

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 242**

51 Int. Cl.:

**C07C 233/81** (2006.01)

**C07D 207/16** (2006.01)

**C07D 207/50** (2006.01)

**C07D 233/02** (2006.01)

**A61K 31/4015** (2006.01)

**A61K 31/4166** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06849152 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1966130**

54 Título: **Compuestos modificados miméticos de lisina**

30 Prioridad:

**23.12.2005 US 753628 P**

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

**18.02.2014**

73 Titular/es:

**ZEALAND PHARMA A/S (100.0%)  
Smedeland 36  
2600 Glostrup , DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, BJARNE, DUE;  
PETERSEN, JORGEN, SOBERG;  
HAUGAN, KETIL, JORGEN;  
BUTERA, JOHN, A.;  
HENNAN, JAMES, K.;  
KERNS, EDWARD, H. y  
PIATNITSKI, EVGUENI, LVOVICH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 443 242 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

Compuestos modificados miméticos de lisina

### 5 **Campo**

Las presentes enseñanzas se refieren a compuestos miméticos de lisina que tienen actividad farmacológica, tal como actividad antiarrítmica, y propiedades de biodisponibilidad deseables. Las presentes enseñanzas se refieren adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y métodos de uso y preparación de dichos compuestos y composiciones.

### 15 **Antecedentes**

Existe un reconocimiento creciente de que la comunicación intercelular es esencial para la homeostasis con la proliferación y la diferenciación celulares. Se cree que dicha comunicación está facilitada por uniones comunicantes. Se cree que estas estructuras son una ruta para las células de acoplamiento y que permiten la "comunicación". (Véase generalmente, Sperelakes N., eds., Cell Interactions and Gap Junctions, CRC Press, Inc. (1989)). La comunicación entre uniones comunicantes se denomina "comunicación intercelular de uniones comunicantes" (GJIC).

20 Generalmente, las uniones comunicantes son regiones especializadas de la membrana celular que contienen grupos de cientos a miles de canales empaquetados densamente que conectan directamente el citoplasma de dos células adyacentes. Los canales de unión comunicante están formados por dos hemicanales, o conexones, proporcionados por cada una de dos células vecinas. Cada conexón, a su vez, está formado por seis proteínas denominadas conexinas.

En el corazón, la conducción de los impulsos eléctricos se produce a través de uniones comunicantes. La GJIC anómala se ha relacionado con diversos estados de enfermedad, que incluyen enfermedades del corazón. Por ejemplo, se ha mostrado que ratones heterocigotos para el gen Cx43, que codifica una conexina ventricular específica, desarrollan arritmias ventriculares espontáneas y padecen de muerte cardiaca repentina. (Guerrero et al., J. Clin. Invest., 99, 1991-1998 (1997)). La expresión reducida de Cx43 en ratones heterocigotos está unida directamente a un aumento de la incidencia de las arritmias ventriculares durante la isquemia. (Lerner et al., Circulation, 101, 547-552 (2000)). Otros estudios diversos han mostrado expresión reducida o distribución alterada de Cx43 en corazones crónicamente isquémicos, en hibernación, o con hipertrofia. (Kaprelian et al., Circulation, 97, 651-660 (1998); Peters et al., Circulation, 88, 864-875 (1993); Saffitz et al., Cardiovasc. Res., 42, 309-317 (1999)).

Se han identificado varios péptidos que influyen en la GJIC, que incluyen a los péptidos antiarrítmicos AAP (Aonuma et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 28, 3332-3339 (1980)). AAP10 (Dhein et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol., 350, 174-184 (1994); Muller et al., Eur. J. Pharmacol., 327, 65-72 (1997)), y HP5 (que se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 4.775.743). Sin embargo, estos péptidos presentan características indeseables, que incluyen baja estabilidad, vida media corta, y una falta de biodisponibilidad oral.

El documento WO 2004/048400 describe dipéptidos que facilitan la comunicación intracelular mediada por uniones comunicantes. Este documento propone que los dipéptidos descritos son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con la comunicación intracelular de unión comunicante alterada.

### 45 **Sumario**

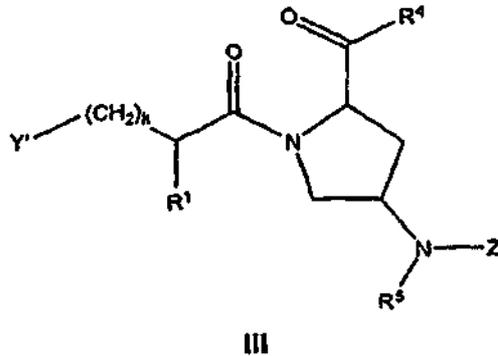
En términos generales, las presentes enseñanzas se refieren a compuestos miméticos de lisina, tal como se define en la reivindicación 1, que tienen actividad farmacológica útil, tal como actividad antiarrítmica, y propiedades deseables de biodisponibilidad.

### 55 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo para estudiar el efecto de los compuestos sobre la disminución de la conducción auricular inducida por estrés metabólico y en un modelo in vitro tal como se describe en Haugan et al., J. Cardiovasc. Electrophysiol., 16, 537-545 (2005).

