásico), un dolor somático, un dolor visceral o un dolor cutáneo. En otro aspecto, el dolor es un dolor artrítico, dolor provocado por cálculos renales, calambre uterino, dismenorrea, endometriosis, dispepsia, dolor posquirúrgico, dolor posprocedimiento médico, dolor ocular, dolor otítico, dolor intercurrente debido al cáncer o dolor asociado con un trastorno GI tal como EII o SII. En otro aspecto, el dolor es un dolor asociado con cirugía, donde la cirugía es laparoscopia pélvica, ligadura de trompas, histerectomía y colecistectomía. Como alternativa, el dolor puede ser un dolor asociado con un procedimiento médico, como por ejemplo, colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia o biopsia endometrial. En un aspecto específico, la dermatitis atópica puede ser psoriasis, eccema o dermatitis de contacto. En otro aspecto específico, el íleo es un íleo posoperatorio o una disfunción intestinal inducida por opioides.

En otra realización la afección asociada con receptores opioides kappa es una afección asociada con receptores opioides kappa evitable o tratable por diuresis ahorradora de sodio y potasio, también conocida como acuairesis. Un ejemplo de tales afecciones asociadas con receptores opioides kappa evitables o tratables mediante la administración de una amida de péptido sintético de la invención incluye edemas. El edema puede deberse a diversas enfermedades o afecciones, tales como enfermedad cardíaca congestiva o síndrome de secreción inapropiada de ADH.

En otra realización la afección asociada con receptores opioides kappa es hiponatremia u otras enfermedades edematosas. La hiponatremia o el edema asociados con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección hiponatémica o edematosa, tal como, por ejemplo, hiponatremia y edema asociados con la insuficiencia cardíaca congestiva o con un síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (ADH), o hiponatremia asociada con terapia diurética intensiva con tiazidas y/o diuréticos de asa. Las amidas de péptidos sintéticos de la invención exhiben un efecto acuareático ahorrador de sodio y de potasio, que es beneficioso en el tratamiento de afecciones patológicas que forman edemas asociadas con hiponatremia y/o hipocalemia. Por consiguiente, las amidas de péptidos sintéticos de la invención también resultan útiles en métodos de tratamiento o prevención de afecciones relacionadas con hiponatremia, ejemplos de lo cual se presentan a continuación. Las afecciones relacionadas con hiponatremia se pueden clasificar según su estado de volumen como hipervolémicas, euvolémicas o hipovolémicas.

La hiponatremia hipervolémica suele deberse a un aumento en el nivel de agua corporal total como se puede observar en casos de insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome nefrótico y cirrosis hepática.

La hiponatremia euvolémica se suele dar en el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (ADH) y también se puede asociar con neumonía, carcinoma microcítico de pulmón, polidipsia, casos de lesión en la cabeza y causas orgánicas (p. ej., uso de ciertos fármacos, tales como haloperidol) o por causa psicogénica.

La hiponatremia hipovolémica se debe a una reducción relativa del nivel de sodio corporal total y puede asociarse con el uso de diuréticos, casos de nefritis intersticial o sudoración excesiva.

Estas formas de hiponatremia se pueden clasificar además según la concentración de sodio en la orina (es decir, si la concentración es mayor o menor de 30 millones por litro). Véase: R M Reynolds *et al.* Disorders of sodium balance, Brit. Med. J. 2006;332:702-705.

La hiponatremia asociada con receptores opioides kappa puede ser cualquier enfermedad o afección donde la hiponatremia (afección con nivel de sodio bajo) esté presente, p. ej., en seres humanos, cuando la concentración de sodio en el plasma descienda por debajo de 135 mmol/L, una anomalía que pueda ocurrir en aislamiento o, más

frecuentemente, como una complicación de otras afecciones, o como consecuencia de usar medicamentos que pueden causar una reducción drástica de sodio.

Además de estas afecciones, se asocian otras numerosas afecciones con la hiponatremia, incluidas, pero sin limitarse a: causas neoplásicas de la secreción del exceso de ADH, incluidos los carcinomas pulmonares, duodenales, pancreáticos, ováricos, de vejiga y de uréter, timoma, mesotelioma, adenoma bronquial, carcinoma, gangliocitoma y sarcoma de Ewing; infecciones, tales como: neumonía (bacteriana o vírica), abscesos (pulmonares o cerebrales), cavitación (aspergilosis), tuberculosis (pulmonar o cerebral), meningitis (bacteriana o vírica), encefalitis y SIDA; causas vasculares, tales como: oclusiones o hemorragia cerebrovascular y trombosis del seno cavernoso; causas neurológicas, tales como: Síndrome de Guillan-Barre, esclerosis múltiple, delirium tremens, esclerosis lateral amiotrófica, hidrocefalo, psicosis, neuropatía periférica, lesión en la cabeza (cerrada y penetrante), tumores o infecciones del SNC y agresiones al SNC que afectan a los osmorreceptores hipotalámicos; malformaciones congénitas: agenesia del cuerpo calloso, labio/paladar leporino y otros defectos de la región central; causas metabólicas, tales como: porfiria aguda intermitente, asma, neumotórax y respiración con presión positiva; fármacos, tales como: diuréticos tiazídicos, acetaminofén, barbitúricos, agentes colinérgicos, estrógeno, agentes hipoglucémicos orales, vasopresina o desmopresina, oxitocina en altas dosis, clorpropamida, vincristina, carbamezepina, nicotina, fenotiazinas, ciclofosfamida, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de monoamino oxidasa y inhibidores de la captación de serotonina; administración del exceso de fluidos hipotónicos, p. ej., durante la hospitalización, cirugía o durante o después de sucesos atléticos (es decir, hiponatremia asociada con el ejercicio), así como el uso de suplementos bajos en sodio en ancianos. Véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, 16.^a Ed. (2005), pág. 2102.

Otras afecciones asociadas con hiponatremia incluyen insuficiencia renal, síndrome nefrótico (nefropatía membranosa y enfermedad de cambios mínimos), caquexia, malnutrición, rabdomiólisis, procedimientos quirúrgicos, cateterización cardiaca electiva, pérdida de sangre, así como también hipercalcemia, hipocalemia e hiperglucemia con la consiguiente glucosuria que lleva a la diuresis osmótica.

La invención estipula además amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero, tal como un ser humano, donde el método incluye administrar al mamífero una composición que incluye una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético como se describió anteriormente. La enfermedad o afección neurodegenerativa puede ser cualquier enfermedad o afección neurodegenerativa, tal como, por ejemplo, isquemia, anoxia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral, lesión de la médula espinal o lesión por reperusión. Como alternativa, la enfermedad o afección neurodegenerativa puede ser una enfermedad neurodegenerativa ocular. Las enfermedades neurodegenerativas oculares tratables o evitables particulares mediante el método de la invención incluyen glaucoma, degeneración macular, enfermedad isquémica retiniana y neuropatía diabética.

En ciertas realizaciones, la invención estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en métodos de prevención o tratamiento de ciertas enfermedades y afecciones neuronales, tales como enfermedades y afecciones que tienen un componente neurodegenerativo. Las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar en una cantidad eficaz para proteger las células neuronales contra los efectos de una patología o lesión que pueda dar lugar a neurodegeneración y/o muerte celular neuronal de células no tratadas. Por ejemplo, varias enfermedades o afecciones oculares que poseen un componente neurodegenerativo se pueden prevenir o tratar mediante la administración de una cantidad eficaz de las amidas de péptidos sintéticos de la invención. Tales enfermedades o afecciones oculares incluyen glaucoma, degeneración macular, enfermedad isquémica retiniana y neuropatía diabética. La evolución de estas enfermedades y afecciones se cree que involucra neurodegeneración o muerte celular neuronal, por ejemplo, por muerte celular programada (apoptosis) en la cual las células neuronales están asignadas a un sistema que sin intervención puede llevar a la muerte celular. Se ha descubierto que se puede prevenir el desarrollo o evolución de estas enfermedades y afecciones, o al menos se puede ralentizar, mediante el tratamiento con agonistas de receptores opioides kappa. Se cree que esta mejora se debe a la neuroprotección por parte de agonistas de receptores opioides kappa. Véase, por ejemplo, Kaushik *et al.* "Neuroprotection in Glaucoma" (2003) *J. Postgraduate Medicine* vol. 49 (1): págs. 90-95.

En el caso del glaucoma, se cree que la profilaxis y el tratamiento mediante la administración de agonistas de receptores opioides kappa están mediados por al menos dos actividades características inducidas por la activación del receptor opioide kappa: neuroprotección y reducción de la presión intraocular (PIO). Aunque sin pretender ceñirse a la teoría, se cree que la neuroprotección se debe, al menos en parte, a la inducción del péptido natriurético atrial (PNA) en los ojos, lo que lleva a la protección ante daños oxidativos y otras agresiones.

Se cree que la presión intraocular extraordinariamente alta también es un factor que lleva al desarrollo del glaucoma. También se puede prevenir o tratar la presión intraocular elevada mediante la administración de agonistas de receptores opioides kappa por tres actividades diferentes desencadenadas por la activación del receptor: reducción en la secreción del humor acuoso, aumento del flujo del humor acuoso y acuarexis (diuresis ahorradora de sodio y potasio, que produce la pérdida de agua).

La invención estipula también amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección ocular asociada con receptores kappa en un mamífero, tal como la presión intraocular (PIO) alta. El método incluye la administración al mamífero de una composición que incluye una cantidad

eficaz de una amida de péptido sintético como se describió anteriormente. En un aspecto de la invención, la amida de péptido sintético se administra tópicamente. En otro aspecto, la amida de péptido sintético se administra como un implante.

5 En otras realizaciones, la invención estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en métodos de prevención o tratamiento de ciertas enfermedades y afecciones cardiovasculares que poseen un componente celular degenerativo. Las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar en una cantidad eficaz para proteger las células miocárdicas contra los efectos de una patología o lesión que pueda dar lugar a degeneración y/o muerte celular de células no tratadas. Por ejemplo, varias enfermedades o afecciones cardiovasculares se pueden tratar o prevenir mediante la administración de una cantidad eficaz de las amidas de péptidos sintéticos de la invención. Tales enfermedades y afecciones cardiovasculares incluyen, sin limitar, enfermedad coronaria cardiaca, isquemia, infarto de miocardio, lesión por reperfusión y arritmia. Véase, por ejemplo, Wu *et al.* "Cardioprotection of Preconditioning by Metabolic Inhibition in the Rat Ventricular Myocyte – Involvement of kappa Opioid Receptor" (1999) *Circulation Res* vol. 84: págs. 1388-1395. Véase también Yu *et al.* "Anti-Arrhythmic Effect of kappa Opioid Receptor Stimulation in the Perfused Rat Heart: Involvement of a cAMP-Dependent Pathway" (1999) *J Mol Cell Cardiol.* vol. 31(10): págs. 1809-1819.

15 Las enfermedades y afecciones de otros tejidos y órganos que se pueden prevenir o tratar mediante la administración de una cantidad eficaz de las amidas de péptidos sintéticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, isquemia, anoxia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral o de la médula espinal y lesión por reperfusión.

Otra forma de dolor asociado con receptores opioides kappa tratable o evitable con las amidas de péptidos sintéticos de la invención es la hiperalgesia. En una realización, el método incluye administrar una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención a un mamífero que padece o corre el riesgo de desarrollar hiperalgesia para prevenir, mejorar o aliviar completamente la hiperalgesia.

20 Las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar mediante los métodos divulgados en la presente para el tratamiento o prevención de cualquier afección hiperalgésica, tal como, pero sin limitar, una afección hiperalgésica asociada con la dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, úlceras cutáneas, inflamación, sarpullidos, irritación fúngica y afecciones hiperalgésicas asociadas con agentes infecciosos, quemaduras, abrasiones, moretones, contusiones, congelación, sarpullidos, acné, picaduras de insectos, úlceras cutáneas, mucositis, gingivitis, bronquitis, laringitis, dolor de garganta, herpes, irritación fúngica, ampollas febriles, furúnculos, verrugas plantares, procedimientos quirúrgicos o lesiones vaginales. Por ejemplo, las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar tópicamente sobre una superficie mucosa, tal como la boca, el esófago o la laringe, o a los conductos bronquiales o nasales. Como alternativa, las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar tópicamente sobre la vagina o el recto/ano.

25 Además, las amidas de péptidos sintéticos de la invención se pueden administrar mediante los métodos divulgados en la presente para el tratamiento o la prevención de cualquier afección hiperalgésica asociada con quemaduras, abrasiones, moretones, abrasiones (tales como abrasiones corneales), contusiones, congelación, sarpullidos, acné, picaduras de insectos, úlceras cutáneas (por ejemplo, úlceras diabéticas o úlceras de decúbito), mucositis, inflamación, gingivitis, bronquitis, laringitis, dolor de garganta, herpes, irritación fúngica (tales como pie de atleta o tiña inguinal), ampollas febriles, furúnculos, verrugas plantares o lesiones vaginales (tales como lesiones vaginales asociadas con micosis o enfermedades transmitidas sexualmente). Los métodos contemplados para la administración de las amidas de péptidos sintéticos de la invención para el tratamiento o la prevención de la hiperalgesia incluyen aquellos en los que el compuesto se aplica tópicamente sobre una superficie en los ojos, boca, laringe, esófago, conductos bronquiales, conductos nasales, vagina o recto/ano.

35 Las afecciones hiperalgésicas asociadas con la recuperación posoperatoria también se pueden tratar mediante la administración de las amidas de péptidos sintéticos de la invención. Las afecciones hiperalgésicas asociadas con la recuperación posoperatoria pueden ser cualesquiera afecciones hiperalgésicas asociadas con la recuperación posoperatoria, tales como, por ejemplo, queratectomía radial, extracción dental, lumpectomía, episiotomía, laparoscopia y artroscopia.

40 Las afecciones hiperalgésicas asociadas con la inflamación también son tratables mediante la administración de las amidas de péptidos sintéticos de la invención. La inflamación periodontal, inflamación ortodóntica, conjuntivitis inflamatoria, hemorroides e inflamaciones venéreas se pueden tratar o prevenir mediante la administración tópica o local de las amidas de péptidos sintéticos de la invención.

La invención también estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de inducción de la diuresis en un mamífero que la requiere. El método incluye la administración al mamífero de una composición que comprende una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención como se describió anteriormente.

55 La invención estipula además amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de inducción de la secreción de prolactina en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una composición que comprende una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la invención como se describió anteriormente. El método de inducción de la secreción de prolactina es adecuado para tratar un mamífero, tal como un ser humano que padece lactancia insuficiente, lactancia inadecuada, lactancia subóptima, movilidad reducida del esperma, un trastorno

relacionado con la edad, diabetes tipo I, insomnio o fase MOR del sueño inadecuada. En un aspecto particular, el método incluye la administración de la amida de péptido sintético junto con una dosis reducida de un compuesto analgésico agonista opioide mu para producir un efecto analgésico terapéutico; dicho compuesto tiene un efecto secundario asociado, donde la dosis reducida tiene un efecto secundario asociado menor que el efecto secundario asociado con la dosis del compuesto analgésico agonista opioide mu necesaria para conseguir el efecto analgésico terapéutico cuando se administra solo.

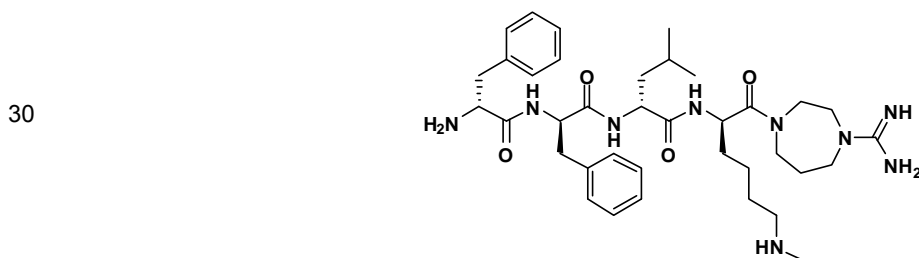
La presente invención también estipula amidas de péptidos sintéticos de la invención para usar en un método de unión a un receptor opioide kappa en un mamífero; el método incluye el paso de administración de una composición que contiene una cantidad eficaz de una amida de péptido sintético de la presente invención al mamífero. Un experto en la materia puede determinar la cantidad eficaz mediante métodos rutinarios. Por ejemplo, la cantidad eficaz se puede determinar como una unidad de dosificación suficiente para unirse a receptores opioides kappa en un mamífero y causar un efecto antinociceptivo, un efecto antiinflamatorio, un efecto acuareético o un aumento de los niveles de prolactina sérica o cualquier otro efecto obtenido como respuesta de receptores opioides kappa. Como alternativa, la cantidad eficaz se puede determinar como una cantidad suficiente para aproximarse a la CE_{50} en un fluido corporal del mamífero o una cantidad suficiente para aproximarse a dos o tres, o hasta cinco o incluso aproximadamente diez veces la CE_{50} en un fluido corporal terapéuticamente relevante del mamífero.

SÍNTESIS DE LAS AMIDAS PEPTÍDICAS DE LA INVENCÓN

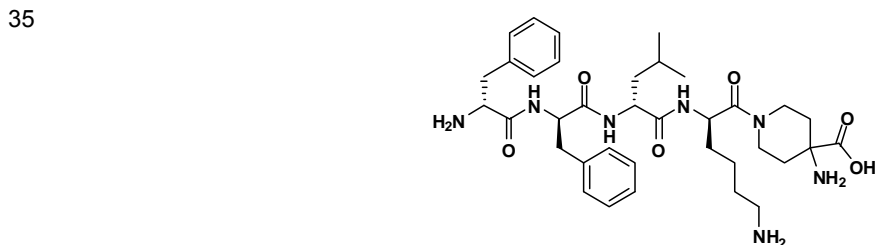
Como se utiliza en la presente, la designación química "tetrapéptido-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]" se utiliza para indicar el resto aminoácido de las amidas de péptidos sintéticos de la invención derivado del ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico, donde el átomo de nitrógeno del anillo piperidina está enlazado al C terminal del carbono del carbonilo del fragmento tatrapeptídico, a no ser que se indique lo contrario.