### 60 **Descripción Detallada**

Las presentes enseñanzas proporcionan compuestos que tienen la Fórmula III:



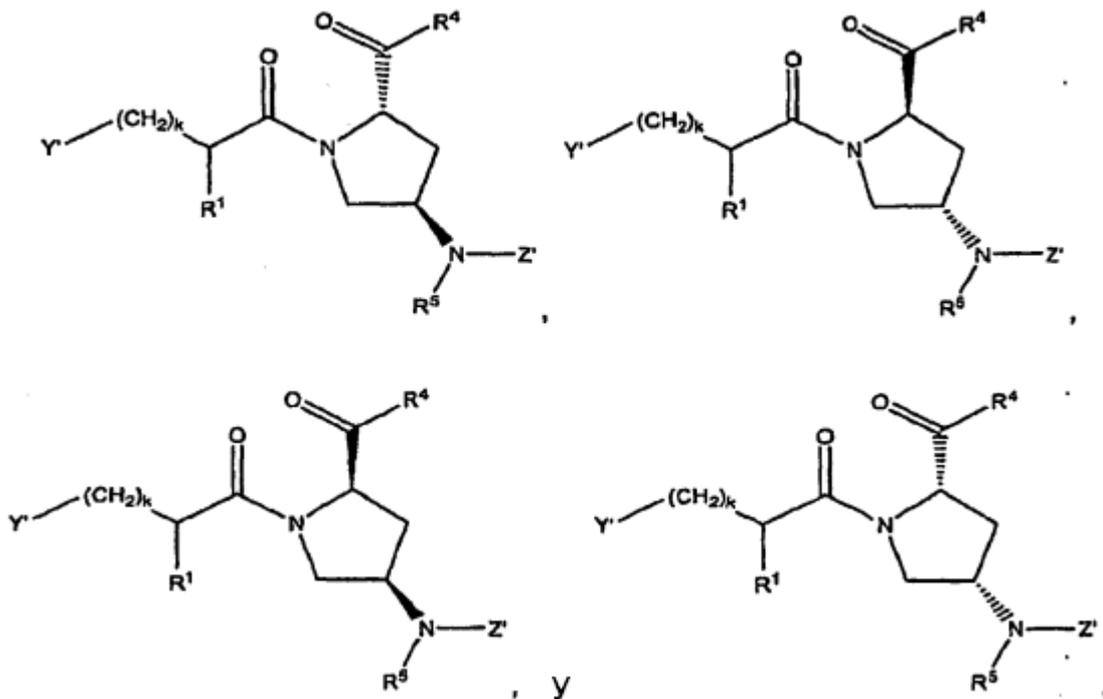
y sales e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

- 5 Y' es  $NR^2R^3$ ;  
 k es 0;  
 Z' es benzoílo opcionalmente sustituido con 1-5 grupos Q; .  
 Q, en cada caso, se selecciona independientemente entre F, Cl, Br, I, alquilo C<sub>1-10</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, O-alquilo C<sub>1-10</sub>,  
 10 OH, NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1-10</sub>), N(alquilo C<sub>1-10</sub>)<sub>2</sub>, y NHC(O)alquilo C<sub>1-10</sub>;  
 R<sup>1</sup> es H;  
 R<sup>2</sup> es H y R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-10</sub>, C(O)R<sup>6</sup>, y C(O)OR<sup>6</sup>;  
 R<sup>4</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
 R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1-10</sub>;  
 R<sup>6</sup> se selecciona entre H, y alquilo C<sub>1-10</sub>.

15 En algunas realizaciones, Y' es  $NR^2R^3$ , R<sup>2</sup> es H, R<sup>3</sup> es C(O)R<sup>6</sup> y R<sup>6</sup> es H (es decir, R<sup>3</sup> es C(O)H) o un alquilo C<sub>1-10</sub> opcionalmente sustituido (por ejemplo, R<sup>3</sup> es C(O)CH<sub>3</sub>).

20 Z' es benzoílo sustituido con 1-5 grupos Q, seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, alquilo C<sub>1-10</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, O-alquilo C<sub>1-10</sub>, OH, NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1-10</sub>), N(alquilo C<sub>1-10</sub>)<sub>2</sub>, y NHC(O)alquilo C<sub>1-10</sub>.

Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen los que tienen las siguientes estructuras:



25 y sales e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En otro aspecto, las presentes enseñanzas proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de acuerdo con las presentes enseñanzas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En el presente documento se desvelan métodos para prevenir o tratar una afección patológica que comprende administrar al sujeto con necesidad del mismo (por ejemplo, un ser humano) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con las presentes enseñanzas. Ejemplos de afecciones patológicas que se pueden tratar o prevenir usando compuestos de las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad cardiovascular (por ejemplo, fibrilación auricular, palpitación auricular, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular); osteoporosis; inflamación del epitelio de las vías respiratorias; trastornos del tejido alveolar; 10 incontinencia urinaria; audición alterada, tal como las debidas a enfermedades de la cóclea; lesiones endoteliales; diabetes que incluye retinopatía diabética y neuropatía diabética; afecciones relacionadas con el SNC; isquemia (por ejemplo, isquemia del sistema nervioso central, médula espinal, cerebro o tronco cerebral); trastornos del tejido dental que incluyen enfermedad periodontal; enfermedades renales; manifestaciones hematológicas (por ejemplo, anemia, leucopenia, trombocitopenia, y pancitopenia) especialmente después del tratamiento con compuestos citostáticos o terapia de radiación; heridas tales como heridas superficiales y heridas profundas resultantes de traumatismos; disfunción eréctil; incontinencia de la vejiga urinaria; dolor neuropático; inflamación subcrónica y crónica; cáncer; insuficiencia de la médula ósea y trasplante de células madre; afecciones que surgen durante el trasplante de células y tejidos durante procedimientos médicos tales como cirugía; afecciones causadas por un exceso de especies que reaccionan con el oxígeno, radicales libres u óxido nítrico; enfermedades o trastornos del 20 embarazo (por ejemplo, preeclampsia y parto prematuro); y apoplejía.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden formular para su administración parenteral u oral.

## 25 A. Definiciones

A menos que se especifique de otro modo, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se usan en la siguiente descripción escrita.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se usa el código de tres letras para los aminoácidos naturales del mismo modo que se aceptan generalmente códigos de tres letras para otros  $\alpha$ -aminoácidos, tales como sarcosina (Sar). Cuando no se ha especificado la forma L o D, se debe entender que el aminoácido en cuestión puede estar en la forma L o D. Una mezcla de cantidades equimolares de compuestos D y L se denomina racémica y se designa con el prefijo DL, por ejemplo, DL-leucina. Como alternativa se puede designar con el prefijo rac- (por ejemplo, rac-leucina) o con el prefijo [+/-]. Las presentes enseñanzas incluyen todos los estereoisómeros posibles de los compuestos de Fórmulas I, II y III así como de los compuestos específicos que se muestran en el presente documento.

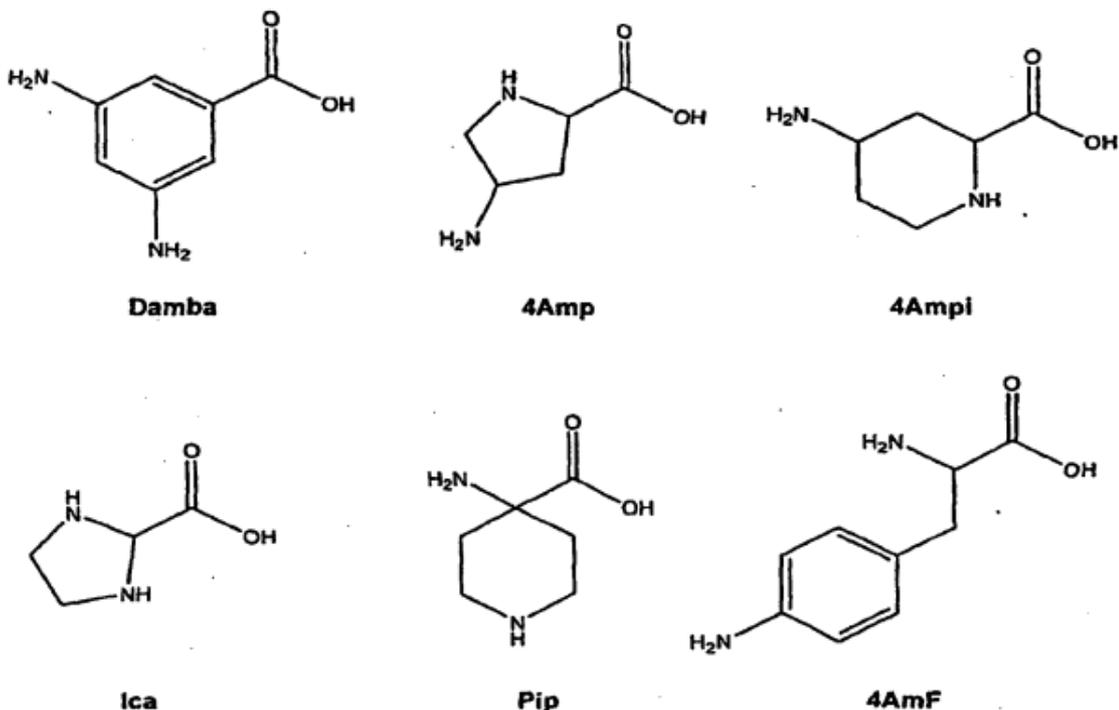
40 En el presente documento, el término "péptido" designa una cadena de dos o más moléculas que están unidas por medio de un enlace peptídico. Los péptidos pueden contener uno o más aminoácidos de origen natural, uno o más aminoácidos no naturales, una o más moléculas que no son aminoácidos pero que son capaces de formar enlaces peptídicos, o mezclas de los mismos.

45 El término "aminoácido" se refiere a una molécula que tiene la fórmula general NHR-CHR'-COOH (en la que R es H y R' es una cadena lateral de aminoácido, o R y R' junto con el carbono y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo, por ejemplo, prolina) que es capaz de formar un enlace peptídico con una u otras moléculas más que tienen la misma fórmula general. El término incluye aminoácidos tanto L como D.

50 Un "aminoácido de origen natural" se refiere a uno de los 20 aminoácidos siguientes: Ala (A), Cys (C), Ser (S), Thr (T), Asp (D), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), His (H), Arg (R), Lys (K), Ile (I), Leu (L), Met (M), Val (V), Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), Gly (G), y Pro (P). Normalmente, éstos son L-aminoácidos, pero las presentes enseñanzas también permiten el uso de D-aminoácidos.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "mimético de lisina" se refiere a un aminoácido no natural que comprende un anillo alifático C<sub>5-6</sub> o aromático y al menos dos funcionalidades amina básicas (es decir, al menos una funcionalidad amina básicas además de la amina N-terminal). En algunos casos, el mimético de lisina tiene la fórmula NHR-CHR'-COOH, en la que R y R' junto con el carbono y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 5-6 miembros, en el que el anillo (a) contiene al menos un nitrógeno del anillo adicional, por ejemplo, imidazolidina-2-carboxílico (Ica), o (b) soporta un influyente de amina, por ejemplo, ácido amino-pirrolidina-2-carboxílico (4Amp) o ácido amino-piperidina-2-carboxílico (4Ampi). En otros casos, el mimético de lisina tiene la fórmula NHR-CHR'-COOH en la que R es H y es una cadena lateral que comprende un anillo alifático C<sub>5-6</sub> o aromático, en la que (a) el anillo contiene al menos un nitrógeno del anillo o soporta un sustituyente de amina, y (b) el anillo se separa del metileno de la estructura principal del aminoácido con 1 o 2 átomos. Un ejemplo no limitante de dicho mimético de lisina es amino-fenilalanina (4AmF), en la que 1 átomo separa el anillo de la estructura principal. Los miméticos de lisina también pueden tener la fórmula NHR-CR'R"-COOH en la que R es H y R' y R" en conjunto forman un anillo alifático C<sub>5-6</sub> o aromático, en el que el anillo contiene al menos un nitrógeno del anillo o

soporta un sustituyente de amina. Un ejemplo no limitante de este tipo de mimético de lisina es el ácido 4-amino-piperidina-4-carboxílico (Pip). Además, están incluidos dentro de la definición de "mimético de lisina" aminoácidos  $\beta$ - y  $\gamma$ -aminoácidos no naturales que comprenden un anillo alifático C<sub>5-6</sub> o aromático y al menos dos funcionalidades amina básicas tal como se ha descrito anteriormente, tal como ácido 3,5-diamino-benzoico (Damba). Otros miméticos de lisina son análogos de 4-aminoprolina en los que el nitrógeno del anillo de prolina no está presente (por ejemplo, ácido 3-aminociclopentanocarboxílico) o está colocado en otra posición en el anillo de prolina (por ejemplo, ácido 3-aminopirrolidina-1-carboxílico o 3-aminopirrolidina-1-carboxamida). En cualquiera de los miméticos de lisina, las funcionalidades de amina pueden ser un grupo amino primario (por ejemplo, 4AmF, Damba, 4Ampi, y 4Amp) o un grupo amino secundario (por ejemplo, Pip e Ica). Ejemplos de miméticos de lisina que tienen grupos alifáticos de amina cíclica y aril aminas incluyen Damba, 4Amp, 4Ampi, Ica, Pip, y 4AmF, que tienen las siguientes estructuras:



El término "halógeno" se refiere a F, Cl, Br, e I.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifático sustituido o sin sustituir, por ejemplo, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, que puede ser de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen grupos metilo (Me), etilo (Et), propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo), pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo) y similares. Dentro de la definición de "alquilo" están incluidas específicamente las cadenas de hidrocarburos alifáticos que están opcionalmente sustituidos.

El término "alqueno", tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifático sustituido o sin sustituir, por ejemplo, que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, que puede ser de cadena lineal o ramificada y que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. El uno o más dobles enlaces pueden ser internos (tal como en 2-buteno) o terminales (tal como en 1-buteno). Preferentemente, los restos alqueno contienen uno o dos dobles enlaces. El término "alqueno" incluye isómeros tanto E como Z de cada uno del uno o más dobles enlaces. Dentro de la definición de "alqueno" están incluidas específicamente las cadenas de hidrocarburos alifáticos que están opcionalmente sustituidos. Ejemplos de restos alqueno incluyen vinilo, alilo, y butenilo (por ejemplo, 1-buteno y 2-buteno).

El término "alquino", tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifático sustituido o sin sustituir, por ejemplo, que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, que puede ser de cadena lineal o ramificada y que contiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. El uno o más enlaces triples carbono-carbono pueden ser internos (tal como en 2-butino) o terminales (tal como en 1-butino). Dentro de la definición de "alquino" están incluidas específicamente las cadenas de hidrocarburos alifáticos que están opcionalmente sustituidos. Ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, y similares.