La Figura 1 muestra el esquema sintético general utilizado en la preparación de los Compuestos (1) (6), (7), (10) y (11); La Figura 2 muestra el esquema sintético general utilizado en la preparación de los Compuestos (2) a (5), (8), (9) y (12) - (14); La Figura 3 muestra el esquema sintético general utilizado en la preparación de las amidas de péptidos sintéticos (15) - (24); y la Figura 4 muestra el esquema sintético utilizado en la preparación de las amidas de péptidos sintéticos (25) - (37):

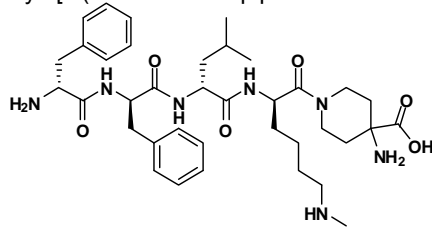
Compuesto (1): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -Me)D-Lys-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 1):



Compuesto (2): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 2):

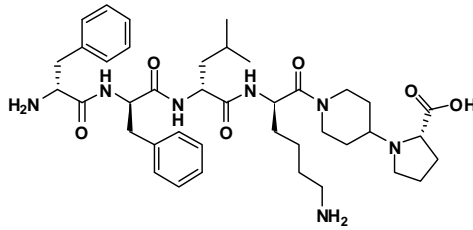


Compuesto (3): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 1):



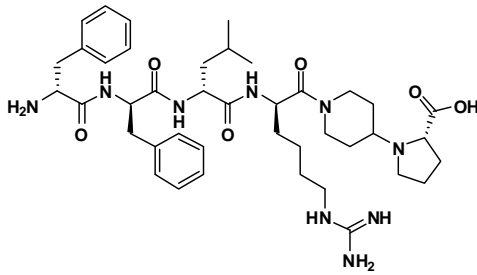
5

Compuesto (4): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 2):



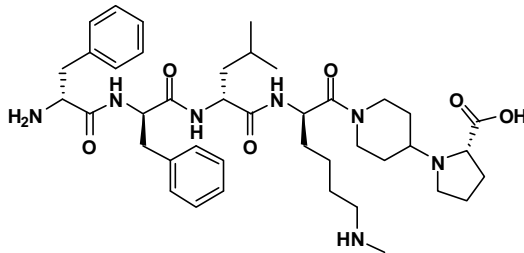
10

Compuesto (5): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 3):



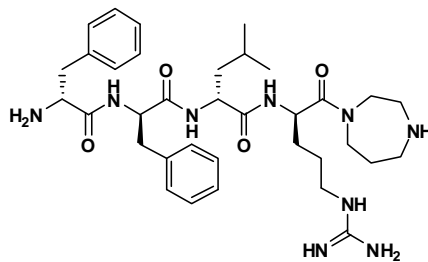
15

20 Compuesto (6): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 1):



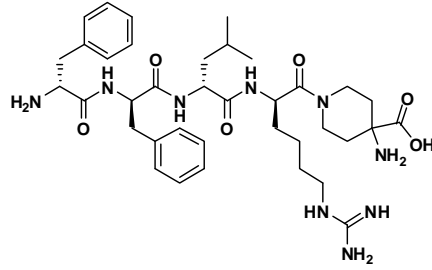
25

Compuesto (7): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 4):



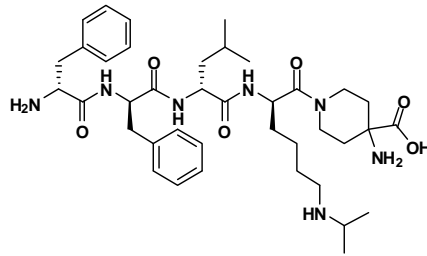
30

Compuesto (8): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 3):



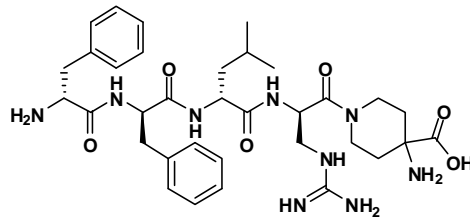
5

Compuesto (9): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(â-iPr)D-Lys-[ù(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 5):



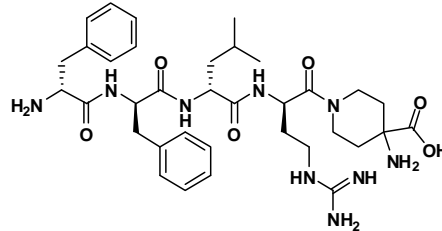
10

Compuesto (10): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(-amidino)D-Dap-[ù(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 6):



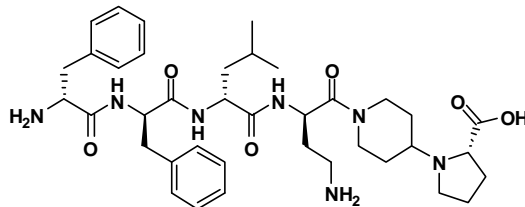
15

Compuesto (11): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 7):



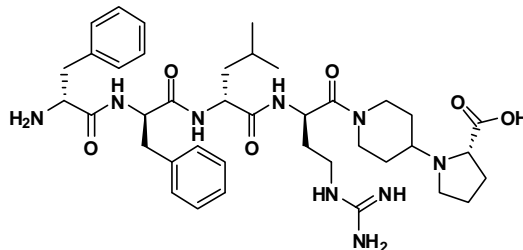
20

Compuesto (12): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 8):



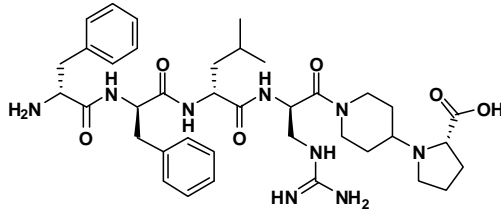
25

Compuesto (13): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 7):

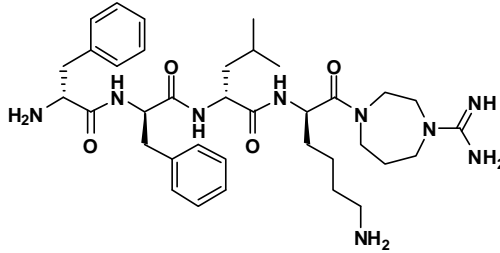


30

Compuesto (14): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dap(amidino)-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 6):

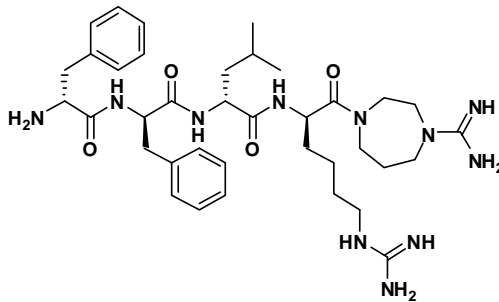


5 Compuesto (15): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 2):



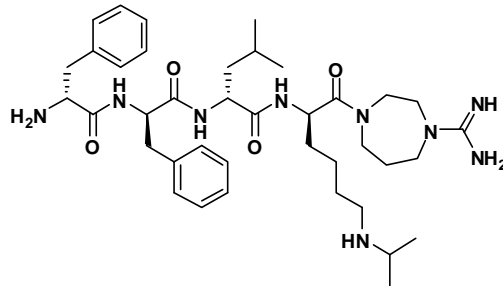
10

Compuesto (16): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 3):



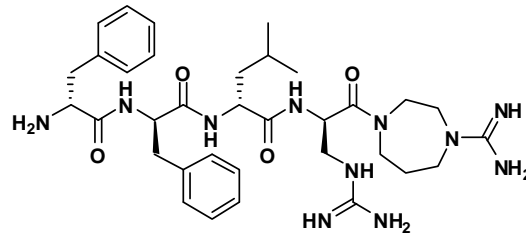
15

Compuesto (17): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 5):



20

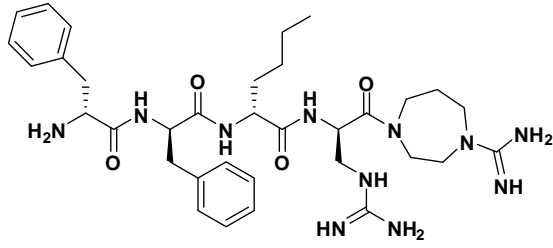
25 Compuesto (18): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):



30

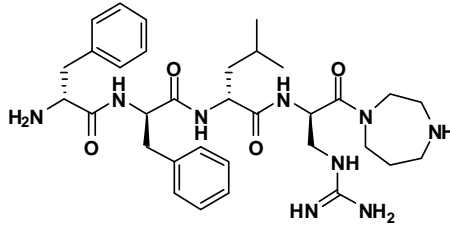
Compuesto (19): D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

5



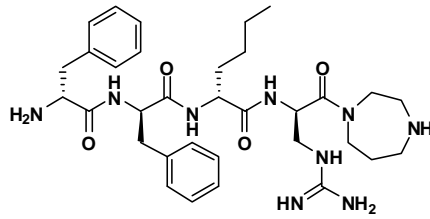
Compuesto (20): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

10



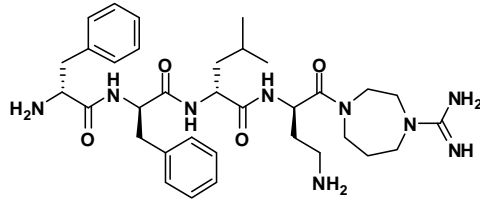
Compuesto (21): D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

15



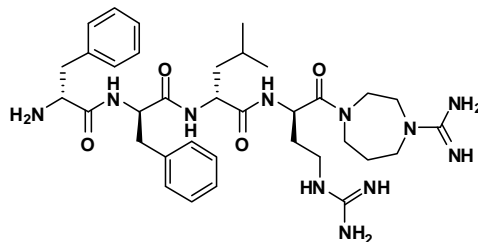
Compuesto (22): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 8):

20



Compuesto (23): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 7):

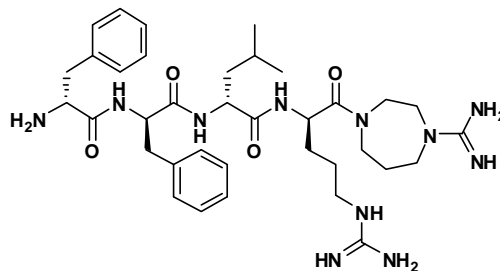
25



30

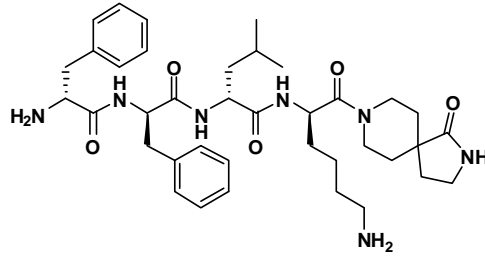
Compuesto (24): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 4):

35



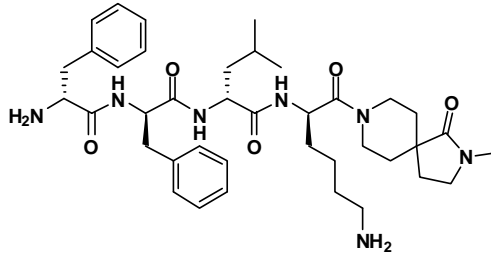
Compuesto (25): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

5



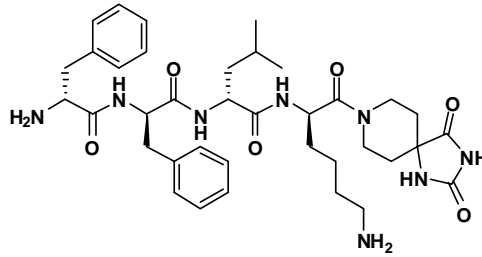
Compuesto (26): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[2-metil-2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

10



Compuesto (27): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1,3,8-triazaespiro[4,5]decan-2,4-diona-amida] (SEQ ID NO: 2):

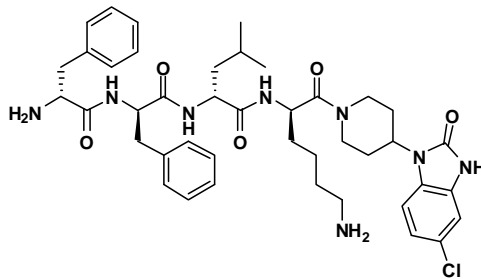
15



20

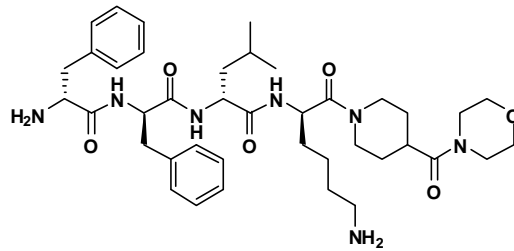
Compuesto (28): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

25



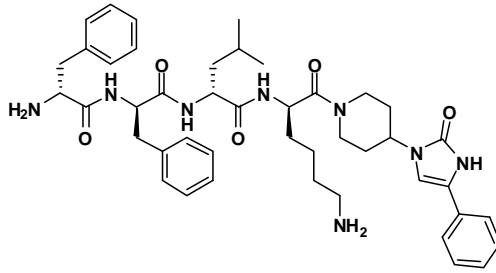
Compuesto (29): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[morfolino(piperidin-4-il)metanonamida] (SEQ ID NO: 2):

30



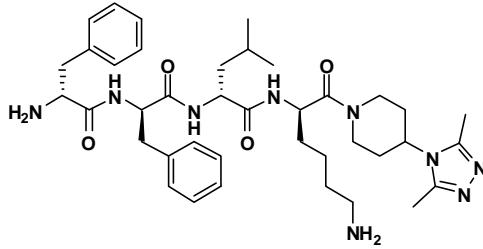
Compuesto (30): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-fenil-1-(piperidinil-1*H*-imidazol-2(3*H*)-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

5



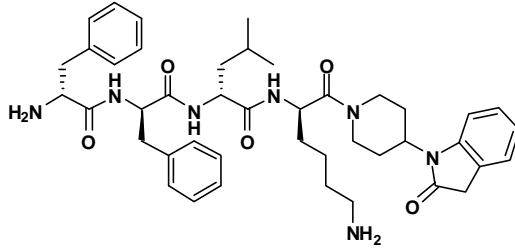
Compuesto (31): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidinamida] (SEQ ID NO: 2):

10



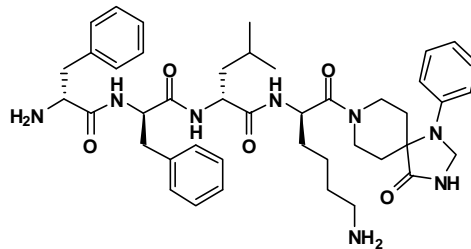
Compuesto (32): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-(piperidin-4-il)indolin-2-onamida] (SEQ ID NO: 2):

15



Compuesto (33): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-fenil-1,3,8-triazaespiro[4.5]decan-4-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

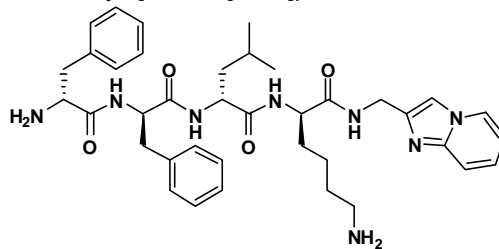
20



25

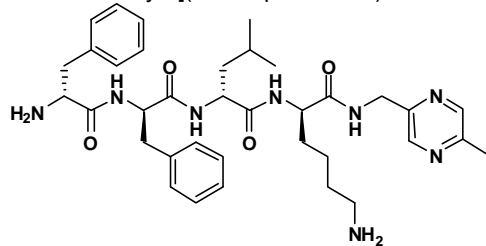
Compuesto (34): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[imidazo[1,2-a]piridin-2-ilmetilamida] (SEQ ID NO: 2):

30

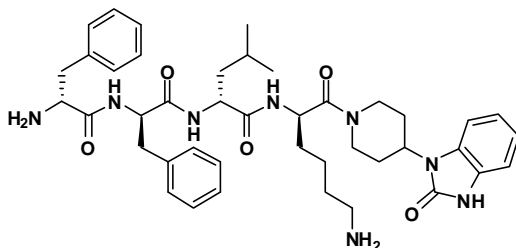


Compuesto (35): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[(5-metilpirazin-2-il)metilamida] (SEQ ID NO: 2):

35

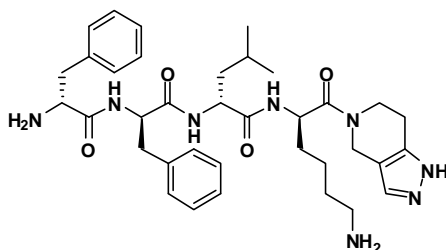


Compuesto (36): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(3*H*)-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):



5

Compuesto (37): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]piridinamida] (SEQ ID NO: 2):



10

EJEMPLOS

15 Métodos sintéticos experimentales generales:

Los derivados de aminoácidos y resinas se adquirieron de proveedores comerciales (Novabiochem, Bachem, Peptide International y PepTech Corporation). Otros productos químicos y solventes se adquirieron de Sigma-Aldrich, Fisher Scientific y VWR. Los compuestos de la presente se sintetizaron mediante métodos estándares en la química peptídica en fase sólida utilizando tanto la metodología Fmoc como la Boc. A no ser que se especifique lo contrario, todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

20

Las siguientes referencias estándares sirven de guía en la organización experimental general y en la disponibilidad de los materiales y reactivos de partida: Kates, S. A., Albericio, F., Eds., *Solid Phase Synthesis, A Practical Guide*, Marcel Dekker, Nueva York, Basel, (2000); Bodanszky, M., Bodanszky, A., Eds., *The Practice of Peptide Synthesis, Second Edition*, Springer-Verlag, (1994); Atherton, E., Sheppard, R. C., Eds., *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, (1989); Stewart, J. M., Young, J. D., *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Company, (1984); Bisello, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273, 22498-22505 (1998); y Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154 (1963).

25

Otras abreviaturas utilizadas en la presente:

ACN: acetonitrilo

30

Aloc: aliloxicarbonilo

Boc: *tert*-butoxicarbonilo

BOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio

Cbz: benciloxicarbonilo

Cbz-OSu: *N* α -(Benciloxicarboniloxi)succinimida

35

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCM: Diclorometano

Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo

DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DIEA: *N,N*-diisopropiletilamina

40

DMF: *N,N*-dimetilformamida

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

- HATU: hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio
- HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- 5 i: iso
- ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
- NMM: 4-metilmorfolina
- NMP: N-metilpirrolidinona
- All: alilo
- 10 o-NBS-Cl: Cloruro de o-nitrobencenosulfonilo
- Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuran-5-sulfonilo
- PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidinofosfonio
- FI: fase inversa
- TBTU: Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
- 15 TEAP: fosfato de trietilamonio
- TFA: ácido trifluoroacético
- TIS: triisopropilsilano
- TMOF: Ortoformiato de trimetilo
- TMSOTf: trifluorometanosulfonato de trimetilsililo
- 20 Trt: tritilo
- Los péptidos sintetizados mediante la metodología Fmoc se escindieron con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (v/v/v = 95:2.5:2.5). El paso de escisión en la metodología Boc se llevó a cabo con una mezcla de HF/anisol (v/v = 9:1) o con una mezcla de TMSOTf/TFA/m-cresol (v/v/v = 2:7:1).
- 25 Las reacciones de acoplamiento en la elongación de cadenas peptídicas se llevaron a cabo manualmente en un sintetizador peptídico y fueron mediadas por reactivos de acoplamiento con un exceso de 2 a 4 veces más de derivados aminoacídicos. Los reactivos de acoplamiento utilizados en la síntesis de varios compuestos de la invención se eligieron entre las siguientes combinaciones: DIC/HOBt, HATU/DIEA, HBTU/DIEA, TBTU/DIEA, PyBOP/DIEA y BOP/DIEA.
- La desprotección de la cadena lateral del aminoácido en la posición N.º 4 (designado Xaa₄ en el producto final de amida de péptido sintético) de los péptidos unidos a resinas se llevó a cabo como se indica a continuación: Los péptidos se ensamblaron partiendo de Xaa₄ y añadiendo progresivamente Xaa₃, después Xaa₂ y finalmente Xaa₁. Los grupos protectores de las cadenas laterales del diaminoácido introducido en Xaa₄ se eliminaron selectivamente como se indica a continuación: (i) Los grupos N-Dde o N-ivDde se eliminaron con hidrazina 2-4% en DMF. Véanse, Chabra, S. R., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 39:1603-1606 (1998) y Rohwedder, B., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 39: 1175 (1998); (ii) N-Aloc: eliminado con 3 eq. de (Ph₃P)₄Pd en CHCl₃/AcOH/NMM (v/v/v = 37:2:1). Véanse, Kates, S. A., *et al.* en "*Peptides Chemistry, Structure and Biology, Proc. 13th American Peptide Symposium*", Hodges, R. S. y Smith, J. A. (Eds), ESCOM, Leiden, 113-115 (1994).
- 30 Cuando los péptidos se ensamblaron con la metodología Boc, el grupo protector de la cadena lateral de los aminoácidos introducidos en Xaa₄ fue N-Fmoc, el cual se eliminó con piperidina 20-30% en DMF.
- 40 La isopropilación del nitrógeno terminal en la cadena lateral del aminoácido en Xaa₄ de péptidos unidos a resinas se llevó a cabo como se indica a continuación: Tras la desprotección, el péptido unido a una resina con la función ω-amino libre en Xaa₄ se hizo reaccionar con una mezcla de acetona y NaBH(OAc)₃ en TMOF, lo que dio lugar al Nω-isopropilpéptido unido a una resina.
- La monometilación del nitrógeno terminal en la cadena lateral del aminoácido en Xaa₄ de péptidos unidos a resinas: Para sintetizar Nω-metilpéptidos unidos a resinas, la función ω-amino libre se derivó primero con cloruro de o-nitrobencenosulfonilo (o-NBS-Cl; Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. Optimized selective N-methylation of peptides on
- 45

solid support. *J. Pep. Sci.* 12:213-219 (2006). La sulfonamida resultante se metiló posteriormente con una mezcla de dimetilsulfato y 1,8-diaza-biciclo[5.4.0]undec-7-eno en NMP. El grupo protector *o*-NBS se eliminó subsecuentemente con una mezcla de mercaptoetanol y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno en NMP.

5 La guanilación del nitrógeno terminal en la cadena lateral del aminoácido en Xaa₄ de péptidos unidos a resinas: Tras la desprotección, el péptido unido a una resina con la función ω -amino libre en la posición N.º 4 se hizo reaccionar con una mezcla de clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamida (Bernatowicz, M. S., *et al.*, *J. Org. Chem.* 57, 2497-2502 (1992) y DIEA en DMF, lo que dio lugar al N ω -guanidinopéptido unido a una resina.

10 Los péptidos se purificaron mediante HPLC preparativa en tampones de fosfato de trietilamonio (TEAP) o ácido trifluoroacético (TFA). Cuando fue necesario, los compuestos se convirtieron finalmente en sales de trifluoroacetato o de acetato utilizando la metodología de HPLC convencional. Se combinaron y liofilizaron las fracciones con pureza mayor del 97%. Se determinó la pureza de los péptidos sintetizados por HPLC-FI analítica.

15 La HPLC-FI analítica se realizó en un sistema de suministro de multisolventes Waters 600 con un detector de absorbancia UV sintonizable Waters 486 y un procesador de datos Waters 746. Los análisis HPLC de los péptidos se llevaron a cabo utilizando una columna Vydac C₁₈ (0.46 × 25 cm, 5 μ m de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) con una velocidad de flujo de 2.0 ml/min. Los solventes A y B fueron TFA 0.1% en H₂O y TFA 0.1% en ACN 80%/H₂O 20%, respectivamente. Los tiempos de retención (t_R) se dan en min. La HPLC-FI preparativa se realizó utilizando un cartucho Vydac C₁₈ preparativo (5 × 30 cm, 15-20 μ m de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) con una velocidad de flujo de 100 ml/min, en un sistema cromatográfico Waters Prep LC 2000 preparativo con un detector de absorbancia UV sintonizable Waters 486 y un registrador gráfico Servogor 120. Los tampones A y B fueron TFA 0.1% en H₂O y TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%, respectivamente. El análisis HPLC del compuesto final se realizó en un cromatógrafo líquido Hewlett Packard 1090 utilizando una columna C₁₂ Phenomenex Synergi MAX-RP (2.0 × 150 mm, 4 μ m de tamaño de partícula, 80 Å de tamaño de poro) con una velocidad de flujo de 0.3 ml/min a 40 °C. Los tampones A y B fueron TFA 0.01% en H₂O y TFA 0.01% en ACN 70%/H₂O 30%, respectivamente. La identidad de las amidas de péptidos sintéticos de confirmó por espectrometría de masas con electronebulización. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Finnigan LCQ con una fuente ESI.

EJEMPLO 1: Síntesis del Compuesto (1):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -Me)D-Lys-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 1).

30 Véase el esquema que se muestra en la Figura 1. Los derivados aminoácidos utilizados fueron Bcz-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH y Fmoc-D-Lys(Dde)-OH. El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó manualmente partiendo de una resina *p*-nitrofenilcarbonato Wang (5.0 g, 4.4 mmol; Novabiochem). El enlace de la homopiperazina a la resina se consiguió mezclando la resina con una solución de homopiperazina (8.7 g, 87 mmol; Acros Organics) en DCM (100 ml) durante la noche a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF y DCM, y se secó al vacío. La homopiperazina-carbamato resina Wang (5.1 g; homopiperazina-[carbamato resina Wang]) se dividió en dos porciones y una porción de 1.5 g (1.3 mmol) se utilizó para continuar la síntesis peptídica. Los acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt se realizaron con un exceso de 3 veces más de los derivados aminoácidos. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina 25% en DMF. Una vez terminada la elongación de la cadena peptídica, la resina se trató con hidrazina 4% en DMF durante 3 × 3 min para la eliminación de Dde. La resina se lavó con DMF y DCM, y se secó al vacío. La resina peptídica resultante (2.4 g; Bcz-D-Phe-D-Phe-DLeu-DLys-homopiperazina-[carbamato resina Wang]) se dividió de nuevo y se utilizó una porción de 0.6 g (0.3 mmol) para la derivatización subsecuente (N-metilación).

40 La metilación de la función ω -amino de D-Lys en Xaa₄ se llevó a cabo en tres pasos: (i) [Protección *o*-NBS]: El péptido unido a la resina (0.3 mmol) se trató primero con una solución de *o*-NBS-Cl (0.4 g, 2 mmol) y colidina (0.7 ml, 5 mmol) en NMP (7 ml) a temperatura ambiente durante 30 min. La resina se lavó posteriormente con NMP. (ii) [N-metilación]: El péptido unido a la resina protegido por *o*-NBS se hizo reaccionar posteriormente con una solución de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0.5 ml, 3 mmol) y dimetilsulfato (1.0 ml, 10 mmol; Aldrich) en NMP (7 ml) a temperatura ambiente durante 5 min. La resina se lavó posteriormente con NMP y el proceso de lavado se repitió una vez más. (iii) [Desprotección *o*-NBS]: La resina peptídica se trató con una solución de mercaptoetanol (0.7 ml, 10 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0.8 ml, 5 mmol) en NMP (7 ml) a temperatura ambiente durante 5 min. La resina se lavó posteriormente con NMP y el proceso de lavado se repitió una vez más.

50 Para proteger la amina N-metil secundaria resultante de D-Lys en Xaa₄, el péptido metilado unido a la resina se hizo reaccionar con una solución de Bcz-OSu (6 mmol) en DMF (7 ml). La resina se lavó con DMF y DCM, y se secó al vacío. Posteriormente, el péptido se escindió de la resina por tratamiento con una solución de TFA/DCM (15 mL, v/v = 1:1) a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se filtró posteriormente y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (0.3 mmol; Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Me,Bcz)-[homopiperazinamida]) precipitó de dietiléter.

55 Para la guanilación en el C terminal de la homopiperazina, el péptido anterior (0.3 mmol) se trató con una solución de clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamida (0.4 g, 3.0 mmol) y DIEA (0.5 ml, 6 mmol) en DMF (3 ml) durante la noche a temperatura ambiente. Se añadieron ácido acético y H₂O para detener la reacción y la solución se congeló y se secó en un liofilizador para dar el péptido deseado protegido, Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Me,Z)-[4-amidinohomopiperazinamida] (0.6 g).

Para la desprotección/hidrólisis final, se trató el péptido anterior (0.6 g) con una mezcla de TMSOTf/TFA/m-cresol (10 ml, v/v/v = 2:7:1) a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se evaporó y el péptido crudo (0.6 g) precipitó de dietiléter.

5 Para la purificación, el péptido crudo derivado anterior (0.6 g) se disolvió en TFA 0.1% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponante de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B, de B 25% a B 75% durante 30 min, t_R = B 37%. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se secaron en un liofilizador para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (153 mg). Análisis HPLC: t_R = 14.41 min, pureza de 99.8%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 692.5, observada de 692.5.

EJEMPLO 2: Síntesis del Compuesto (2):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 2):

15 Véanse el esquema de la Figura 2 y Biron *et al.*, Optimized selective N-methylation of peptides on solid support. *J. Peptide Science* 12: 213-219 (2006). Los derivados aminoácídicos utilizados fueron Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Dde)-OH y ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil)carboxílico. Los análisis HPLC y MS se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (1) anterior.

20 El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó manualmente partiendo de una resina cloruro de 2-clorotritilo (1.8 g, 0.9 mmol; Peptide International). El enlace de ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil)carboxílico seguido de la elongación de la cadena peptídica y la desprotección de Dde en D-Lys(Dde) en Xaa₄ se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1). Véase la descripción anterior. La resina peptídica resultante (0.9 mmol; Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinilcarboxílico)-[resina 2-Cl-Trt]) se dividió y se utilizó una porción de 0.3 mmol para la escisión subsecuente. La resina peptídica (0.3 mmol) se trató posteriormente con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 min. La resina se filtró después y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (0.3 mmol; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH) precipitó de dietiléter.

30 Para la purificación, el péptido crudo (0.3 mmol) se disolvió en ácido acético 2% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponado de TEAP con un pH 5.2 (tampones A = TEAP 5.2 y B = TEAP 5.2, 20%, en ACN 80%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B, B 7% hasta B 37% en el transcurso de 60 min. Las fracciones con pureza mayor del 95% se combinaron y la solución resultante se diluyó con dos volúmenes de agua. La solución diluida se introdujo posteriormente en una columna de HPLC para el intercambio salino y para purificar además con un sistema tamponado de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 80%/H₂O 20%) y un gradiente lineal de tampón B, B 2% hasta B 75% en el transcurso de 25 min. Las fracciones con pureza mayor del 97% se combinaron, se congelaron y se secaron en un liofilizador para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (93 mg). Análisis HPLC: t_R = 16.43 min, pureza de 99.2%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 680.4, observada de 680.3.

El Compuesto (2) también se preparó utilizando un esquema de reacción análogo al que se muestra en la Figura 2 con los siguientes derivados aminoácídicos: Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH y ácido Boc-4-amino-1-Fmoc-(piperidin)-4-carboxílico.

40 El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó manualmente partiendo de una resina cloruro de 2-clorotritilo (PS 1%DVB, 500 g, 1 meq/g). La resina se trató con ácido Boc-4-amino-1-Fmoc-4-(piperidin)-4-carboxílico (280 g, 600 mmol) en una mezcla de DMF, DCM y DIEA (260 mL de cada uno) añadida. La mezcla se agitó durante 4 horas y posteriormente la resina se cubrió durante 1h mediante la adicción de MeOH (258 mL) y DIEA.

(258 mL). La resina se aisló y se lavó con DMF (3 x 3 L). La resina que contenía el primer aminoácido se trató con piperidina en DMF (3 x 3 L of 35%), se lavó con DMF (9 x 3 L) y se acopló Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (472 g) utilizando PyBOP (519 g) en presencia de HOBt (153 g) y DIEA (516 mL) en DCM/DMF (500 mL / 500 mL) con agitación durante 2.25 horas. La resina que contenía el dipéptido se aisló y se lavó con DMF (3 x 3.6 L). El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con piperidina en DMF (3 x 3.6 L del 35%) y la resina se lavó con DMF (9 x 3.6 L) y se trató con Fmoc-D-Leu-OH (354 g), DIC (157 mL) y HOBt (154 g) en DCM/DMF (500 mL / 500 mL) y se agitó durante 1 hora. El subsecuente lavado con DMF (3 x 4.1 L) seguido de la escisión del grupo Fmoc con piperidina en DMF (3 x 4.2 L del 35%) y el posterior lavado de la resina con DMF (9 x 4.2 L) proporcionó el tripéptido unido a la resina. Este material se trató con Fmoc-D-Phe-OH (387 g), DIC (157 mL) y HOBt (153 g) en DCM/DMF (500 mL / 500 mL) y se agitó durante la noche. La resina se aisló, se lavó con DMF (3 x 4.7 L) y posteriormente se trató con piperidina en DMF (3 x 4.7 L of 35%) para escindir el grupo Fmoc y posteriormente se lavó de nuevo con DMF (9 x 4.7 L). La resina cargada con el tetrapéptido se trató con Fmoc-D-Phe-OH (389 g), DIC (157 mL) y HOBt (154 g) en DCM/DMF (500 mL / 500 mL) y se agitó durante 2.25 horas. La resina se aisló, se lavó con DMF (3 x 5.2 L) y posteriormente se trató con piperidina (3 x 5.2 L del 35%) en DMF. La resina se aisló y se lavó secuencialmente con DMF (9 x 5.2 L) seguido de DCM (5 x 5.2 L). Se secó para obtener un rendimiento del 90.4% del péptido protegido unido a la resina. El péptido se escindió de la resina utilizando TFA/ agua (4.5 L, 95/5), que también sirvió para eliminar los grupos protectores Boc. La mezcla se filtró, se concentró

(1/3) y posteriormente precipitó mediante la adición de MTBE (42 L). Se recogió el sólido por filtración y se secó a presión reducida para dar el péptido crudo.

5 Para la purificación, el péptido crudo se disolvió en TFA 0.1% en H₂O y se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa (C18) utilizando un gradiente TFA 0.1% /agua - ACN como fase móvil. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 95%, se concentraron y liofilizaron para dar el péptido puro (> 95.5% de pureza). El intercambio iónico se llevó a cabo utilizando una resina de intercambio iónico Dowex, eluyendo con agua. Se filtró la fase acuosa (cápsula de filtración de 0.22 µm) y se liofilizó para dar la sal acetato del péptido (rendimiento global, 71.3%, >99% de pureza).

EJEMPLO 3: Síntesis del Compuesto (3):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 1):

10 La síntesis se inició con 0.3 mmol de la resina peptídica: Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinilcarboxílico)-[resina 2-Cl-Trt], la cual se preparó durante la síntesis del Compuesto (2) como se describió anteriormente. Los análisis HPLC y MS también se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (2) anterior.

15 Para la metilación de la función ω-amino de D-Lys en Xaa₄, se siguió un procedimiento de tres pasos como el descrito en la síntesis del Compuesto (1). Véase la descripción anterior. El péptido metilado unido a la resina (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinilcarboxílico)-[resina 2-Cl-Trt]) se trató posteriormente con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 min. La resina se filtró posteriormente y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (0.3 mmol; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ácido ω(4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH) precipitó de dietiléter.

20 El péptido crudo (0.3 mmol) se purificó mediante HPLC preparativa de acuerdo con el protocolo descrito en la síntesis del Compuesto (2). Véase la descripción anterior. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se secaron en un liofilizador para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (185 mg). Análisis HPLC: t_R = 16.93 min, pureza de 99.2%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 694.4, observada de 694.4.

25 EJEMPLO 4: Síntesis del Compuesto (4):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 2):

30 Los derivados aminoácidos utilizados fueron Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Dde)-OH y N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina. Los análisis HPLC y MS se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (1). Véase la descripción detallada anterior. El esquema seguido fue sustancialmente con el que se muestra en la Figura 2, a no ser porque se mediaron los acoplamientos con HATU/DIEA en vez de con DIC.

35 El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó manualmente partiendo de una resina cloruro de 2-clorotritilo (3.2 g, 2.4 mmol; NeoMPS). El enlace del primer aminoácido a la resina se consiguió por tratamiento con una mezcla de N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina (2.0 g, 4.8 mmol) y DIEA (3.3 ml, 19.2 mmol) en DCM (40 ml) y DMF (10 ml) a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se lavó con 3x DCM/MeOH/DIEA (v/v/v = 17:2:1) y 3x DCM, y se secó al vacío. La resina resultante (3.7 g; N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]) se dividió en varias porciones y una porción de 1.9 g (1.2 mmol) se utilizó para continuar la síntesis peptídica. Los acoplamientos individuales mediados por HATU/DIEA se realizaron con un exceso de 3 veces más de los derivados aminoácidos. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina 25% en DMF. Una vez terminada la elongación de la cadena peptídica, la resina se trató con hidrazina 4% en DMF tres veces durante 3 min para la eliminación de Dde. La resina se lavó con DMF y DCM, y se secó al vacío. La resina peptídica resultante (2.1 g; Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]) se dividió de nuevo y se utilizó una porción de 0.7 g (0.4 mmol) para la escisión subsecuente. Se trató la resina peptídica con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 min. La resina se filtró y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (220 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) precipitó de dietiléter.

45 Para la purificación, el péptido crudo anterior (220 mg) se disolvió en TFA 0.1% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponante de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B, de B 25% a B 75% durante 25 min, t_R = B 43%. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se secaron en un liofilizador para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (89 mg). Análisis HPLC: t_R = 18.22 min, pureza de 99.5%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 734.5, observada de 734.4.

EJEMPLO 5: Síntesis del Compuesto (5):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 3):

La resina peptídica: Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], la cual se preparó durante la síntesis del Compuesto (4) como se describió anteriormente, se utilizó como material de partida. Los análisis HPLC y MS se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (1) anterior.

- 5 Para la guanilización de la función ω -amino de D-Lys en Xaa₄, se trató la resina peptídica (0.7 g, 0.4 mmol) con una mezcla de clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamida (0.6 g, 4.0 mmol) y DIEA (0.7 ml, 4.0 mmol) en DMF (15 ml) durante la noche a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF y DCM, y se secó al vacío. El péptido se escindió posteriormente de la resina por tratamiento con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 min. La resina se filtró y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (170 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) precipitó de dietiléter.
- 10 Para la purificación, el péptido crudo anterior (170 mg) se disolvió en TFA 0.1% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponante de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B, de B 25% a B 75% durante 25 min, t_R = B 46%. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se liofilizaron para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (81 mg). Análisis HPLC: t_R = 19.42 min, pureza de 100%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 776.5, observada de 776.5.

EJEMPLO 6: Síntesis del Compuesto (6):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 1):

- 20 La síntesis se inició con 0.7 g (0.4 mmol) de la resina peptídica, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], la cual se preparó durante la síntesis del Compuesto (4) como se describió anteriormente. Los análisis HPLC y MS se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (1) anterior. En este caso, el péptido Xaa₁-Xaa₄ se sintetizó previamente y se acopló en a diferencia del ensamblaje paso a paso del péptido que se muestra en la Figura 2.

- 25 Para la metilación de la función ω -amino de D-Lys en Xaa₄, se siguió un procedimiento de tres pasos como el descrito en la síntesis del Compuesto (1) anterior. El péptido metilado unido a la resina, (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -Me)D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]), se trató posteriormente con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 minutos. La resina se filtró y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (200 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) precipitó de dietiléter.

- 30 Para la purificación, el péptido crudo anterior (200 mg) se disolvió en TFA 0.1% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponante de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de 25% a 75% del tampón B durante 30 min, t_R = B 42%. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se secaron en un liofilizador para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (41 mg). Análisis HPLC: t_R = 18.66 min, pureza de 98.1%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 748.5, observada de 748.5.

EJEMPLO 7: Síntesis del Compuesto (7):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 4):

- 40 Los derivados aminoácidos utilizados fueron Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH y Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH. Los análisis HPLC y MS se realizaron como en la síntesis del Compuesto (1) descrita anteriormente. El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó en un sintetizador múltiple SYMPHONY (Protein Technology Inc.) partiendo de la homopiperazina carbamato resina Wang (0.35 mmol; homopiperazina-[carbamato resina Wang]) que se preparó durante la síntesis del Compuesto (1). Los acoplamientos individuales mediados por HBTU/DIEA se realizaron con un exceso de 4 veces más de los derivados aminoácidos. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina 25% en DMF. Una vez terminada la elongación de la cadena peptídica, la resina peptídica (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg(Pbf)-[homopiperazinamida]) se transfirió a un recipiente de síntesis peptídica manual y se trató con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (15 ml, v/v/v = 95:2.5:2.5) a temperatura ambiente durante 90 min. La resina se filtró y se lavó con TFA. El filtrado se evaporó al vacío y el péptido crudo (380 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[homopiperazinamida]) precipitó de dietiléter.

- 50 Para la purificación, el péptido crudo anterior (380 mg) se disolvió en TFA 0.1% en H₂O (50 ml) y la solución se introdujo en una columna de HPLC y se purificó utilizando un sistema tamponante de TFA (tampones A = TFA 0.1% en H₂O y B = TFA 0.1% en ACN 60%/H₂O 40%). El compuesto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B, de B 25% a B 75% durante 25 min, t_R = B 36%. Se combinaron las fracciones con pureza mayor del 97%, se congelaron y se liofilizaron para dar el péptido purificado como un polvo blanco amorfo (222 mg). Análisis HPLC: t_R = 16.75 min, pureza de 100%, gradiente de B 2% a B 22% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 664.4, observada de 664.5.

EJEMPLO 8: Síntesis del Compuesto (8):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)-OH] (SEQ ID NO: 3):

Este compuesto se preparó esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para la síntesis del Compuesto (5) salvo que el ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil)carboxílico se sustituyó por N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina en el enlace a la resina 2-Cl-Trt. Péptido final purificado: polvo amorfo, 85 mg de rendimiento en una síntesis a escala 1 mmol. Análisis HPLC: t_R = 17.87 min, pureza de 100%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS ($M+H^+$): masa molecular iónica esperada de 722.4, observada de 722.5.