40

Tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, el término "cicloalquilo" se refiere a grupos carbocíclicos no aromáticos sustituidos o sin sustituir, por ejemplo, que tienen de 3 a 20 átomos de carbono en el anillo y que contienen opcionalmente uno o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) dobles o triples enlaces, incluyendo grupos ciclados de alquilo, alqueno, y alquino. Los grupos cicloalquilo pueden ser monocíclicos (*por ejemplo*, ciclohexilo) o policíclicos (por ejemplo, sistemas de anillo condensado, con puente, o espiro), en los que los átomos de carbono están colocados dentro o fuera del sistema de anillos. Cualquier posición adecuada del anillo del resto cicloalquilo puede estar unida covalentemente a la estructura química definida. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos, homólogos, isómeros de ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo, espiro[4,5]decanilo, y similares. Además, en la definición de grupos cicloalquilo están incluidos restos que tienen uno o más anillos aromáticos condensados (*es decir*, que tienen un enlace en común con) el anillo de cicloalquilo, por ejemplo, derivados benzo de ciclopentano (indanilo), ciclohexano (tetrahidronaftilo), y similares. Dentro de la definición de "cicloalquilo" están incluidos específicamente los carbociclos que están opcionalmente sustituidos.

El término "arilo", tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a hidrocarburos monocíclicos o policíclicos aromáticos sustituidos o sin sustituir tales como, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, y similares. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Cualquier posición adecuada del anillo del resto arilo puede estar unida covalentemente a la estructura química definida (por ejemplo, 1-naftilo, 2-naftilo, etc.). Dentro de la definición de "arilo" están incluidos específicamente son los hidrocarburos aromáticos que están opcionalmente sustituidos.

El término "aralquilo" se refiere a un resto arilo, tal como se define en el presente documento, unido a un resto alquilo, tal como se define en el presente documento. Los grupos aralquilo están unidos covalentemente a la estructura química definida a través de sus grupos alquilo. Los grupos aralquilo pueden estar opcionalmente sustituidos en el resto arilo, el resto alquilo, o ambos.

Tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, "cicloheteroalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo no aromático sustituido o sin sustituir, por ejemplo, que tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, que contiene 1-4 heteroátomos en el anillo seleccionados independientemente entre oxígeno (O), nitrógeno (N) y azufre (S), y que opcionalmente contiene uno o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) dobles o triples enlaces. El grupo cicloheteroalquilo puede estar unido a la estructura química definida en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Uno o más átomos de N o S en un anillo cicloheteroalquilo pueden estar oxidados (*por ejemplo*, N-hidroxipiperidina, N-óxido de morfolina, S-óxido de tiomorfolina, S,S-dióxido de tiomorfolina). Ejemplos de grupos cicloheteroalquilo incluyen morfolina, tiomorfolina, pirano, imidazolidina, imidazolina, oxazolidina, pirazolidina, pirazolina, pirrolidina, pirrolina, tetrahydrofurano, tetrahidrotiofeno, piperidina, piperazina, y similares. Además, en la definición de cicloheteroalquilo están incluidos restos que tienen uno o más anillos aromáticos condensados (*es decir*, tienen un enlace en común con) con el anillo de cicloheteroalquilo, por ejemplo, benzoimidazolina, cromano, cromeno, indolina tetrahydroquinolina, y similares. Los grupos cicloheteroalquilo también pueden contener uno o más grupos oxo, tales como ftalimida, piperidona, oxazolidinona, pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, piridin-2(1H)-ona, y similares. Dentro de la definición de "cicloheteroalquilo" están incluidos específicamente los sistemas de anillo que están opcionalmente sustituidos en cualquier heteroátomo y/o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable.

Tal como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, "heteroarilo" se refiere a sistemas de anillo aromático monocíclico o policíclico que tienen de 5 a 20 átomos en el anillo y que contienen 1-4 heteroátomos en el anillo seleccionados independientemente entre O, N y S. Generalmente, los anillos de heteroarilo no contienen enlaces O-O, S-S, o S-O. Los grupos heteroarilo incluyen anillos de heteroarilo monocíclico condensados con un anillo de fenilo. El grupo heteroarilo puede estar unido a la estructura química definida en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Uno o más átomos de N o S en un anillo de heteroarilo pueden estar oxidados (*por ejemplo*, N-hidroxipiridina, N-óxido de piridina, S-óxido de tiofeno, S,S-dióxido de tiofeno). Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, piridina, pirimidina, piridazina, pirazina, triazol, pirazol, imidazol, isotiazol, tiazol, tiadiazol, isoxazol, oxazol, oxadiazol, indol, isoindol, benzofurano, benzotiofeno, quinolina, 2-metilquinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, benzotriazol, benzotetrazol, indazol, benzoimidazol, benzotiazol, benzoisotiazol, benzoisoxazol, benzoxadiazol, benzoxazol, cinnolina, 1H-indazol, 2H-indazol, indolizina, isobenzofurano, naftiridina, ftalazina, pteridina, purina, oxazolopiridina, tiazolopiridina, imidazopiridina, furopiridina, tienopiridina, piridopirimidina, piridopirazina, piridopiridazina, tienotiazol, tienoxazol, y tienoimidazol. Dentro de la definición de "heteroarilo" están incluidos específicamente los sistemas de anillo aromático que están opcionalmente sustituidos en cualquier heteroátomo y/o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable.