EJEMPLO 9: Síntesis del Compuesto (9):

10 D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ϵ -iPr)D-Lys-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 5):

La síntesis se inició con 0.15 mmol de la resina peptídica, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinilcarboxílico)-[resina 2-Cl-Trt], la cual se preparó durante la síntesis del Compuesto (2) anterior. Para la isopropilación de la función ω -amino de D-Lys en Xaa₄, se trató la resina peptídica con una mezcla de triacetoxiborohidruro sódico (3 mmol) y acetona (6 mmol) en TMOF (10 mL) durante 4 h a temperatura ambiente. Los pasos subsecuentes de escisión y purificación se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (2). Péptido final purificado: polvo amorfo, 67 mg de rendimiento. Análisis HPLC: t_R = 19.29 min, pureza de 98.4%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS ($M+H^+$): masa molecular iónica esperada de 722.5, observada de 722.5.

EJEMPLO 10: Síntesis del Compuesto (10):

20 D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β -amidino)D-Dap-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 6):

Véase el esquema de la Figura 3. Los derivados aminoacídicos utilizados fueron Boc-D-Phe-OH, Boc-D-Phe-OH, Boc-D-Leu-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH y ácido N-Fmoc-amino-(4-N-Boc-piperidinil)carboxílico. Los análisis HPLC y MS se realizaron como se describió en la síntesis del Compuesto (1). El péptido unido a una resina totalmente protegido se sintetizó manualmente partiendo de una resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoilo AM NovaGel (3 mmol; Novabiochem). Primero, el grupo protector Fmoc en la resina de partida se eliminó con piperidina 25% en DMF y posteriormente la resina se trató con una mezcla de ácido N-Fmoc-amino-(4-N-Boc-piperidinil)carboxílico (7.5 mmol), PyBOP (7.5 mmol) y DIEA (15 mmol) en DMF durante la noche a temperatura ambiente. El grupo Fmoc en el aminoácido enlazado se sustituyó por α -NBS en dos pasos: (i) eliminación de Fmoc con piperidina 25% en DMF. (ii) protección α -NBS de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1). La resina peptídica resultante, ácido N- α -NBS-amino-(4-N-Boc-piperidinil)carboxílico-[resina hidrazinobenzoilo AM NovaGel], se dividió en varias porciones y se utilizó una porción de 1 mmol para continuar la síntesis peptídica. Los acoplamientos individuales mediados por PyBOP/DIEA se realizaron con un exceso de 3 veces más de los derivados aminoacídicos. El grupo Boc se eliminó con TFA 30% en DCM. Una vez terminada la elongación de la cadena peptídica, la resina se trató con DBU 2% en DMF durante 2 \times 8 min para la eliminación de Fmoc, seguida de la guanilación de la función ω -amino de D-Dap en Xaa₄ de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (5) anterior. La desprotección α -NBS final se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1).

Para la escisión oxidativa, la resina peptídica seca se mezcló con una mezcla de Cu(OAc)₂ (1 mmol), piridina (4 mmol) y DBU (2 mmol) en 5% H₂O en DMF y se dejó burbujear aire a través de la resina durante 6 h a temperatura ambiente. La resina se filtró y se lavó con DMF y el filtrado se evaporó al vacío. β El residuo, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β -amidino)D-Dap-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH, se trató con TFA 95% en H₂O para la eliminación de Boc. La solución se evaporó al vacío y el péptido crudo (1 mmol; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β -amidino)D-Dap-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH) precipitó de dietiléter.

La purificación del péptido crudo anterior se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la síntesis del Compuesto (2). El péptido purificado era un polvo amorfo (16 mg). Análisis HPLC: t_R = 16.97 min, pureza de 99.9%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS ($M+H^+$): masa molecular iónica esperada de 680.4, observada de 680.4.

EJEMPLO 11: Síntesis del Compuesto (11):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH (SEQ ID NO: 7):

Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (10), salvo que Boc-D-Dbu(Fmoc)-OH se sustituyó por Boc-D-Dap(Fmoc)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 23 mg de rendimiento en una síntesis a escala 1 mmol. Análisis HPLC: t_R = 17.12 min, pureza de 99.2%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS ($M+H^+$): masa molecular iónica esperada de 694.4, observada de 694.5.

EJEMPLO 12: Síntesis del Compuesto (12):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 8):

Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (4), como se describió anteriormente. La diferencia fue la sustitución de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH por Fmoc-D-Lys(Dde)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 7 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.4 mmol. Análisis HPLC: t_R = 18.15 min, pureza de 98.9%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 706.4, observada de 706.4.

EJEMPLO 13: Síntesis del Compuesto (13):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 7):

La síntesis se inició con 0.4 mmol de la resina peptídica, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], la cual se preparó durante la síntesis del Compuesto (12). La guanilación de la función ù-amino de D-Dbu e Xaa₄ se consiguió de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (5) anterior. Los pasos subsecuentes de escisión y purificación se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1). Péptido final purificado: polvo amorfo, 7 mg de rendimiento. Análisis HPLC: t_R = 18.68 min, pureza de 97.3%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 748.5, observada de 748.5.

EJEMPLO 14: Síntesis del Compuesto (14):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dap(amidino)-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 6):

Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (13), salvo que Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH se sustituyó por Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 12 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.4 mmol. Análisis HPLC: t_R = 18.55 min, pureza de 98.0%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 734.4, observada de 734.4.

EJEMPLO 15: Síntesis del Compuesto (15):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 2):

El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1), salvo que se omitió la metilación de la función ω-amino de D-Lys en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 140 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 14.02 min, pureza de 99.3%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 678.4, observada de 678.5.

EJEMPLO 16: Síntesis del Compuesto (16):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 3):

El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1), salvo que se sustituyó un paso de guanilación por la metilación de la función ω-amino de D-Lys en Xaa₄. La guanilación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (5) anterior. Péptido final purificado: polvo amorfo, 173 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 15.05 min, pureza de 98.6%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 720.5, observada de 720.5.

EJEMPLO 17: Síntesis del Compuesto (17):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 5):

El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1), salvo que se sustituyó un paso de isopropilación por la metilación de la función ω-amino de D-Lys en Xaa₄. La isopropilación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (9). Péptido final purificado: polvo amorfo, 233 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 16.16 min, pureza de 94.5%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 720.5, observada de 720.5.

EJEMPLO 18: Síntesis del Compuesto (18):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (16), salvo por la sustitución de Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH por Fmoc-D-Lys(Dde)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 155 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R

= 14.44 min, pureza de 99.1%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 678.4, observada de 678.5.

EJEMPLO 19: Síntesis del Compuesto (19):

D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[4-amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

5 Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (18), salvo por la sustitución de Fmoc-D-Nle-OH por Fmoc-D-Leu-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₃. Péptido final purificado: polvo amorfo, 190 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 14.69 min, pureza de 98.9%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 678.2, observada de 678.5.

10 EJEMPLO 20: Síntesis del Compuesto (20):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

15 El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (18), salvo que se omitió la guanilación de la homopiperazina en su C terminal. Péptido final purificado: polvo amorfo, 172 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 13.84 min, pureza de 99.1%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 636.4, observada de 636.5.

EJEMPLO 21: Síntesis del Compuesto (21):

D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[homopiperazinamida] (SEQ ID NO: 6):

20 El compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (19), salvo que se omitió la guanilación de la homopiperazina en su C terminal. Péptido final purificado: polvo amorfo, 149 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 14.06 min, pureza de 98.5%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 636.4, observada de 636.5.

EJEMPLO 22: Síntesis del Compuesto (22):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 8):

25 Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (15), salvo por la sustitución de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH por Fmoc-D-Lys(Dde)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 152 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 14.03 min, pureza de 98.1%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 650.4, observada de 650.5.

EJEMPLO 23: Síntesis del Compuesto (23):

30 D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 7):

35 Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (16), salvo por la sustitución de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH por Fmoc-D-Lys(Dde)-OH en el acoplamiento del derivado aminoacídico en Xaa₄. Péptido final purificado: polvo amorfo, 227 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 14.37 min, pureza de 99.3%, gradiente de B 5% a B 25% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 664.4, observada de 664.5.

EJEMPLO 24: Síntesis del Compuesto (24):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[4-Amidinohomopiperazinamida] (SEQ ID NO: 4):

40 El compuesto se preparó mediante la guanilación en el C terminal de la homopiperazina de Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[homopiperazinamida], la cual se sintetizó de acuerdo con el procedimiento que se describe en la síntesis del Compuesto (7), descrito anteriormente. Los pasos subsiguientes de escisión y purificación se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis del Compuesto (1) anterior. Péptido final purificado: polvo amorfo, 102 mg de rendimiento en una síntesis a escala 0.3 mmol. Análisis HPLC: t_R = 17.34 min, pureza de 98.4%, gradiente de B 2% a B 22% en el transcurso de 20 min; MS (M+H⁺): masa molecular iónica esperada de 706.5, observada de 706.5.

EJEMPLO 25: Síntesis del Compuesto (25):

45 D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

Estas síntesis se llevaron a cabo de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 4. Los intermedios descritos a continuación se corresponde con los que se muestran en la Figura 4. A una suspensión de Boc-D-Phe-OH Intermedio I-1 (7.96 g, 30.0 mmol), D-Leu-OBn p-TsOH Intermedio I-2 (11.80 g, 30.0 mmol), HOBt monohidrato (4.46 g, 33.0 mmol) y DIEA (8.53 g, 66.0 mmol) en THF anhidro (250 mL) enfriada en un baño de agua helada se le añade EDCI (6.33 g, 33.0

5 mmol) en cuatro porciones en el transcurso de 20 minutos con 5 minutos entre cada adición. La suspensión se agitó durante la noche desde una temperatura inicial de 0 °C hasta temperatura ambiente. Tras evaporar el THF, el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con ácido cítrico 10%, NaHCO₃ saturado y agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM, se hizo pasar a través de un tampón de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo 20% en hexanos. El eluido se evaporó para dar el producto puro, Boc-D-Phe-D-Leu-OBn, intermedio I-3 (12.40 g, 88%) como un aceite transparente. LC-MS: m/z = 469 (M+H).

10 El Intermedio I-3 (12.40 g, 26.5 mmol) se disolvió en DCM (50mL). Se añadió TFA (25 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras evaporar el DCM y el TFA, se formó un azeótropo del residuo con tolueno dos veces para dar la sal de TFA y de D-Phe-Leu-OBn, Intermedio I-4. Este dipéptido crudo se suspendió en THF, y a esta suspensión se le añadieron Boc-D-Phe-OH (6.36 g, 24 mmol), HOBt monohidrato (4.04 g, 26.4 mmol) y DIEA (8.7 mL, 50.0 mmol) a 0 °C. Se añadió EDCI (6.33 g, 6.4 mmol) en cuatro porciones en el transcurso de 20 minutos con 5 minutos entre cada adición. La suspensión se agitó de 0 °C a temperatura ambiente durante la noche. Tras evaporar el THF, el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con ácido cítrico 10%, NaHCO₃ saturado y agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. El residuo se cristalizó de 400 mL de acetona/hexanos (1:3) para dar 9.1 g del producto puro. Las aguas madres se evaporaron y se recrystalizaron de nuevo de acetona/hexanos (1:3) para dar 2.0 g del producto. El rendimiento total fue de 11.1 g (68% para dos etapas). LC-MS: m/z = 616 (M+H).

20 En un matraz purgado con nitrógeno se añadió paladio sobre carbón húmedo (1.8 g) y una solución de Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-OBn, Intermedio I-5 (11.1 g, 18.05 mmol) en metanol (50 mL). La mezcla se agitó con un globo de hidrógeno acoplado durante la noche. Tras la filtración a través de celita, se evaporó el metanol a presión reducida. El residuo se disolvió en acetona (20 mL) y se añadió lentamente a 500 mL de agua con 25 mL e 1N HCl con agitación vigorosa. El producto puro Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-OH, Intermedio I-6 se obtuvo por filtración, 9.4 g (99%). LC-MS: m/z = 526 (M+H).

25 A una solución del Intermedio I-6 (2.06 g, 3.90 mmol), clorhidrato de D-Lys(Boc)-OAll (1.26 g, 3.90 mmol) y DIEA (1.7 ml, 9.8 mmol) en DMF se le añadió TBTU (1.56 g, 4.88 mmol) en tres porciones en el transcurso de 15 min a 0 °C. Tras agitar durante la noche desde una temperatura inicial de 0 °C a temperatura ambiente, se evaporó el DMF a alto vacío. La mezcla de reacción cruda precipitó en 400 ml de agua helada y el precipitado se filtró y se recogió, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Boc)-OAll Intermedio I-7 (2.60 g), el cual se utilizó sin purificación posterior en el siguiente paso.

30 A una solución del Intermedio I-7 (2.60 g, 3.3 mmol) en MeCN (75 mL) se le añadieron pirrolidina (1.1 ml, 13.3 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (400 mg, 0.35 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de fase inversa con MeCN 30%/agua hasta MeCN 90%/agua para dar el ácido puro, Intermedio I-8 (2.0 g, 80%) después de la evaporación de acetonitrilo/agua. LC-MS: m/z = 754 (M+H).

35 Se añadió HBTU (11.3 mg, 3.0 mmol) a una solución del ácido, Intermedio I-8 (150 mg, 0.20 mmol), la amina HNR_aR_b, 2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona (57 mg, 0.30 mmol) y DIEA (175 µl, 1.0 mmol) en DMF (5 mL) a 0 °C. Tras agitar durante la noche desde una temperatura inicial de 0 °C hasta temperatura ambiente, se evaporó el DMF a presión reducida. El residuo se agitó con HCl 4N en 1,4-dioxano (2.0 mL) a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras eliminar el dioxano, el residuo se disolvió en agua y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa con un gradiente de MeCN 10% /agua hasta MeCN 60%/agua en 30 minutos para dar el producto puro, Compuesto (25) (108 mg, 78% de rendimiento para las dos etapas) tras la evaporación del solvente. LC-MS: m/z = 690 (M+H).

40 EJEMPLO 26: Síntesis del Compuesto (26):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[2-metil-2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (26) se preparó esencialmente como se describió para el Compuesto 25 anterior, salvo que la amina (HNR_aR_b en el esquema de la Figura 4) en el paso final de acoplamiento mediante enlace amida fue 2-metil-2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona en vez de 2,8-diazaespiro[4,5]decan-1-ona. LC-MS: m/z = 704 (M+H).

45 EJEMPLO 27: Síntesis del Compuesto (27):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1,3,8-triazaespiro[4,5]decan-2,4-diona-amida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (27) se preparó esencialmente como se describió para el Compuesto (25) anterior, salvo que se utilizó la amina 1,3,8-triazaespiro[4,5]decan-2,4-diona en el paso final. LC-MS: m/z = 705 (M+H).

EJEMPLO 28: Síntesis del Compuesto (28):

50 D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3)H-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (28) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3)H-ona. LC-MS: m/z = 394.

EJEMPLO 29: Síntesis del Compuesto (29):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[morfolino(piperidin-4-il)metanonamida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (29) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina morfolino(piperidin-4-il)metanona. LC-MS: m/z = 366.

EJEMPLO 30: Síntesis del Compuesto (30):

5 D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-fenil-1-(piperidinil-1*H*-imidazol-2(3*H*)-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (30) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 4-fenil-1-(piperidinil-1*H*-imidazol-2(3*H*)-ona. LC-MS: m/z = 779 (M+H).

EJEMPLO 31: Síntesis del Compuesto (31):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidinamida] (SEQ ID NO: 2):

10 El Compuesto (31) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidina. LC-MS: m/z = 716 (M+H).

EJEMPLO 32: Síntesis del Compuesto (32):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-(piperidin-4-il)indolin-2-onamida] (SEQ ID NO: 2):

15 El Compuesto (32) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 1-(piperidin-4-il)indolin-2-ona.

LC-MS: m/z = 752 (M+H).

EJEMPLO 33: Síntesis del Compuesto (33):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-fenil-1,3,8-triazaespiro[4.5]decan-4-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

20 El Compuesto (33) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 1-fenil-1,3,8-triazaespiro[4.5]decan-4-ona. LC-MS: m/z = 767 (M+H).

EJEMPLO 34: Síntesis del Compuesto (34):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[imidazo[1,2-*a*]piridin-2-ilmetanaminamida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (34) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina imidazo[1,2-*a*]piridin-2-ilmetanamina. LC-MS: m/z = 683 (M+H).

25 EJEMPLO 35: Síntesis del Compuesto (35):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[(5-metilpirazin-2-il)metilaminamida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (35) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina (5-metilpirazin-2-il)metanamina en el paso final. LC-MS: m/z = 659 (M+H).

EJEMPLO 36: Síntesis del Compuesto (36):

30 D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(3*H*)-ona-amida] (SEQ ID NO: 2):

El Compuesto (36) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(3*H*)-ona. LC-MS: m/z = 753 (M+H).

EJEMPLO 37: Síntesis del Compuesto (37):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]piridinamida] (SEQ ID NO: 2):

35 El Compuesto (37) se preparó esencialmente como se describió anteriormente para el Compuesto (25), salvo que se utilizó la amina 4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]piridina. LC-MS: m/z = 659 (M+H).

EJEMPLO 38: Ratificación de las estructuras de las amidas de péptidos sintéticos (1)-(24)

40 La Tabla I muestra el peso molecular calculado del ión molecular, MH⁺, para cada compuesto y el peso molecular real observado por espectrometría de masas. También se muestra el tipo de fase sintética utilizada en la síntesis de cada compuesto: fase sólida o mezclada; y el tipo de resina utilizada en la síntesis, bien sea una resina 2-clorotritilo "2-Cl-Trt",

una resina hidrazinobenzolillo "hidrazina" o una resina p-nitrofenilcarbonato (Wang) "carbonato". El número de la figura que muestra el esquema sintético relevante para la síntesis de cada compuesto se muestra en la última columna.

Tabla I Síntesis y ratificación de las estructuras de los compuestos (1)-(24)

COMPUESTO	MH+ CALCULADO	MH+ OBSERVADO	FASE SINTÉTICA	RESINA	FIGURA
1	692.5	692.5	mezclada	Carbonato	1
2	680.4	680.3	sólida	2-Cl-Trt	2
3	694.4	694.4	sólida	2-Cl-Trt	2
4	734.5	734.4	sólida	2-Cl-Trt	2
5	776.5	776.5	sólida	2-Cl-Trt	2
6	748.5	748.5	sólida	2-Cl-Trt	2
7	664.4	664.5	sólida	Carbonato	1
8	722.4	722.5	sólida	2-Cl-Trt	2
9	722.5	722.5	sólida	2-Cl-Trt	2
10	680.4	680.4	sólida	hidrazina	3
11	694.4	694.5	sólida	hidrazina	3
12	706.4	706.4	sólida	2-Cl-Trt	2
13	748.5	748.5	sólida	2-Cl-Trt	2
14	734.4	734.4	sólida	2-Cl-Trt	2
15	678.4	678.5	mezclada	Carbonato	1
16	720.5	720.5	mezclada	Carbonato	1
17	720.5	720.5	mezclada	Carbonato	1
18	678.4	678.5	mezclada	Carbonato	1
19	678.4	678.5	mezclada	Carbonato	1
20	636.4	636.5	sólida	Carbonato	1
21	636.4	636.5	sólida	Carbonato	1
22	650.4	650.5	mezclada	Carbonato	
23	692.4	692.5	mezclada	Carbonato	1
24	706.5	706.5	mezclada	Carbonato	1

5 EJEMPLO 39: Inhibición de la producción de cAMP mediante la estimulación del receptor opioide kappa endógeno de ratón en células R1.G1.