El término "heterociclo" se refiere a un heteroarilo o cicloheteroalquilo tal como se define en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "bioisómero de ácido carboxílico" se refiere un sustituyente o grupo que tiene propiedades químicas físicas similares a las de un resto de ácido carboxílico y que produce propiedades químicas muy similares a las de un resto de ácido carboxílico. Véase, generalmente, R. B. Silverman. The Organic

Chemistry of Drug Design and Drug Action (Academic Press, 1992). Ejemplos de bioisómeros de ácido carboxílico incluyen, pero no se limitan, amidas, sulfonamidas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfonamídicos, fosfonatos de alquilo, N-cianoacetamidas, 3-hidroxi-4H-piran-4-ona, imidazoles, oxazoles, tiazoles, pirazoles, triazoles, oxadiazoles, tiadiazoles, o tetrazoles, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido (por ejemplo, con alquilo C<sub>1-10</sub>, OH, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, "bioisómero de amida" se recrea un sustituyente o grupo que tiene propiedades químicas físicas similares a las de un resto de amida y que produce propiedades químicas muy similares a las de un resto de amida. Véase, generalmente, R. B. Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Academic Press, 1992). Ejemplos de bioisómeros de amida incluyen, pero no se limitan, ácidos carboxílicos, sulfonamidas, ácido sulfónicos, ácidos fosfonamídicos, fosfonatos de alquilo, N-cianoacetamidas, 3-hidroxi-4H-piran-4-ona, imidazoles, oxazoles, tiazoles, pirazoles, triazoles, oxadiazoles, tiadiazoles, o tetrazoles, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido (por ejemplo, con alquilo C<sub>1-10</sub>, OH, etc.).

La expresión "grupo hidrófobo" se refiere a un anillo de carbono aromático opcionalmente sustituido, preferentemente un anillo de carbono aromático de 6 a 12 miembros. El grupo hidrófobo puede estar opcionalmente sustituido tal como se analiza a continuación. Grupos hidrófobos ilustrativos incluyen bencilo, fenilo, y naftilo.

La expresión "opcionalmente sustituido" tal como se usa en el presente documento significa que uno o más átomos de hidrógeno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de hidrógeno) del grupo cada uno puede estar reemplazado con un átomo o grupo sustituyente usado habitualmente en la química farmacéutica. Cada sustituyente puede ser el mismo o diferente. Ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, cicloheteroalquilo, heteroarilo, OR<sup>6</sup> (por ejemplo, hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi, y propoxi), ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, éter, éster, carbamato, etc.), hidroxialquilo, alcoxycarbonilo, alcoxialcoxi, perhaloalquilo, perfluoroalquilo (por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>), perfluoroalcoxi (por ejemplo, OCF<sub>3</sub>, OCF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>), alcoxialquilo, SR<sup>6</sup> (por ejemplo, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, aralquiltio, etc.), S<sup>+</sup>R<sub>2</sub><sup>6</sup>, S(O)R<sup>6</sup>; SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> (por ejemplo, amina primaria (es decir, NH<sub>2</sub>), amina secundaria, amina terciaria, amida, carbamato, urea, etc.), hidrazida, haluro, nitrilo, nitro, sulfuro, sulfóxido, sulfona, sulfonamida, tiol, carboxi, aldehído, ceto, ácido carboxílico, éster, amida, imina, e imida, incluyendo derivados seleno y tio de los mismos, en los que cada uno de los sustituyentes adicionalmente puede estar opcionalmente sustituido. Preferentemente, los sustituyentes opcionales en 1-3 pueden estar presentes, en los que los sustituyentes son grupos Q tal como se define en el presente documento. En realizaciones en las que un grupo funcional con un anillo de carbono aromático está sustituido, dichas sustituciones por lo general enumerarán menos de aproximadamente 10 sustituciones, más preferentemente de aproximadamente 1 a 5, siendo preferente con aproximadamente 1 o 2 sustituciones.

Los números de carbonos usados en las definiciones en el presente documento (por ejemplo, alquilo C<sub>1-10</sub>, alqueno C<sub>2-10</sub>, alquino C<sub>2-10</sub>, arilo C<sub>6-20</sub>, etc.) hacen referencia a la estructura principal de carbono y a la ramificación de carbono, pero no incluyen átomos de carbono de los sustituyentes.

En diversos lugares en la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de compuestos de las presentes enseñanzas se desvelan en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que las presentes enseñanzas incluyan todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos intervalos. Por ejemplo, el término "alquilo C<sub>1-6</sub>" pretende divulgar específicamente de forma individual a alquilo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>1-C6</sub>, C<sub>1-C5</sub>, C<sub>1-C4</sub>, C<sub>1-C3</sub>, C<sub>1-C2</sub>, C<sub>2-C6</sub>, C<sub>2-C5</sub>, C<sub>2-C4</sub>, C<sub>2-C3</sub>, C<sub>3-C6</sub>, C<sub>3-C5</sub>, C<sub>3-C4</sub>, C<sub>4-C6</sub>, C<sub>4-C5</sub>, y C<sub>5-C6</sub>. De forma análoga, el término "alquilo C<sub>1-10</sub>" pretende divulgar específicamente de forma individual a alquilo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>1-C10</sub>, C<sub>1-C9</sub>, C<sub>1-C8</sub>, C<sub>1-C7</sub>, C<sub>1-C6</sub>, C<sub>1-C5</sub>, C<sub>1-C4</sub>, C<sub>1-C3</sub>, C<sub>1-C2</sub>, C<sub>2-C10</sub>, C<sub>2-C9</sub>, C<sub>2-C8</sub>, C<sub>2-C7</sub>, C<sub>2-C6</sub>, C<sub>2-C5</sub>, C<sub>2-C4</sub>, C<sub>2-C3</sub>, C<sub>3-C10</sub>, C<sub>3-C9</sub>, C<sub>3-C8</sub>, C<sub>3-C7</sub>, C<sub>3-C6</sub>, C<sub>3-C5</sub>, C<sub>3-C4</sub>, C<sub>4-C10</sub>, C<sub>4-C9</sub>, C<sub>4-C8</sub>, C<sub>4-C7</sub>, C<sub>4-C6</sub>, C<sub>4-C5</sub>, C<sub>5-C10</sub>, C<sub>5-C9</sub>, C<sub>5-C8</sub>, C<sub>5-C7</sub>, C<sub>5-C6</sub>, C<sub>6-C10</sub>, C<sub>6-C9</sub>, C<sub>6-C8</sub>, C<sub>6-C7</sub>, C<sub>7-C10</sub>, C<sub>7-C9</sub>, C<sub>7-C8</sub>, C<sub>8-C10</sub>, C<sub>8-C9</sub>, y C<sub>9-C10</sub>.

Los compuestos de las presentes enseñanzas pueden contener un átomo asimétrico (también denominado un centro quiral), y algunos de los compuestos pueden contener uno o más átomos o centros asimétricos, que de este modo pueden dar lugar a isómeros ópticos (enantiómeros) y diastereómeros. Las presentes enseñanzas incluyen dichos enantiómeros y diastereómeros, así como los estereoisómeros R y S enantioméricamente puros, racémicos y resueltos, así como otras mezclas de los estereoisómeros R y S y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los isómeros ópticos se pueden obtener en forma pura mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, formación de sales diastereoméricas, resolución cinética, y síntesis asimétrica. Las presentes enseñanzas también incluyen isómeros cis y trans de compuestos que contienen restos alqueno (por ejemplo, alqueno e iminas). También se debe entender que las presentes enseñanzas incluyen todos los regioisómeros posibles, y mezclas de los mismos, que se pueden obtener en forma pura mediante procedimientos de separación convencional conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, pero no se limitan a, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, y cromatografía líquida de alto rendimiento.

Las expresiones "modulador de la comunicación intercelular", "facilitador de la unión comunicante", "compuesto que facilita la comunicación de la unión comunicante" y "agente de apertura de la unión comunicante", etc., todas se refieren a un compuesto que facilita, o que mantiene, o que normaliza, la comunicación intercelular de la unión comunicante (GJIC), independientemente del mecanismo en particular detrás de esta acción. Más específicamente,

el término "agente de apertura de la unión comunicante" puede hacer referencia a una sustancia que normaliza (es decir, aumenta) el intercambio de moléculas que son capaces de pasar a través de uniones comunicantes entre espacios extracelulares and e intracelulares y/o que pueden normalizar o aumentar la GJIC.

5 El término "agonista" se refiere a un compuesto puede interactuar con un tejido, célula o fracción celular que es la diana de un compuesto AAP, AAP10, o HP5 (o análogo funcional del mismo), para provocar básicamente las mismas respuestas fisiológicas en el tejido, célula o fracción celular del mismo modo que el compuesto AAP, AAP10, o HP5 (o análogo funcional del mismo). En un aspecto, la respuesta fisiológica es uno o más de contracción, relajación, secreción, activación enzimática, etc. Preferentemente, el compuestos que une al tejido, célula o fracción celular. En un aspecto, el compuesto se une a un receptor en el tejido, célula o fracción celular, que se une a AAP, AAP10, o HP5 (o un análogo funcional del mismo).

15 El término "antagonista" se refiere a un compuesto que inhibe o antagoniza una o más respuestas fisiológicas observadas en un tejido, célula o fracción celular después de poner en contacto el tejido, célula o fracción celular con el compuesto AAP, AAP10, o HP5 (o análogo funcional del mismo). En un aspecto, la respuesta fisiológica es una o más de contracción, relajación, secreción, activación enzimática, etc. Preferentemente, el compuesto se une al tejido, célula o fracción celular . En un aspecto, el compuesto se une a un receptor en el tejido, célula o fracción celular que se une al AAP, AAP10, o HP5 (o análogo funcional del mismo) y/o que inhibe la unión de uno o más de AAP, AAP10, o HP5 (o análogo funcional del mismo) al receptor.