10 Se determinó la potencia de las amidas de péptidos sintéticos como agonistas de receptores opioides kappa midiendo la inhibición de la actividad adenilato ciclasa estimulada por forskolina. Las células R1.G1 (una línea celular de timona de ratón que expresa únicamente el receptor opioide kappa y ningún otro subtipo de receptor opioide) se sometieron primero a forskolina (para inducir cAMP) junto con la amida de péptido sintético en la concentración de ensayo. Después de la incubación, el nivel de cAMP en las células R1.G1 estimuladas se determinó utilizando un inmunoensayo cAMP (LANCETM, Perkin Elmer) basado en la transferencia de energía fluorescente por resonancia con resolución temporal (TR-FRET). El método detallado se describe a continuación:

Las células R1.G1 de ratón (ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en suspensión en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Cellgro, Herndon, VA) con alto contenido en glucosa que contenía suero equino 10% y glutaMax 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) sin antibióticos añadidos. El día del experimento, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron una vez con HBSS (Solución salina tamponada de HEPES, Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en el tampón estimulante (HBSS con FAF-BSA 0.05% (albúmina de suero bovino sin ácidos grasos, Roche Applied Science, Indianapolis, IN), HEPES 5 mM) hasta una densidad de 2 millones de células por ml. Se añadió después el anticuerpo provisto con el kit de inmunoensayo cAMP LANCE™ a las células según las instrucciones del fabricante, y se añadieron posteriormente 12 000 células por pocillo a los pocillos que contenían forskolina hasta una concentración predeterminada fijada final (normalmente aproximadamente 2.5 μ M) y la cantidad previamente determinada de la amida de péptido sintético a ensayar. Las amidas de péptidos sintéticos se ensayaron en un intervalo de concentraciones para determinar su potencia. Las células se incubaron con la amida de péptido sintético junto con forskolina durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lisaron mediante la adición de 12 μ l de la mezcla de detección provista con el kit LANCE™, seguido de la incubación durante una hora a temperatura ambiente. La fluorescencia con resolución temporal se leyó utilizando un filtro para la excitación de 330 - 380 nm, un filtro para la emisión de 665 nm, un espejo dicróico 380 y Z = 1 mm. Una curva estándar para la concentración de cAMP en este ensayo hizo posible determinar la cantidad cAMP presente en cada pocillo. Se obtuvo una curva al representar la concentración de amida de péptido sintético frente a los niveles de cAMP en las células de ensayo y se sometió a una regresión no lineal utilizando un algoritmo para el ajuste a una curva de cuatro parámetros para calcular la CE₅₀, la concentración de la amida de péptido sintético requerida para producir el 50% de la supresión máxima de la producción de cAMP por parte de la amida de péptido sintético. La Tabla II muestra los valores de CE₅₀ obtenidos en este ensayo con los compuestos de amidas de péptidos sintéticos (1)-(36).

Tabla II Actividad y eficacia como agonistas opioides kappa

Compuesto N.º	mKOR		hKOR	
	CE ₅₀ (nM)	Eficacia (%)	CE ₅₀ (nM)	Eficacia (%)
(1)	0.043	103	0.15	97
(2)	0.048	96	0.16	99
(3)	0.052	96	0.16	100
(4)	0.075	94	0.15	92
(5)	0.034	89	0.17	98
(6)	0.036	89	0.13	100
(7)	0.012	98	0.11	100
(8)	0.043	90	0.12	96
(9)	0.078	96	0.17	100
(10)	0.826	90	0.30	86
(11)	0.052	92	0.15	82
(12)	0.055	89	0.17	100
(13)	0.032	88	0.13	90
(14)	0.349	86	0.21	81
(15)	0.028	92	0.11	92
(16)	0.021	105	0.11	96
(17)	0.039	103	0.10	102
(18)	1.02	103	1.15	93
(19)	2.152	99	nd	nd
(20)	0.491	102	0.39	84
(21)	0.732	103	1.06	99
(22)	0.095	103	0.18	86
(23)	0.091	104	0.17	84
(24)	0.036	97	0.09	93
(25)	0.0314	82	0.0027	101
(26)	0.0194	86	0.0083	99

Tabla II Actividad y eficacia como agonistas opioides kappa (Continuación)

Compuesto N.º	mKOR		hKOR	
	CE ₅₀ (nM)	Eficacia (%)	CE ₅₀ (nM)	Eficacia (%)
(27)	0.0056	87	<0.001	88
(28)	0.0582	83	0.0083	100
(29)	0.0464	86	0.0145	100
(30)	0.1293	88	0.0116	95
(31)	0.0216	86	0.0042	95
(32)	0.0485	92	0.005	102
(33)	0.0767	86	0.0165	101
(34)	0.3539	90	0.0208	101
(35)	0.0359	86	0.0064	99
(36)	0.0234	87	0.0052	100

sd – sin determinar; mKOR y hKOR – receptores opioides kappa de ratón y humano

EJEMPLO 40: Potencia de las amidas de péptidos sintéticos sobre el receptor opioide kappa humano

- 5 Se transfectoron células renales embrionarias humanas (HEK-293 cells, ATCC, Manassas, VA) en placas de 100 mm con el reactivo de transfección, Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals) y con constructos de ADN en una proporción de 3.3 a 1. Los constructos de ADN utilizados en las transfección fueron los siguientes: (i) un vector de expresión para el receptor opioide kappa humano, (ii) un vector de expresión para la proteína G quimérica humana y (iii) un constructo del gen indicador luciferasa en el cual la expresión de la luciferasa está inducida por el factor de transcripción sensible al calcio NFAT.
- 10 El factor de expresión que contenía el receptor opioide kappa humano se construyó como se indica a continuación: El gen OPRK1 humano se clonó a partir del ARN total del ganglio de la raíz dorsal humana por PCR y el gen se insertó en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para construir el vector de expresión pcDNA3-hOPRK1 de mamíferos del OPRK1 humano .
- 15 Para construir el vector de expresión de la proteína G quimérica, la proteína G quimérica Gαq5 se construyó reemplazando primero los 5 últimos aminoácidos de la Gαq humana por la secuencia de los 5 últimos aminoácidos de la Gαi mediante PCR. Se introdujo una segunda mutación en este gen Gαq5 humano en la posición aminoacídica 66 para sustituir una glicerina (G) con un ácido aspártico (D) mediante mutagénesis sitio-dirigida. Este gen se subclonó posteriormente en un vector de expresión pcDNA5/FRT de mamíferos (Invitrogen) para dar el vector de expresión de la proteína G quimérica humano, pcDNA5/FRT-hGNAq-G66D-i5.
- 20 Para preparar el constructo del gen indicador luciferasa, los elementos sintéticos de respuesta, incluidas tres copias de TRE (elementos sensibles a 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) y 3 copias de NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados), se incorporaron corriente arriba de un promotor mínimo de c-fos. Este elemento de respuesta y casete promotor se insertó posteriormente en un vector del gen indicador luciferasa pGL3-basic (Promega) para construir el constructo plásmido del gen indicador luciferasa pGL3b-3TRE-3NFAT-cfos-Luc.
- 25 La mezcla de transfección de cada placa de células incluía 6 microgramos de pcDNA3-hOPRK1, 6 microgramos de pcDNA5/FRT-hGNAq-G66D-i5 y 0.6 microgramos de pGL3b-3TRE-3NFAT-cfos-Luc. Las células se incubaron durante un día a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5% después de la transfección, y se colocaron en placas de 96 pocillos opacas con una densidad de 45 000 células por pocillo en 100 microlitros del medio. Al día siguiente, se añadieron los compuestos de referencia y de ensayo a las células en pocillos individuales. Se añadió un intervalo de
- 30 concentraciones de los compuestos de ensayo a un grupo de pocillos y se añadió un intervalo de concentraciones de los compuestos de referencia similar a un grupo de pocillos de control. Los pocillos se incubaron posteriormente durante 5 horas a 37°C. Al final de la incubación, las células se lisaron por adición de 100 microlitros de la mezcla de detección que contenía el sustrato de luciferasa (AMP (22ug/ml), ATP (1.1mg/ml), ditiotreitól (3.85 mg/ml), HEPES (concentración final 50mM), EDTA (0.2mg/ml), Triton N-101 (4ul/ml), ácido fenilacético (45ug/ml), ácido oxálico (8.5ug/ml) y luciferina (28ug/ml), pH 7.8). Las placas se sellaron y se realizó una lectura de su luminiscencia pasados 30 minutos. La
- 35 concentración de cada uno de los compuestos se representó frente al conteo de la luminiscencia por segundo (cps) y las curvas de respuesta resultantes se sometieron a una regresión no lineal utilizando un logaritmo para el ajuste a una curva de cuatro parámetros para calcular la CE₅₀ (la concentración de compuesto requerida para producir el 50% del aumento

máximo de la actividad luciferasa) y la eficacia (la activación máxima porcentual en comparación con la inducción completa por parte de cualquiera de los agonistas de receptores opioides kappa conocidos, tales como asimadolina (EMD-61753: véanse Joshi *et al.*, 2000, *J. Neurosci.* 20(15):5874-9) o U-69593: véase Heidbreder *et al.*, 1999, *Brain Res.* 616(1-2):335-8).

5 La Tabla II muestra los valores de CE₅₀ obtenidos del ensayo de inhibición de cAMP con los ejemplos ejemplificados sintetizados de acuerdo con la presente invención y ensayados sobre el receptor opioide kappa de ratón (mKOR) con ratificación de los resultados por duplicado sobre el receptor opioide kappa humano (hKOR) mediante los métodos escritos anteriormente.

10 Las amidas de péptidos sintéticos de la invención se ensayaron en un ensayo similar según su potencia sobre el receptor opioide mu humano. Cada compuesto ensayado poseyó una CE₅₀ para el receptor opioide mu humano mayor o igual a 1 uM.

EJEMPLO 41: Permeabilidad membranal de las amidas de péptidos sintéticos

15 La línea celular Caco-2 es una línea celular de adenocarcinoma de colon humano que se diferencia en cultivo y se utiliza como modelo del revestimiento epitelial interno del intestino delgado humano. Los compuestos de la presente invención se ensayaron en un ensayo de permeabilidad membranal utilizando el subclón TC7 de Caco-2 en un ensayo estándar (Cerep, Seattle, WA). En pocas palabras, el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) se determinó en la dirección apical a basolateral (A-B) a través de monocapas celulares cultivadas en filtros de membrana material policarbonado de 96 pocillos.

20 Los compuestos se ensayaron en concentraciones de 10 uM a pH 6.5 en DMSO 1% manteniendo el lado receptor a pH 7.4. La placa de ensayo se incubó durante 60 minutos a 37°C con agitación suave. Se tomaron muestras en el punto de tiempo cero del lado donante y al final del periodo de incubación tanto del lado donante como del lado receptor. Las muestras se analizaron por HPLC-MS/MS. El valor de P_{app} (expresado en 10⁻⁶ cm/sec) se calculó posteriormente en función de la velocidad de aparición del compuesto en el lado receptor. La P_{app} se calculó con la ecuación:

$$P_{app} = \frac{1}{S \cdot C_0} \left(\frac{dQ}{dT} \right)$$

25 donde P_{app} es la permeabilidad aparente; S es el área superficial de la membrana, C₀ es la concentración de donante en el tiempo 0 y dQ/dt es la cantidad de fármaco transportado en el tiempo. Se ensayaron al mismo tiempo cuatro compuestos (labetalol, propranolol, ranitidina y vinblastina) para garantizar la validez del ensayo, así como también asimadolina, que parece ser un opioide kappa de acción periférica. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III Permeabilidad membranal

Compuesto	Media de la Permeabilidad (cm ⁻⁶ /seg)
(1)	<0.10
(3)	<0.02
(6)	<0.02
Asimadolina	37.5
Labetalol	9.9
Propranolol	53.8
Ranitidina	0.5
Vinblastina	<0.2

30 Se cree que los compuestos que exhiben una permeabilidad baja en este tipo de ensayo tienen un potencial reducido para atravesar la barrera hematoencefálica *in vivo*, ya que una permeabilidad alta pasiva parece ser una característica clave en fármacos que actúan sobre el SNC (Mahar Doan *et al.* Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:1029-37).

EJEMPLO 42: Inhibición de citocromo P₄₅₀ oxidasas

La inhibición de las isoenzimas citocromo P₄₅₀ oxidasas CYP1A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 por parte de los compuestos de amida de péptido sintético de la invención se determinó de acuerdo con los siguientes métodos llevados a cabo por Cerep (Seattle, WA):

- 5 En el ensayo de citocromo P₄₅₀ CYP1A, los microsomas hepáticos humanos (0.2mg/ml de proteína) se incubaron durante 15 minutos a 37°C con el compuesto de ensayo 10 uM, etoxiresorufina 1 uM, NADP 1.3 mM, glucosa-6-fosfato 3.3 mM y 0.4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ausencia del compuesto de ensayo, la etoxiresorufina añadida como sustrato se oxida a resorufina y en presencia de un inhibidor de la isoenzima CYP, se reduce la cantidad de resorufina producida. Se utilizó furafilina como inhibidor de referencia.
- 10 La mezcla de reacción del ensayo de citocromo P₄₅₀ CYP2C9 que contenía microsomas hepáticos humanos (0.2mg/ml de proteína) se incubó durante 15 minutos a 37°C con el compuesto de ensayo 10 uM, tolbutamida 10 uM, NADP 1.3 mM, glucosa-6-fosfato 3.3 mM y 0.4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ausencia del compuesto de ensayo, la tolbutamida se oxida a 4-hidroxitolbutamida y en presencia de un inhibidor de la isoenzima CYP, se reduce la cantidad de 4-hidroxitolbutamida producida. Sulfafenazol (CI₅₀: 0.35 uM) fue el inhibidor de referencia.
- 15 En el ensayo de citocromo P₄₅₀ CYP2C19, se incubaron microsomas hepáticos humanos (0.2mg/ml de proteína) se incubaron durante 15 minutos a 37°C con el compuesto de ensayo 10 uM, omeprazol 10 uM, NADP 1.3 mM, glucosa-6-fosfato 3.3 mM y 0.4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ausencia del compuesto de ensayo, el omeprazol se oxida a 5-hidroxiomeprazol y en presencia de un inhibidor de la isoenzima CYP, se reduce la cantidad de 5-hidroxiomeprazol producida. Oxibutinina (CI₅₀: 7.1 uM) fue el inhibidor de referencia.
- 20 La reacción del ensayo de citocromo P₄₅₀ CYP2D6 que contenía microsomas hepáticos humanos (0.2mg/ml de proteína) se incubó durante 15 minutos a 37°C con el compuesto de ensayo 10 uM, dextrometorfano 5 uM, NADP 1.3 mM, glucosa-6-fosfato 3.3 mM y 0.4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ausencia del compuesto de ensayo, el dextrometorfano se oxida y en presencia de un inhibidor de la isoenzima CYP, se reduce la cantidad del producto de la oxidación producida. Quinidina (CI₅₀: 0.093 uM) fue el inhibidor de referencia.
- 25 En el ensayo de citocromo P₄₅₀ CYP2C19, se incubaron microsomas hepáticos humanos (0.2mg/ml de proteína) se incubaron durante 20 minutos a 37°C con el compuesto de ensayo 10 uM, midazolam 5 uM, NADP 1.3 mM, glucosa-6-fosfato 3.3 mM y 0.4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En ausencia del compuesto de ensayo, el midazolam se oxida y en presencia de un inhibidor de la isoenzima recombinante, se reduce la cantidad del producto de la oxidación producida. El producto de la oxidación se determina a partir del área bajo la curva tras la separación por HPLC-MS/MS. Ketoconazol (CI₅₀: 0.55 uM) fue el inhibidor de referencia.
- 30 En cada ensayo, el porcentaje de inhibición de la isoenzima citocromo P₄₅₀ CYP P₄₅₀ se determinó como cien veces la proporción de (1-la cantidad de producto en la muestra en presencia del compuesto de ensayo) dividida de la cantidad de producto en la muestra que contenía la isoenzima sin tratar. Los resultados de los ensayos por duplicado (expresados como el porcentaje de actividad CYP remanente) se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV Porcentaje de actividad de isoenzimas citocromo P₄₅₀ CYP

Compuesto	(1)	(3)	(6)
Isoenzima P₄₅₀			
CYP1A	89.8	93.1	89.5
CYP2C9	93.2	97.4	92.1
CYP2C19	98.5	103.2	97.2
CYP2D6	96.0	99.5	93.9
CYP3A4	92.5	94.3	93.6

35 EJEMPLO 43: Estabilidad del Compuesto (2) a microsomas hepáticos humanos

- Los microsomas hepáticos humanos (concentración final 0.3mg/mL de proteína) en tampón fosfato 0.1M pH7.4 y sistema de regeneración de NADPH (1 mM NADP, glucosa-6-fosfato 5 mM y 1 unidad/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) se preincubaron a 37°C antes de la adición del sustrato, Compuesto (2), para dar una concentración final de sustrato de 1µM; y una concentración final de metanol de 0.6%. Se tomaron alícuotas pasados 0 y 60 minutos. Se añadió el mismo volumen 50/50 acetonitrilo/metanol, se centrifugaron las muestras y se midió la cantidad de compuesto remanente en el sobrenadante mediante HPLC con espectrometría de masas acoplada en tándem por comparación de las áreas de los picos generados para las muestras en el minuto 0 y 60. Las muestras por duplicado mostraron un 96% y un 118% del Compuesto (2) remanente tras 60 minutos de incubación con microsomas hepáticos humanos.
- 40

EJEMPLO 44: Farmacocinética del Compuesto (2) en ratas

Para determinar las relaciones entre la concentración en plasma y en el cerebro del Compuesto (2), se administraron 3 mg/kg del péptido a través de un catéter insertado en la vena yugular a un grupo de 6 ratas conscientes con venas yugulares caracterizadas durante un periodo de infusión de 5 minutos. Treinta, 60 y 180 minutos después del inicio de la infusión, se recogieron muestras de sangre de dos animales en cada punto temporal mediante punción cardiaca terminal y se extirparon los cerebros enteros de forma rápida. Se aisló el plasma por centrifugación. Se utilizó cromatografía líquida con espectrometría de masas acoplada en tándem (LC-MS/MS) para cuantificar la concentración de fármaco en plasma y en el cerebro de ratas. Los resultados se muestran en la Figura 5.

EJEMPLO 45: Farmacocinética del Compuesto (6) en ratones y monos cynomolgus

Se administró un único bolo del compuesto de amida de péptido sintético por inyección subcutánea a ratones ICR (n = 6 machos, peso corporal 23-37 g, Charles River, Wilmington, MA) y se tomaron muestras de plasma 5, 10, 15, 20, 30 60, 90, 120 y 180 minutos después de la inyección. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos después de la inyección subcutánea de una dosis de 1 mg/kg del Compuesto (6) en ratones ICR. La "vida media" se determinó como el tiempo requerido para que la concentración en plasma se redujera un 50% tras alcanzar la concentración máxima en plasma; la vida media calculada, basada en la constante de la velocidad de eliminación de la fase de eliminación más lenta, se espera que sea mayor. Véase la Tabla V a continuación.

EJEMPLO 46: Farmacocinética del compuesto de amida de péptido sintético en monos

Las muestras se administraron a monos macho, *Macaca fascicularis* (SNBL USA, Ltd., Everett, WA, monos cynomolgus criados con este propósito y relacionados estrechamente con los seres humanos tanto filogenética como fisiológicamente) de 3-7 años con pesos de 3-5 kilogramos. Las muestras se administraron en una vena superficial del brazo o de la pierna (p. ej., braquial o safena) en salino 0.9% para inyecciones, USP (Baxter Healthcare, Deerfield, Ill.) como se indica a continuación: Se preparó una muestra a ensayar que contenía 4 mg del Compuesto (6) de la presente invención en 2 ml de salino 0.9% para inyecciones. La dosis de 2 ml se administró como un bolo intravenoso al animal de ensayo, lo que produjo una dosis de aproximadamente 0.4 a 0.65 mg/kg dependiendo del peso corporal del animal. Se recogieron muestras de sangre de 0.6 ml mediante venipunción de una vena periférica 2, 5, 10, 15 y 30 minutos después de la inyección, y 1, 2 y 4 horas después. Se introdujo cada muestra en un tubo de ensayo de vidrio preenfriado que contenía heparina de litio e inmediatamente se enfrió con hielo. Se recogió plasma tras centrifugar a 2000g durante quince minutos a 2-8°C. Las capas plasmáticas de cada muestra se transfirieron a tubos de polipropileno y se conservaron congeladas a -60°C o a una temperatura menor hasta que se ensayaron.

Se añadieron a alícuotas de cien microlitros de plasma descongelado 5 microlitros de una solución de 400 ng/ml de un patrón interno adecuado (en este caso un compuesto de amida de péptido sintético conocido estándar) en TFA 0.1% y las proteínas precipitaron con 100 microlitros de TFA 0.1% en acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se analizaron mediante LC-MS. El análisis por LC-MS se realizó en un espectrómetro de masas Finnigan LCQ Deca acoplado a un sistema HPLC Surveyor (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). El análisis por HPLC se llevó a cabo en columnas C18 2.1 x 150 mm de fase inversa con un gradiente de TFA 0.01% en acetonitrilo en TFA 0.01% en agua. La detección de masas se llevó a cabo en el modo de monitorización de reacción (SRM).

La cuantificación se llevó a cabo comparando con una curva de calibrado del analito en plasma blanco de mono cynomolgus utilizando el mismo patrón interno. El análisis de los datos y la obtención de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo con el programa PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Ashland, Ohio, EE. UU.). La Tabla V, muestra a continuación la vida media en ratones ICR después de la inyección subcutánea del Compuesto (6) y la vida media para este compuesto después de la administración intravenosa del bolo en monos cynomolgus.

Tabla V Vida media *in vivo* del compuesto de amida de péptido sintético (6)*

	Ratones ICR	Monos cynomolgus
Vía de administración	subcutánea	intravenosa
Vida media (min)	22.0	58.6

*El Compuesto (6) es D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (SEQ ID NO: 1).

La persistencia del Compuesto (3) en el plasma de monos cynomolgus después de la administración intravenosa de un bolo de 0.56 mg/kg se muestra en la Figura 7.

EJEMPLO 47: Ensayo de constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones

Este texto identifica compuestos que exhiben actividad analgésica contra el dolor visceral o el dolor asociado con la activación de nociceptores sensibles a pH bajo [véanse Barber y Gottschlich (1986) *Med. Res. Rev.* 12: 525-562;

Ramabadran y Bansinath (1986) *Pharm. Res.* 3: 263-270]. La administración intraperitoneal de una solución de ácido acético diluida produce un comportamiento constrictivo abdominal en ratones. Una constricción se define como una contracción de los músculos abdominales que va acompañada de una extensión de las extremidades anteriores y una elongación del cuerpo. Se cuenta el número de constricciones observadas en presencia y en ausencia de los compuestos de ensayo para determinar la actividad analgésica de los compuestos.

Se realizó un ensayo de constricción abdominal diario. Siempre se incluyó un grupo de ratones (n=6-8) de control tratado con vehículo el cual fue tratado de forma idéntica al grupo de ensayo (a no ser porque el compuesto de ensayo no estaba presente en la dosis a inyectar) y el número de constricciones promedio en este grupo se utilizó como el punto de referencia absoluto que definía un descenso del 0% en la percepción del dolor para el resto de los ratones que recibieron un compuesto de ensayo ese día. De forma específica, el número de constricciones de cada ratón que recibía el compuesto de ensayo se convirtió en un % de descenso en la percepción del dolor conforme a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de descenso en la percepción del dolor} = \frac{(W_v - W_c)}{W_v} \times 100$$

Donde W_v es el número medio de constricciones en el grupo tratado con vehículo y W_c es el número de constricciones en el ratón tratado con compuesto. Los datos analizados utilizando la ecuación de 2 parámetros de Hill (también conocido como el modelo de Emax), donde se supone que Emax es el 100% de la antinocipercepción (es decir, ninguna constricción pasados 15 min de la administración de ácido acético).

Los ratones ICR macho, de 23-37 gramos de peso, fueron pesados y se introdujeron en cámaras de observación individuales (normalmente un vaso de precipitados de vidrio de 4000 ml) con una capa fina de lecho para roedores SANI-CHIPS en el fondo. Para determinar la actividad y la potencia de los compuestos de ensayo, se inyectaron diferentes dosis de la solución del compuesto o del vehículo subcutáneamente en la parte de atrás del cuello 15 ó 180 minutos antes de administrar la solución de ácido acético. Tras la administración del compuesto o del vehículo de control, los ratones fueron devueltos a sus cámaras de observación individuales a la espera de la administración intraperitoneal de la solución de ácido acético. Quince minutos o tres horas después, de acuerdo con el intervalo de tiempo definido en cada experimento entre el suministro del compuesto y la inyección de ácido acético, se inyectó posteriormente una dosis correspondiente a 10 ml/kg de una solución 0.6% (v/v) de ácido en el cuadrante inferior derecho del abdomen. Inmediatamente después de la inyección, el ratón fue devuelto a su cámara de observación y el registro del número de constricciones comenzó inmediatamente. El número de constricciones se contó durante un periodo de 15 min partiendo del momento de la inyección de ácido acético, recogiendo los datos en el transcurso de tres periodos de tiempo de 5 minutos separados (0-5 min, 5-10 min y 10-15 min).

Los datos se expresaron como DE_{50} y coeficiente de Hill. La DE_{50} se expresa bien como media \pm error estándar de la media (sem) ($DE_{50} \pm$ sem) o como media geométrica con intervalos de confianza del 95% (95% de IC) utilizando la puntuación t. El coeficiente de Hill se expresa como la media aritmética \pm sem calculada de los valores obtenidos para los animales. Los resultados para el Compuesto (2) se muestran en la Figura 8 (círculos rellenos).

Para el análisis dosis-respuesta, los datos sin procesar se convirtieron al % de efecto máximo posible (%MPE) utilizando la fórmula: $\%MPE = ((\text{puntuación del ensayo} - \text{puntuación del tratamiento con vehículo}) / (0 - \text{puntuación del tratamiento con vehículo})) \times 100$. Los datos sin procesar se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de un solo factor seguido de posanálisis de Dunnett. La dosis que provocó el 50% de atenuación de la hipersensibilidad (DE_{50}) se determinó utilizando un análisis de regresión lineal. Los compuestos se administraron por vía intravenosa. La Tabla VI resume los resultados de estos experimentos.

Tabla VI. Efectos de los Compuestos (2) y (5) sobre el ensayo de constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones.

Compuesto	DE_{50} (mg/kg, iv, 15 min postdosis)	% MPE (180 min post- DE_{90})	% MPE (240 min post- DE_{90})	% MPE (300 min post- DE_{90})
(2)	0.07 (0.06-0.1)	77 \pm 5%	81 \pm 4%	84 \pm 4%
(5)	0.01 (0.01-0.02)	54 \pm 10%	SE	SE
SE = sin ensayar				

Se generó una respuesta a la dosis del Compuesto (2) en el ensayo de constricción abdominal en ratones utilizando 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg administrados intravenosamente como se describió anteriormente. Utilizando el método anterior, se

determinó una relación dosis-respuesta lineal para dosis del Compuesto (2) que variaban entre 0.01 mg/kg y 0.3 mg/kg, como se muestra en la Figura 9.

EJEMPLO 48: Inhibición de la locomoción en ratones para medir la sedación por parte de los compuestos tras una inyección subcutánea (ensayo de reducción de la locomoción)

5 Los compuestos que exhiben actividad sedativa inhiben la locomoción espontánea de ratones en una cámara de ensayo. Para determinar el efecto sedativo potencial de los compuestos de ensayo, se puede determinar el alcance de la reducción de la locomoción tras la administración del compuesto de ensayo o del vehículo de control y se puede comparar con un aparato especializado diseñado con este fin (Opto-Varimex Activity Meter). Al principio de cada experimento, se pesó y se examinó cada ratón para determinar si poseían una buena salud. Para determinar la actividad y la potencia de los compuestos, se inyectaron diferentes dosis de la solución del compuesto o del vehículo subcutáneamente 15 ó 180 minutos antes de comenzar a registrar los datos. La inyección subcutánea se realizó en la parte de atrás del cuello del ratón, pellizcando y elevando la piel entre el dedo índice y pulgar para permitir una adecuada penetración de la aguja de la jeringa. Después de la inyección, cada animal fue introducido individualmente en cajas Plexiglas (43 cm x 43 cm) dentro del aparato Opto-Varimex Activity Meter. Antes de introducir el animal en el aparato, se introdujo una capa fina de lecho para roedores SANI-CHIPS en el fondo de la caja Plexiglas para proporcionar un ambiente confortable. Posteriormente, se encendió cada aparato Opto-Varimex Activity Meter y el sistema ATM3 Auto-Track System comenzó la adquisición de datos. Se procesaron los datos y se expresaron los resultados en la misma forma que se describió para el ensayo de constricción abdominal en el Ejemplo 47.

EJEMPLO 49: Efecto analgésico vs. efecto sedativo de la amida de péptido sintético (3)

20 La inhibición de la constricción inducida por ácido acético por parte de un compuesto es un indicador de un efecto analgésico (también conocido como efecto antinociceptivo). De forma análoga, una reducción en la locomoción se puede utilizar como una medida de un efecto sedativo general.

La DE₅₀ determinada en el ensayo de constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones IRC fue de 52 ug/kg cuando se administró la amida de péptido sintético (3) subcutáneamente como se describió en el Ejemplo 34 y como se muestra en la Figura 8 (círculos rellenos). El valor de DE₅₀ determinado en el ensayo de inhibición de la locomoción como se describió en el Ejemplo 35 fue de 2685 ug/kg para la misma amida de péptido sintético administrada subcutáneamente. Véase la Figura 8 (cuadrados rellenos). La relación terapéutica del efecto analgésico con el efecto sedativo es el doble de la DE₅₀ requerida para producir un efecto sedativo en comparación con la DE₅₀ requerida para producir un efecto analgésico. Por lo tanto, el Compuesto (3) exhibe una relación de (2685/52) veces más, es decir, 51.6 veces más. Por lo tanto, la relación terapéutica para el Compuesto (3) es de 52 veces más.

EJEMPLO 50: Modelo de ligadura de los nervios medulares (SNL, por sus siglas en inglés)

El modelo SNL (Kim y Chung, 1992) se utilizó para inducir dolor neuropático crónico. Las ratas se anestesiaron con isoflurano, se eliminó el proceso transversal L5 izquierdo, y los nervios espinales L5 y L6 se ligaron fuertemente con sutura de seda 6-0. Posteriormente se cerró la herida con suturas internas y grapas externas. Catorce días después de la SNL, se evaluaron la línea basal, los valores postlesión y postratamiento para la sensibilidad a la estimulación mecánica nociva utilizando filamentos 8 Semmes-Weinstein (Stoelting, Wood Dale, IL, EE. UU.) con varios valores de rigidez (0.4, 0.7, 1.2, 2.0, 3.6, 5.5, 8.5 y 15 g) de acuerdo con el método "up-down" (Chaplan *et al.* 1994). Los animales se colocaron sobre una plataforma perforada y se dejó que se aclimataran a su entorno durante un mínimo de 30 minutos antes del ensayo. Se determinaron la media y el error estándar de la media (SEM) para cada pata en cada grupo de tratamiento. Debido a que este estímulo normalmente no se considera doloroso, en este ensayo se interpretan los aumentos significativos en la capacidad de respuesta inducidos por lesiones como una medida de la alodinia mecánica. La dosis que provocó el 50% de atenuación de la hipersensibilidad mecánica (DE₅₀) se determinó utilizando un análisis de regresión lineal. El Compuesto (2) se administró por vía intravenosa. La Figura 10 resume los resultados de estos experimentos. La DE₅₀ calculada para el Compuesto (2) en este modelo fue de 0.38 mg/kg (0.31-0.45; intervalo de confianza del 95%).

EJEMPLO 51: Analgesia ocular inducida por los Compuestos (2), (3) y (4)

Se evaluó la analgesia ocular infundiendo cinco volúmenes del compuesto de ensayo, de 50 microlitros cada uno en suero fisiológico, en la concentración a ensayar en el ojo derecho de conejos albinos de raza New Zealand, los cuales no se habían sometido a tratamiento previo, en el transcurso de un periodo de veinte minutos. Quince minutos después de la última infusión, se administró a cada animal una única infusión de 30 microlitros de capsaicina 10 mg/ml (33 mM) en el ojo tratado. Se sabe que la capsaicina induce dolor en la córnea. El dolor en la córnea se evaluó mediante la medida de la apertura palpebral en milímetros utilizando una regla transparente en el ojo tratado y el no tratado. En este modelo animal, la reducción en el tamaño de la apertura palpebral tras la infusión de capsaicina es un indicador del grado de dolor ocular. Así pues, cualquier recuperación (aumento) observada en el tamaño de la apertura palpebral después del tratamiento con el compuesto de ensayo se toma como una medida del alivio del dolor ocular inducido por capsaicina.

Estas evaluaciones se llevaron a cabo antes del tratamiento con el compuesto de ensayo (preensayo), inmediatamente antes de la infusión de capsaicina y 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 minutos después de la infusión de capsaicina. La Tabla VII muestra la media de las medidas de la apertura palpebral (con relación al ojo no tratado expresada como el

porcentaje de control) como promedio realizado durante el periodo de 10 a 30 minutos tras la infusión de capsaicina en conejos preinfundidos con un agonista opioide kappa de la invención y después de la preinfusión con una concentración patrón de diltiazem, un bloqueador de canales de calcio del grupo de las benzotiazepinas con efectos anestésicos. Véase González *et al.*, (1993) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**: 3329-3335.

5 **Tabla VII** Efecto de los Compuestos (2), (3) y (4) en la reducción del dolor ocular

Compuesto	Tiempo (poscapsaicina)	Media (% de control)	SEM (% de control)
Ninguno (salino)	10-30 min.	61.2	6.5
Diltiazem 10 mM	10-30 min.	74.6	5.5
(2) 10 mg/ml	10-30 min.	82.7	5.3
(3) 10 mg/ml	10-30 min.	76.0	5.2
(4) 10 mg/ml	10-30 min.	56.7	8.4
La media es de cinco animales; SEM: Error estándar de la media			

EJEMPLO 52: Respuesta a la dosis del Compuesto (2) en el dolor ocular inducido por capsaicina

10 La analgesia ocular inducida por el Compuesto (2) en varias concentraciones infundidas en el ojo derecho de conejos albinos de raza New Zealand, los cuales no se habían sometido a tratamiento previo, se evaluó como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con la analgesia inducida morfina 10 mg/ml (un agonista opiodes no selectivo) como control sistemático activo y con diltiazem 10 mM como control tópico activo en el mismo experimento y en las mismas condiciones. La Tabla VIII siguiente muestra los resultados recopilados.

Tabla VIII Respuesta a la dosis del Compuesto (2) en el dolor ocular inducido por capsaicina

Compuesto	Tiempo (poscapsaicina)	Media (% de control)	SEM (% de control)
Morfina 10 mg/ml	10-30 min.	74.8	11.1
Diltiazem 10 mM	10-30 min.	77.6	7.4
(2) 1 mg/ml	10-30 min.	60.5	9.9
(2) 10 mg/ml	10-30 min.	56.6	9.3
(2) 25 mg/ml	10-30 min.	75.5	7.1
(2) 50 mg/ml	10-30 min.	87.5	4.8
La media es de diez animales; SEM: Error estándar de la media			

15 EJEMPLO 53: Efecto del Compuesto (2) en un modelo de pancreatitis en ratas

Se indujo la inflamación pancreática crónica en ratas mediante la administración intravenosa de dicloruro de dibutilin (DBTC, Aldrich Milwaukee, WI) disuelto en etanol 100% en una dosis de 8mg/kg bajo anestesia con isoflurano (2-3 litros/min, 4%/vol hasta anestesiadas, posteriormente 2.5%/vol durante el procedimiento). Los animales de control recibieron únicamente el mismo volumen del vehículo (etanol 100%). El dolor debido a la pancreatitis se evaluó mediante la determinación de la sensibilidad abdominal a pruebas en el abdomen de ratas con un filamento de von Frey (4 g). Se dejó que las ratas se aclimataran en ratas introducidas en jaulas de malla metálica durante 30 min antes del ensayo. Se indicaba una respuesta mediante la retirada brusca del abdomen, lamiendo la zona abdominal, o la retirada del cuerpo entero. Un ensayo individual consistía en 10 aplicaciones del filamento de von Frey aplicado una vez cada 10 s para permitir que cesara cualquier respuesta del animal y que éste volviera a una posición relativamente inactiva. La media de las apariciones de sucesos de retirada en cada ensayo se expresa como el número de respuestas a 10 aplicaciones. Las ratas sin inflamación del páncreas exhibían normalmente frecuencias de retirada a las pruebas con el filamento de von Frey filament de 0-1. Se dejó que los animales se recuperasen durante 6 días después de la administración de DBTC

antes de cualquier manipulación farmacológica. Se excluyeron del estudio los animales que no manifestaban una hipersensibilidad abdominal suficiente (es decir, las ratas con menos de 5 respuestas positivas de entre 10 posibles).

Se registró el número de respuestas positivas, tras las pruebas abdominales (de entre 10 posibles), en cada punto del tiempo. Se presentaron los datos como el promedio del número de retiradas (\pm SEM) para cada grupo de dosificación en cada punto de tiempo correspondiente. Para el análisis dosis-respuesta, los datos sin procesar se convirtieron al % de efecto máximo posible (%MPE) utilizando la fórmula: $\%MPE = ((\text{puntuación del ensayo} - \text{puntuación después del tratamiento con DBTC}) / (\text{puntuación antes del tratamiento con DBTC} - \text{puntuación después del tratamiento con DBTC})) * 100$. Los datos sin procesar se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de dos factores con medidas repetidas seguido de posanálisis de Dunnett. La dosis que provocó el 50% de atenuación de la hipersensibilidad (DE_{50}) se determinó utilizando un análisis de regresión lineal. Los compuestos se administraron por vía intraperitoneal. La Figura 11 resume los resultados de estos experimentos. La DE_{50} calculada para el Compuesto (2) en este modelo fue de 0.03 mg/kg (0.006-0.14; intervalo de confianza del 95%).

Para determinar si la eficacia del Compuesto (2) (1 mg/kg) está mediada a través de la activación de receptores opioides kappa periféricos, se trataron previamente grupos de ocho ratas con el antagonista de receptores opioides kappa selectivo, nor-BNI (1 mg/kg), o con un antagonista de receptores opioides kappa no selectivo, metiduro de naloxona (10 mg/kg), el cual no atraviesa la barrera hematoencefálica, antes del tratamiento con el Compuesto (2). La Figura 12 resume los resultados de estos estudios.

EJEMPLO 54: Modelo de prurito en ratones

Se utilizaron grupos de 10 (y en un caso, 11) ratones Swiss Webster macho (25-30 g). Se pesó cada animal y se dejó que se aclimatara durante al menos una hora en cajas rectangulares de observación individual. Las colas de los ratones se sumergieron en agua templada durante 30 segundos para dilatar las venas de las colas y, posteriormente, los animales recibieron una inyección intravenosa del vehículo (salino) o del Compuesto (2) (0.01, 0.03, 0.10 y 0.30 mg de la base libre/kg). Quince minutos después, se suministró a cada ratón diclorhidrato de GNTI (Tocris) (0.30 mg/kg; 0.25 ml/25 g) o el Compuesto 48/80 (Sigma) (50 μ g en 0.10 ml de salino) subcutáneamente en la parte trasera del cuello. Posteriormente se observaron los animales en parejas (ocasionalmente en tríos) y se contó el número de movimientos de las patas traseras para rascarse en dirección al cuello durante 30 minutos. Se representó la media del porcentaje de inhibición del picor causado por el Compuesto (2) y se obtuvo la dosis asociada con el 50% de inhibición mediante un análisis de regresión lineal (PharmProTools). La Tabla IX resume los resultados de estos experimentos.

Tabla IX. - Efectos del Compuesto (2) sobre el prurito inducido por el Compuesto 48/80 o GNTI en ratones.

Compuesto #	Modelo del Compuesto 48/80 DE_{50} (mg/kg, iv, 15 min postdosis)	Modelo de GNTI DE_{50} (mg/kg, iv, 15 min postdosis)
(2)	0.08 (0.04-0.2)	0.05 (0.02-0.1)

Lo que se reivindica es:

LISTADO DE SECUENCIAS

[0426]

<110> Car a Therapeutics, Inc. Schteingart, Claudio D. Menzaghi, Frederique Ji ang, Guangcheng Alexander, Roberta V. Sui r as- Di az, Javi er Spencer, Robert H. Chalmers, Der ek T. Luo, Zhi yong

<120> Amidas de péptidos sintéticos

<130> 016408-0366471

<140> Pendiente de concesión

<141 > 2007- 11- 12

<150> 60/ 858, 109

<151 > 2006-11-10

<150> 60/928, 550

<151> 2007- 05- 10

<160> 8

- <170> Patent In versión 3.4
- <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1) .. (4)
- <223> Secuencia de D-aminoácidos completa
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)..(4)
- 15 <223> Xaa es D-alfametil-Lisina unida a - W (anillo Y- Z) - VeR1R2
- <400> 1
- Phe Phe Leu Xaa**
1
- <210> 2
- <211> 4
- 20 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
- <220>
- 25 <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(4)
- <223> Secuencia de D-aminoácidos completa
- <220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (4)..(4)
- <223> Xaa es D-Lisina unida a -W(anillo Y- Z) - VeR1R2
- <400> 2
- Phe Phe Leu Xaa**
1
- <210> 3
- 35 <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos

<220>
 <221> PÉPTIDE
 <222> (1)..(4)
 <223> Secuencia de D-aminoácidos completa
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es D- homoarginina unida a - W (anillo Y- Z) - VeR1 R2
 <400> 3
 10 **Phø Phø Leu Xaa**
 1
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(4)
 20 <223> Secuencia de D-aminoácidos completa
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa es D-Arginina unida a -W(anillo Y- Z)-VeR1R2
 25 <400> 4
Phø Phø Leu Xaa
 1
 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (1)..(4)
 <223> Secuencia de D-aminoácidos completa
 <220>
 <221> MOD- RES
 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es isopropil-D-Lisina unida a - W (anillo Y- Z) - VeR1 R2
 <400> 5
Phe Phe Leu xaa
 1
 <210> 6
 5 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(4)
 <223> Secuencia de D-aminoácidos completa.
 15 <220>
 <221> MOD- RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es beta-amidino- D-2,3-diaminopropiónico unido a - W (anillo Y- Z)-VeR1R2
 <400> 6
Phe Phe Leu Xaa
 1
 20 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(4)
 <223> Secuencia de D-aminoácidos completa.
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa es D-Norarginina unida a W (anillo Y- Z)- VeR1R2
 <400> 7
 35 **Phe Phe Leu Xaa**
 1
 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de D-aminoácidos

<220>

5 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(4)

.<223> Secuencia de D-aminoácidos completa

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (4) .. (4)

<223> Xaa es ácido D-alfa,gamma-diaminobutírico unido a - W (anillo Y- Z) - VeR1 R2

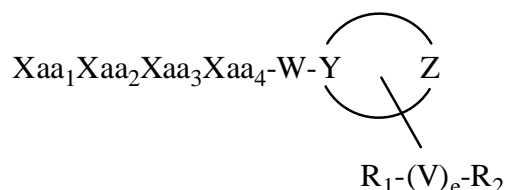
<400> 8

Phø Phø Løu Xaa

1

REIVINDICACIONES

1. Una amida de péptido sintético de la fórmula:



5 o un estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, hidrato de sal de ácido, N-óxido de una amida de péptido sintético que contiene una amina donde el átomo de nitrógeno de la amina está unido a un átomo de oxígeno, o forma isomórfica cristalina de ésta;

donde

10 Xaa₁ se selecciona del grupo que consiste en (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic, D-tert-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina y β-(E)D-Ala, donde cada (A) y cada (A') son sustituyentes de anillo fenilo seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en -H, -F, -Cl, -NO₂, -CH₃, -CF₃, -CN y -CONH₂, y donde cada (E) se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, piridilo, tienilo y tiazolilo;

Xaa₂ se selecciona del grupo que consiste en (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala y D-Trp;

15 Xaa₃ se selecciona del grupo que consiste en D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Val y D-Met;

20 Xaa₄ se selecciona del grupo que consiste en (B)₂D-Arg, (B)₂D-Nar, (B)₂D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-(B)₂D-Dbu, δ-(B)₂α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiónico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiónico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiónico, ácido α-amino-4-piperidinacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexanoacético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético y ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexanoacético, donde cada (B) se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en H y C₁-C₄ alquilo, y (B') es H o (α-Me);

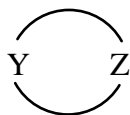
W se selecciona del grupo que consiste en:

25 nulo, siempre que cuando W sea nulo, Y será N;

-NH-(CH₂)_b- con b igual a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; y

-N-(CH₂)_c-O- con c igual a 2 ó 3, siempre que Y sea C;

el resto



30 es un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros opcionalmente sustituido donde todos los heteroátomos del anillo en dicho anillo sustituyente son N; donde Y y Z son cada uno de forma independiente C o N; siempre que, cuando tal anillo sustituyente sea un anillo de seis, siete u ocho miembros, Y y Z estén separados por al menos dos átomos del anillo; y, siempre que, cuando tal anillo sustituyente posea un único heteroátomo en el anillo que sea N, entonces tal anillo sustituyente será no aromático;

35 V es C₁-C₆ alquilo, y e es 0 ó 1, donde cuando e sea 0, entonces V será nulo, y R₁ y R₂ están unidos directamente al mismo o a diferentes átomos del anillo;

40 donde (i) R₁ se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, halo, -CF₃, -NH₂, -COOH, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, amidino, amidino sustituido por C₁-C₆ alquilo, arilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, -CONH₂, -COR', -SO₂R', -CONR'R", -NHCOR', OR' y SO₂NR'R"; donde dicho heterociclilo opcionalmente sustituido está opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH, y amidino; donde R' y R" son cada uno de forma independiente -H, C₁-C₈ alquilo, arilo o heterociclilo, o

R' y R" se combinan para formar un anillo de 4 a 8 miembros, estando dicho anillo opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en C₁-C₆ alquilo, -C₁-C₆ alcoxi, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino; y R₂ se selecciona del grupo que consiste en -H, amidino, amidino sustituido de forma única o doble por C₁-C₆ alquilo, -CN, -CONH₂, -CONR'R", -NHCOR', -SO₂NR'R" y -COOH; o

5 (ii) si R₁ y R₂ se juntan pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido que está enlazado a un único átomo del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z; o

(iii) si R₁ y R₂ se juntan con un único átomo del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico de 4 a 8 miembros opcionalmente sustituido para formar una estructura espiro; o

10 (iv) si R₁ y R₂ se juntan con dos o más átomos del anillo adyacentes del anillo sustituyente que contiene Y y Z pueden formar un anillo sustituyente heterocíclico, monocíclico o bicíclico de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido fusionado con el anillo sustituyente que contiene Y y Z;

15 donde cada uno de dichos anillos sustituyentes heterocíclicos de 4, 5, 6, 7, 8 y 9 miembros opcionalmente sustituidos que comprenden R₁ y R₂ está opcionalmente sustituido de forma única o doble por sustituyentes elegidos de forma independiente del grupo que consiste en C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi, fenilo opcionalmente sustituido, oxo, -OH, -Cl, -F, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH y amidino;

siempre que cuando el anillo sustituyente que contiene Y y Z sea un anillo de seis o siete miembros que posea un único heteroátomo en el anillo, y e sea cero, entonces R₁ no será OH, y R₁ y R₂ no serán a la vez -H.

20 además, siempre que cuando el anillo sustituyente que contiene Y y Z sea un anillo de seis miembros que posea dos heteroátomos en el anillo, tanto Y como Z sean N y W sea nulo, entonces -(V)_eR₁R₂ estará enlazado a otro átomo del anillo que no sea Z; y cuando e sea cero, entonces R₁ y R₂ no serán a la vez -H; y

por último, siempre que cuando Xaa₃ sea D-Nle, entonces Xaa₄ no será (B)₂D-Arg, y cuando Xaa₃ sea D-Leu o (αMe)D-Leu, entonces Xaa₄ no será δ-(B)₂α-(B')D-Orn.

25 2. La amida de péptido sintético de la reivindicación 1, donde Xaa₄ se selecciona del grupo que consiste en (B)₂D-Arg, D-Lys, (B)₂D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-(B)₂-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-(B)₂D-Dbu y δ-(B)₂α-(B')D-Orn.

3. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde Xaa₃ se selecciona del grupo que consiste en D-Nle y D-Leu.

30 4. La amida de péptido sintético de la reivindicación 3, donde Xaa₃ es D-Leu y Xaa₄ se selecciona del grupo que consiste en D-Arg, D-Nar, D-Har, D-Lys, ε-(isopropil)-D-Lys y ε-(metil)-D-Lys.

5. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde Xaa₁-Xaa₂ es D-Phe-D-Phe.

6. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde W es nulo.

7. La amida de péptido sintético de la reivindicación 6, donde Y es N y Z es C.

35 8. La amida de péptido sintético de la reivindicación 33, donde el anillo sustituyente que contiene Y y Z es un anillo saturado de seis miembros que comprende un único heteroátomo en el anillo.

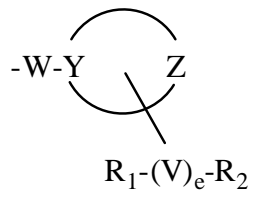
9. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde Y y Z son ambos N y son los únicos heteroátomos del anillo del anillo sustituyente que contiene Y y Z.

10. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde e es cero.

11. La amida de péptido sintético de la reivindicación 10, donde R₁ y R₂ están enlazados al mismo átomo del anillo.

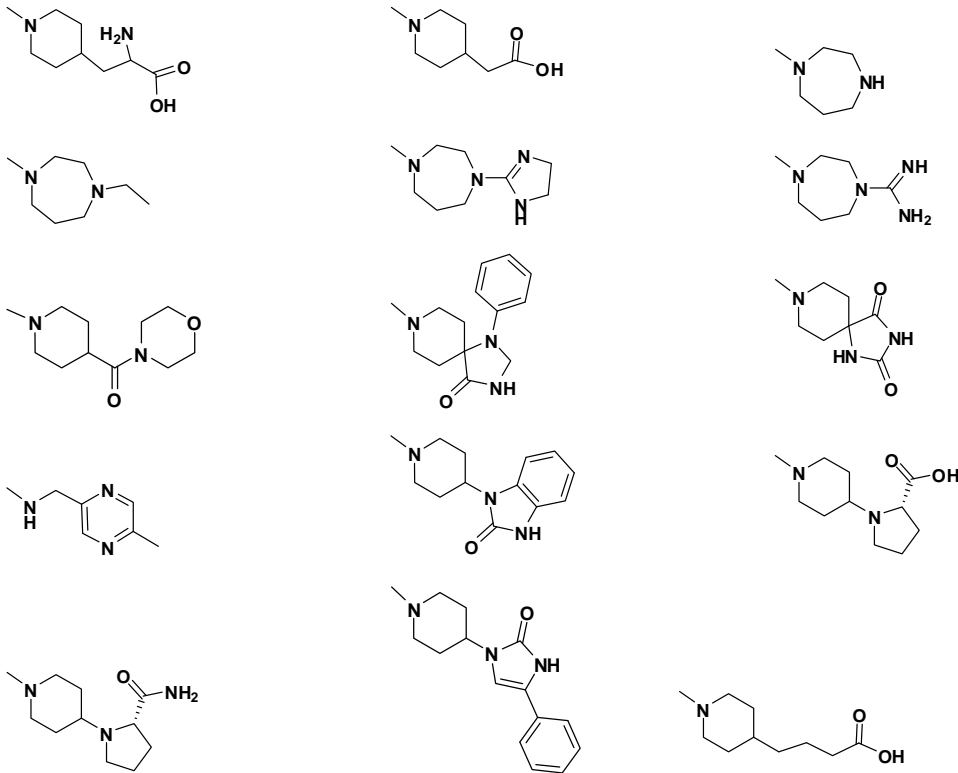
40 12. La amida de péptido sintético de la reivindicación 10 u 11, donde R₁ es -H, -OH, -NH₂, -COOH, C₁-C₃ alquilo, amidino, amidino sustituido por C₁-C₃ alquilo, dihidroimidazol, D-Pro, D-Pro-amida o CONH₂ y donde R₂ es -H, -COOH o C₁-C₃ alquilo.

13. La amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el resto:

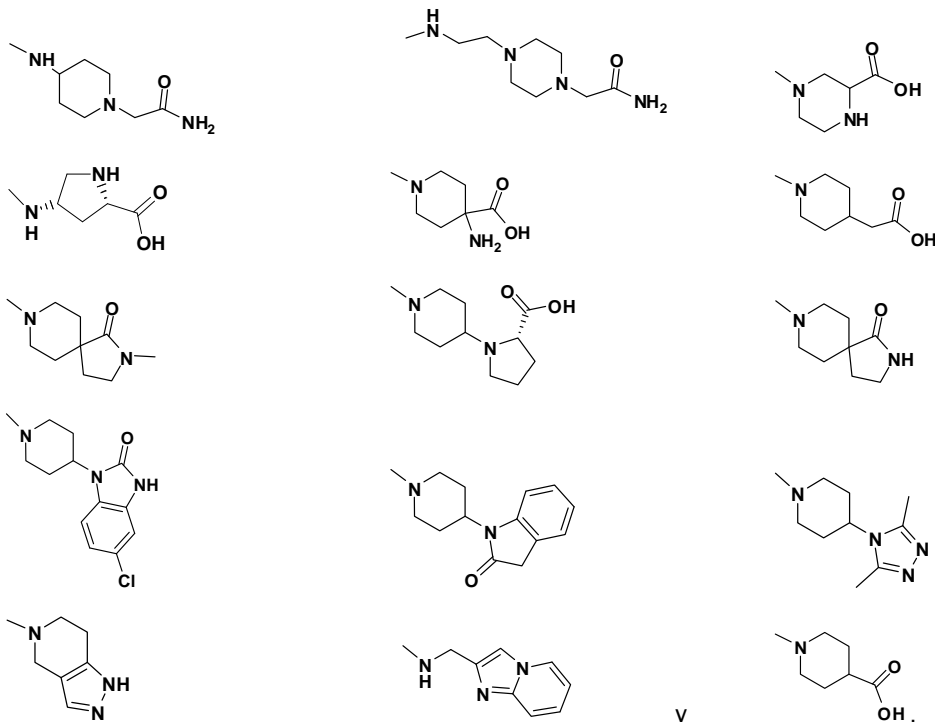


se selecciona del grupo que consiste en:

5

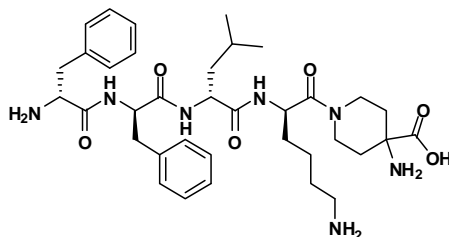


10



y

14. La amida de péptido sintético de la reivindicación 1 que posee la estructura del Compuesto (2):



5

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω (ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico)]-OH.

15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 16. El uso de la amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero, preferentemente donde la afección asociada con receptores opioides kappa se selecciona del grupo que consiste en inflamación, prurito, edema, hiponatremia, íleo, tos, glaucoma y dolor, preferentemente donde el dolor se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático, dolor somático, dolor visceral y dolor cutáneo, dolor artrítico, dolor provocado por piedras en el riñón, cólico uterino, dismenorrea, endometriosis, dolor después de un procedimiento médico, dolor ocular, dolor otítico, dolor irruptivo debido al cáncer, dolor asociado con un trastorno GI y dolor posquirúrgico, preferentemente donde la cirugía es laparoscopia pélvica, ligadura de trompas, histerectomía y colecistectomía.
- 15
- 20 17. Una amida de péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada con receptores opioides kappa en un mamífero, preferentemente donde la afección asociada con receptores opioides kappa se selecciona del grupo que consiste en inflamación, prurito, edema, hiponatremia, hipocalcemia, úleo, tos, glaucoma y dolor, preferentemente donde el dolor se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático, dolor somático, dolor visceral y dolor cutáneo, dolor artrítico, dolor provocado por piedras en el riñón, cólico uterino, dismenorrea, endometriosis, dispepsia, dolor después de un procedimiento médico, dolor ocular, dolor otítico, dolor irruptivo debido al cáncer, dolor asociado con un trastorno GI y dolor posquirúrgico, preferentemente donde la cirugía es laparoscopia pélvica, ligadura de trompas, histerectomía y colecistectomía.
- 25

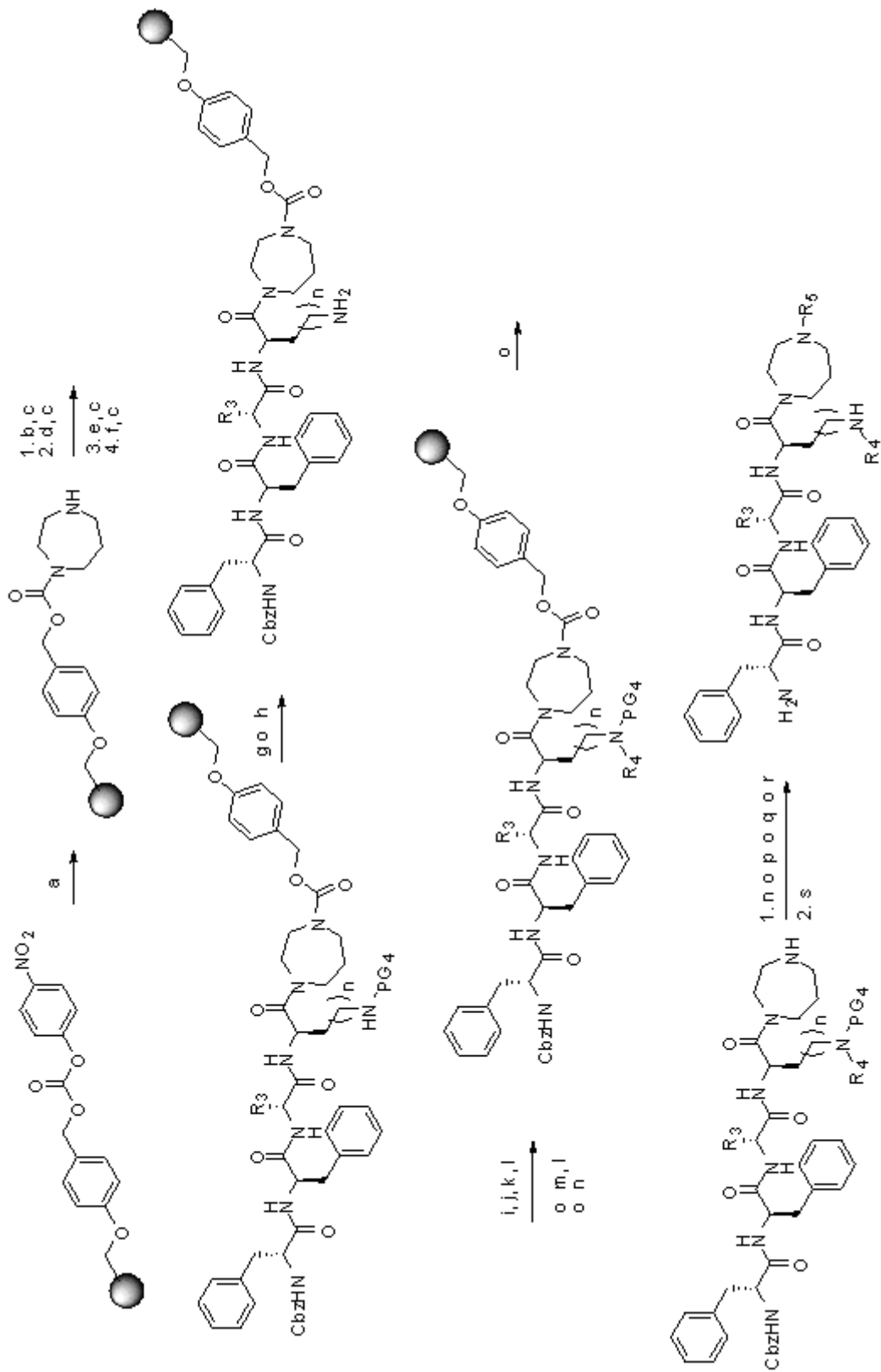


Figura 1

Figura 2

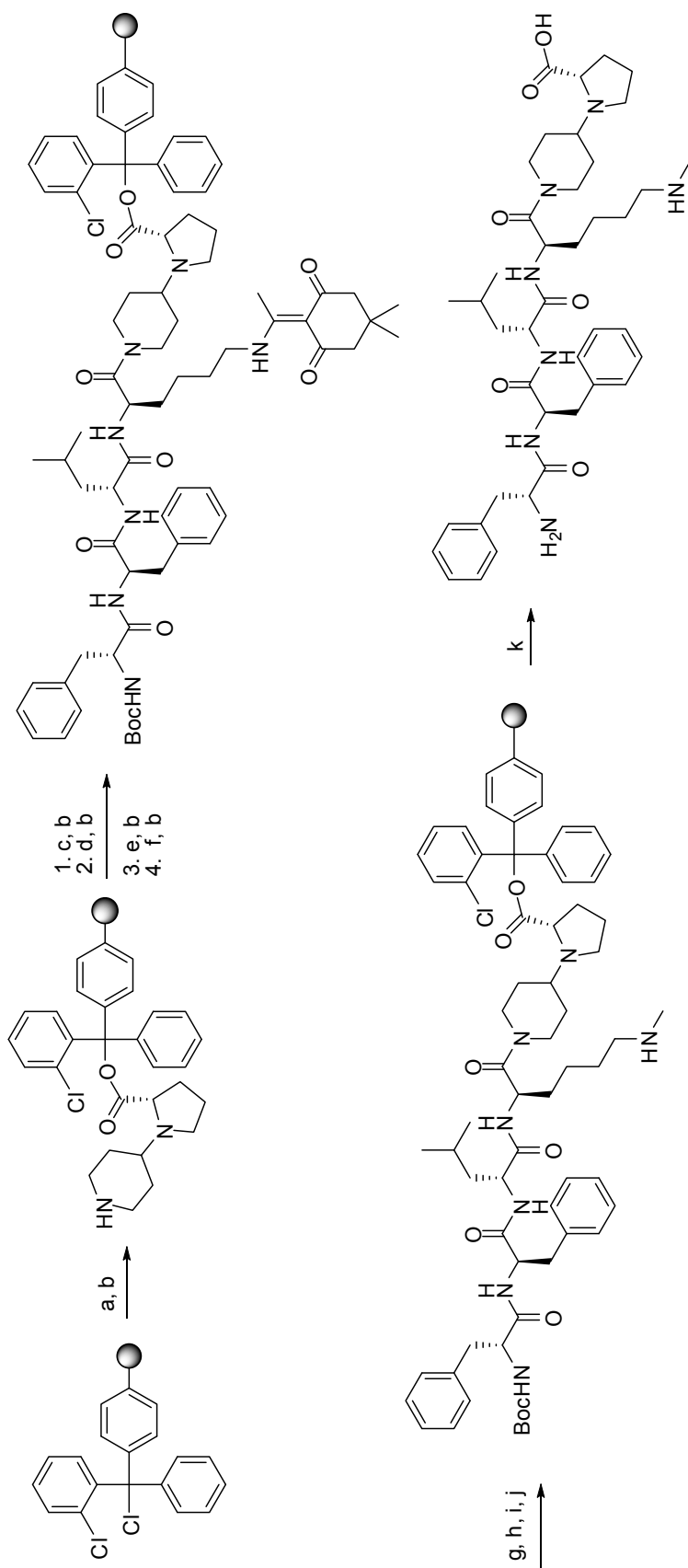


Figura 3

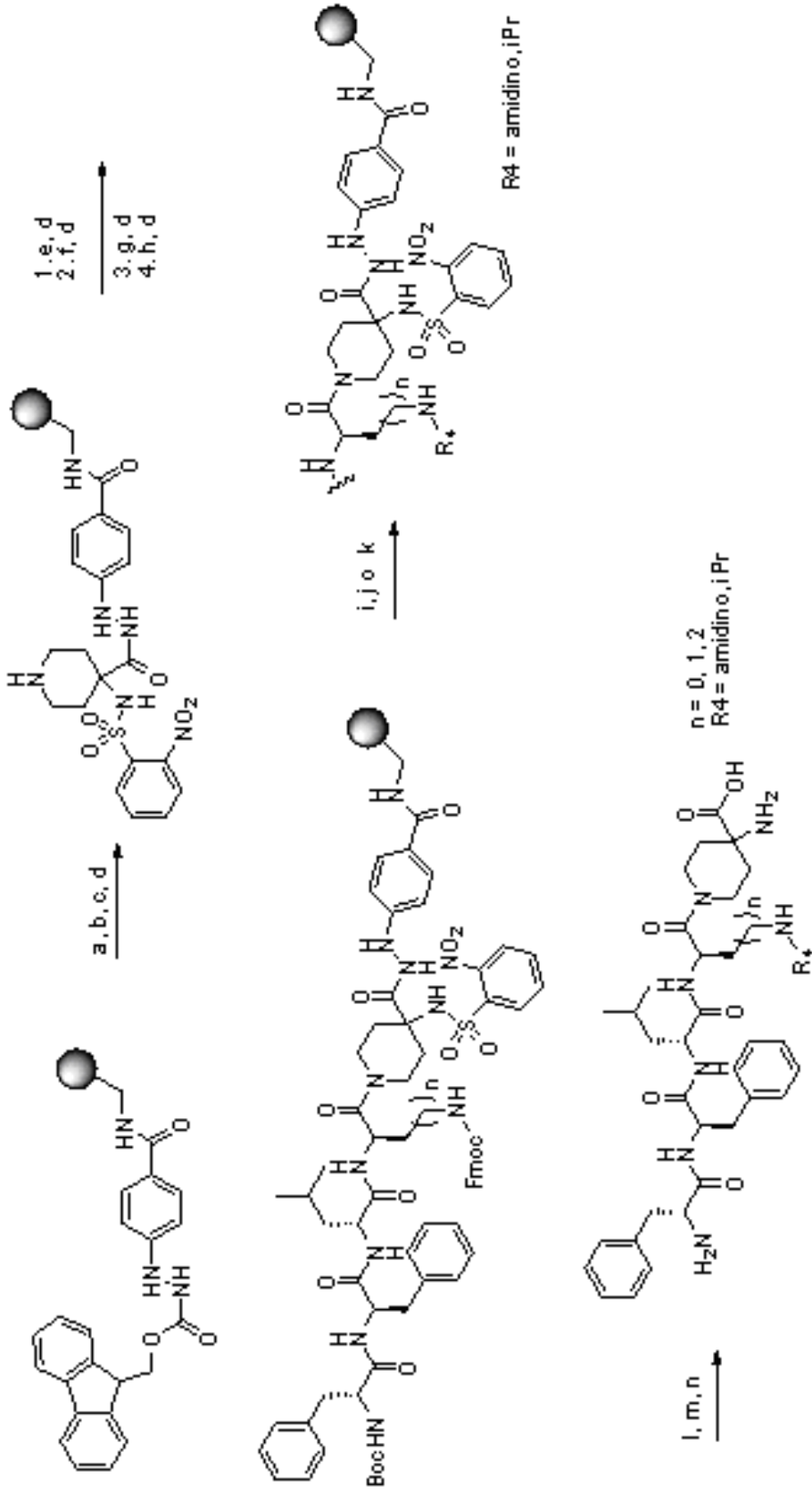


Figura 4

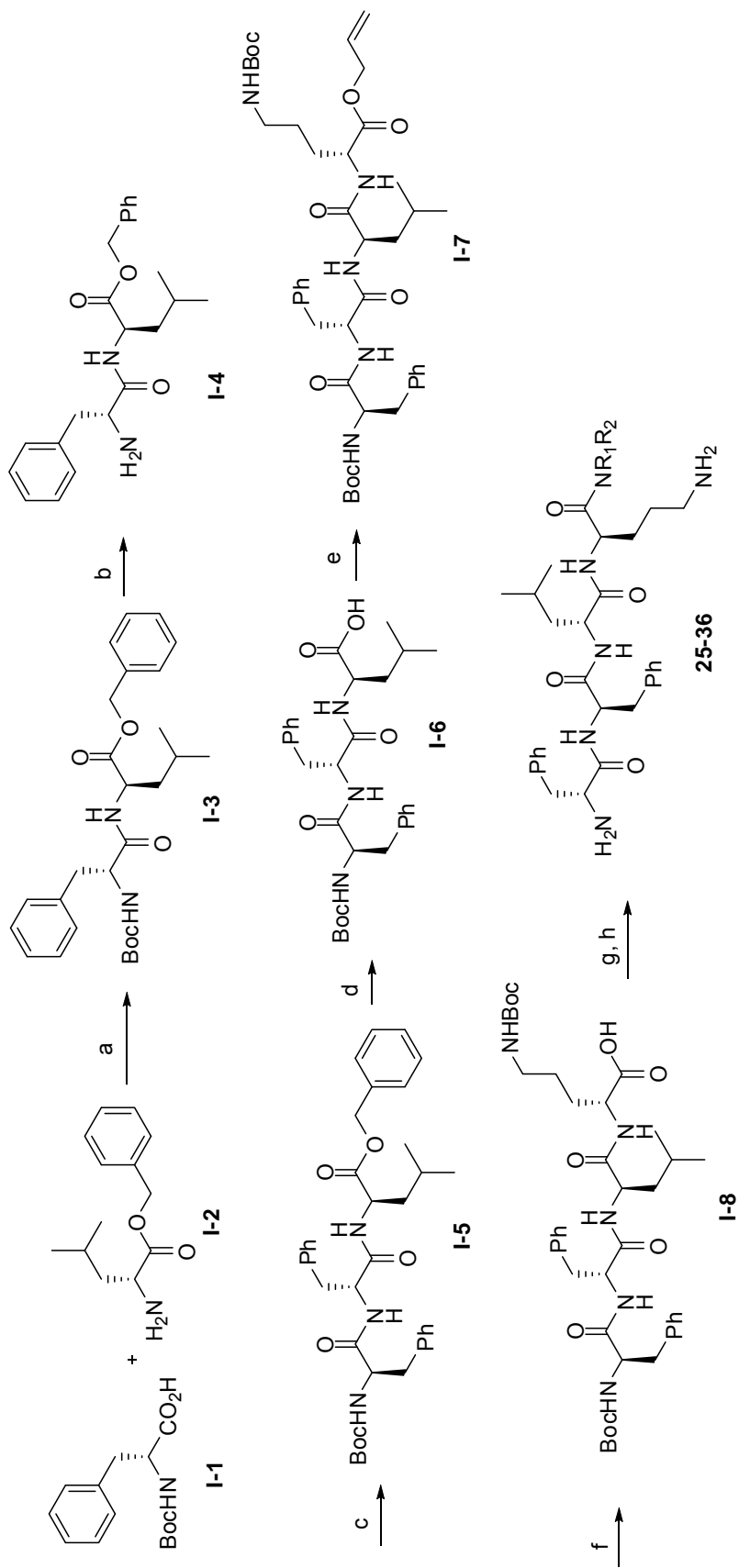


Figura 5

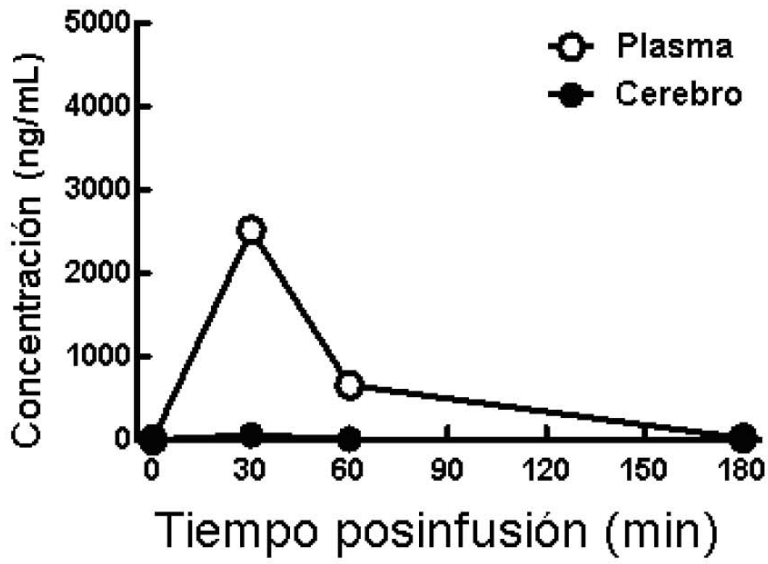


Figura 6

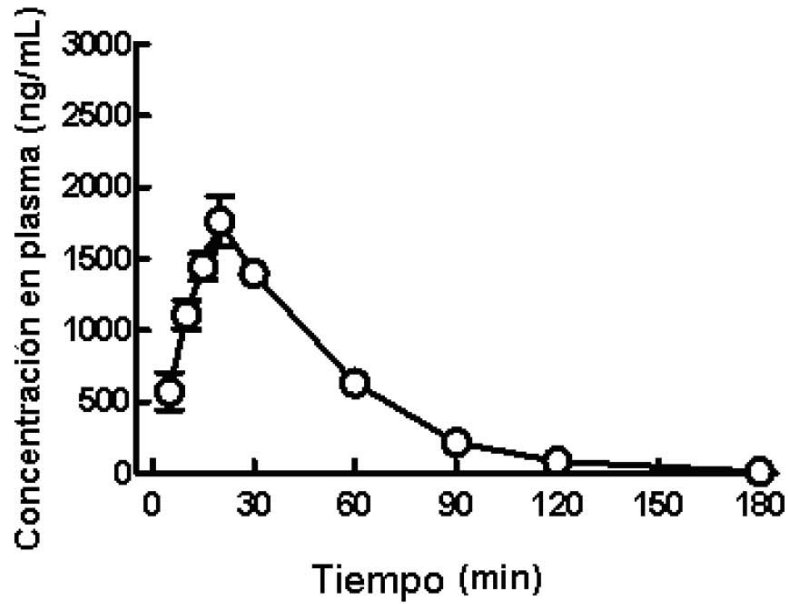


Figura 7

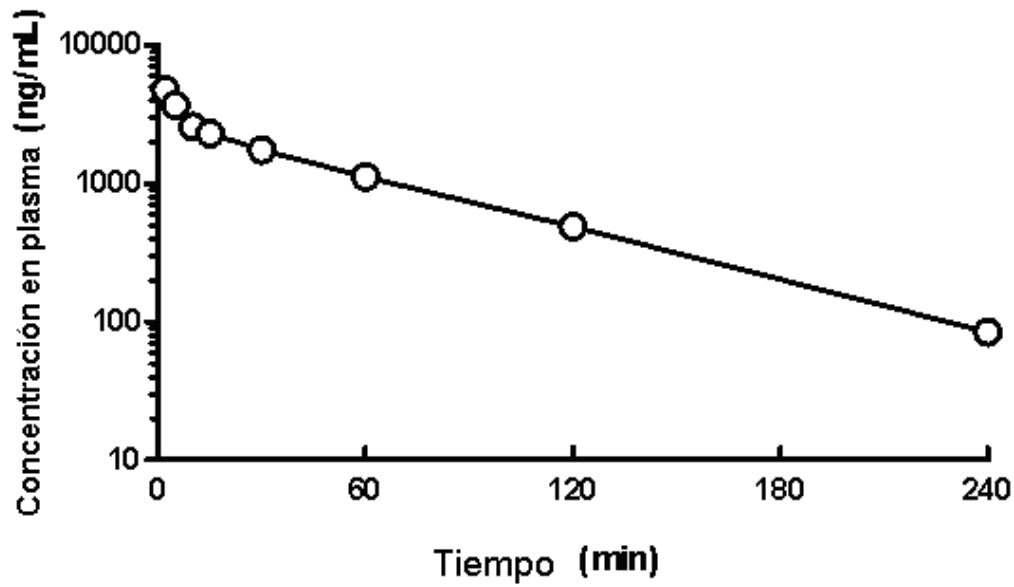


Figura 8

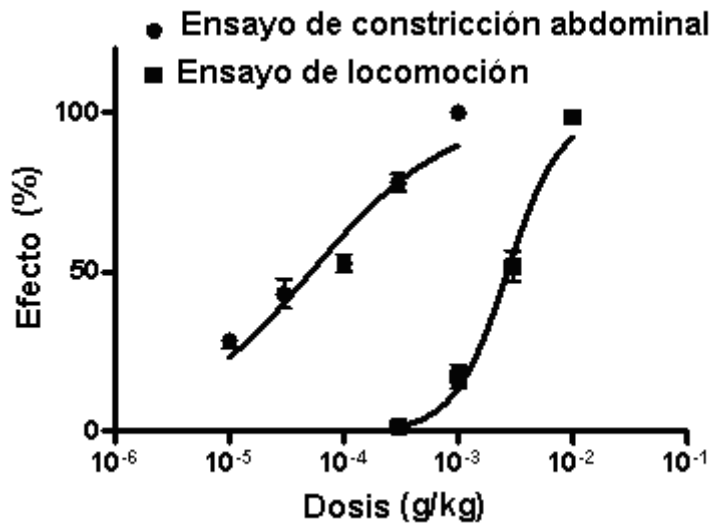


Figura 9

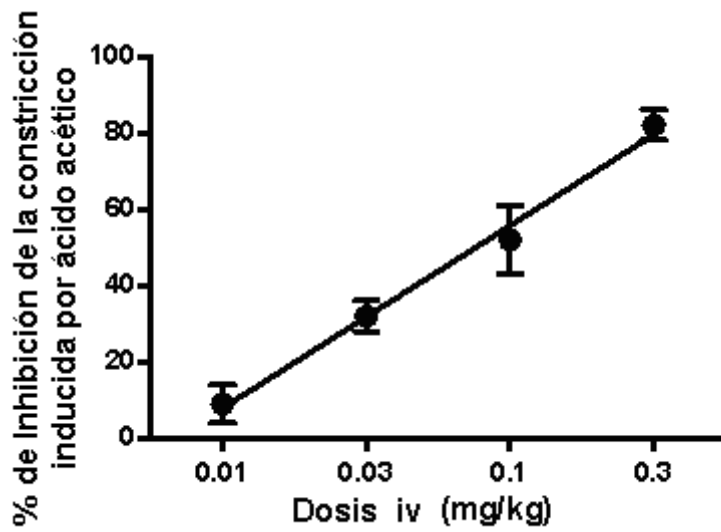


Figura 10

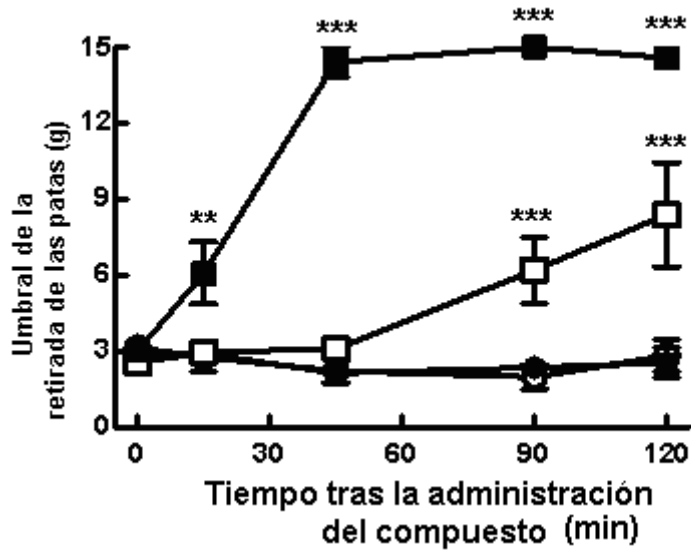


Figura 11

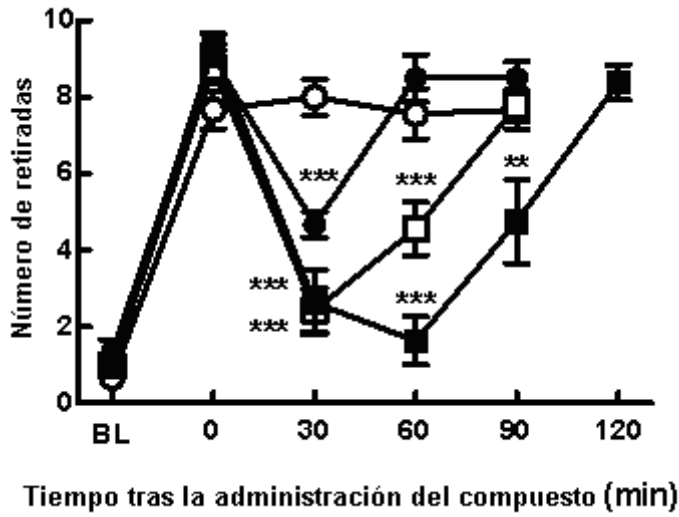


Figura 12