20 Tal como se usa en el presente documento, "normalizar" se refiere a un cambio en una respuesta fisiológica de modo que la respuesta se convierte en insignificamente diferente de la observada en un paciente normal. Por lo tanto, la normalización puede implicar un aumento o disminución en la respuesta dependiendo de la patología implicada.

25

### **B. Compuestos a modo de ejemplo**

A continuación se indican compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con las presentes enseñanzas. En algunos casos, nombres alternativos para los compuestos se incluyen entre paréntesis después del nombre químico.

30

Compuesto 1: Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-Nitrobenzoi)-OH)

35

Compuesto 2: Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico, ácido ((2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico, H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(Benzoi)-OH)

40

Compuesto 3: Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-metilbenzoi)-OH)

45

Compuesto 4: Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4R)-4Amp(4-metoxibenzoil)-OH)

50

Compuesto 10: Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4R)-4Amp(4-hidroxibenzoil)-OH)

45

Compuesto 11: Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(4-metoxibenzoil)-OH)

50

Compuesto 12: Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(4-metilbenzoil)-OH)

55

Compuesto 13: Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4S)-4Amp(4-nitrobenzoil)-OH)

55

Compuesto 14: Ácido (2S,4S)1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(benzoi)-OH)

60

Compuesto 18: Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-piperidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S4S)-4Ampi(Benzoi)-OH)

60

Compuesto 64: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida

Compuesto 65: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida

65

Compuesto 66: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida

- Compuesto 67: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 68: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida
- 5 Compuesto 69: (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 70: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida
- 10 Compuesto 71: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 72: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 73: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida
- 15 Compuesto 74: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 76: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3-metilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida
- Compuesto 77: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3,3-dimetilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida
- 20 Compuesto 80: ácido (2S,4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 81: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico
- 25 Compuesto 82: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 83: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 85: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico
- 30 Compuesto 93: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(2-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 94: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- 35 Compuesto 95: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 96: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(2-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 97: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- 40 Compuesto 98: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 99: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-metoxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- 45 Compuesto 100: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-metoxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- Compuesto 101: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-hidroxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico
- 50 Compuesto 102: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-hidroxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Las presentes enseñanzas también incluyen isómeros y/o enantiómeros de los compuestos que se han indicado anteriormente (por ejemplo, 2S4S, 2S,4R, 2R4R, 2R4S, 3S5S, 3S5R, 3R5R, 3R5S), así como sus sales e hidratos.

- 55 Se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las presentes enseñanzas que tienen un resto ácido usando bases orgánicas e inorgánicas. Sales adecuadas formadas con bases incluyen sales de metales, tales como sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, por ejemplo sales de sodio, potasio, o magnesio; sales de amoniaco y sales orgánicas de amina, tales como las formadas con morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, a alquilamina mono-, di- o tri-inferior (*por ejemplo*, etil-terc-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- o dimetilpropilamina), o una alquilamina mono-, di- o trihidroxi inferior (*por ejemplo*, mono-, di- o trietanolamina). También se pueden formar sales internas. De forma análoga, cuando un compuesto de las
- 60 presentes enseñanzas contiene un resto básico, se pueden formar sales usando ácidos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, se pueden formar sales a partir de los siguientes ácidos: acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, y alcanforsulfónico así como otros
- 65 ácidos farmacéuticamente aceptables conocidos. También se pueden formar sales de adición de aminoácidos con aminoácidos tales como lisina, glicina, o fenilalanina.

Además se desvelan profármacos de los compuestos que se describen en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "profármaco" se refiere a un resto que produce, genera o libera un compuesto de las presentes enseñanzas cuando se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos se pueden preparar por modificación de grupos funcionales presentes en los compuestos de tal modo que las modificaciones se escinden, mediante manipulación de rutina o *in vivo*, a partir de los compuestos precursores. Ejemplos de profármacos incluyen compuestos de las presentes enseñanzas tal como se describe en el presente documento que contienen uno o más restos moleculares adjuntos a un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo, o carboxilo del compuesto, y que cuando se administran a un sujeto mamífero, se escinde *in vivo* para formar el grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo, o carboxilo libre, respectivamente. Ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales de alcohol y amina en los compuestos de las presentes enseñanzas. Ejemplos de profármacos preferentes incluyen profármacos de oxazolidinona o imidazolidinona. Los profármacos de éster se forman preferentemente alcoholes inferiores, tales como alcoholes C<sub>1-8</sub>. La preparación y uso de profármacos se analiza en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 de Symposium Series de la A.C.S., y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

Además se desvelan derivados de los compuestos, y más particularmente formas protegidas de los compuestos. A modo de ejemplo, los compuestos pueden estar protegidos en sus extremos N y/o C, y/o en la cadena lateral de aminoácido (en los compuestos en los que R<sup>1</sup> es una cadena lateral de aminoácido). Ejemplos de grupos de protección incluyen tBu, Boc, Fmoc, Fm, Bencilo, Dde y Z y también incluyen los compuestos cuando se acoplan a una fase sólida, por ejemplo, cuando se han preparado por síntesis en fase sólida.

### C. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de las presentes enseñanzas pueden servir como medicamentos en su forma pura o como composiciones farmacéuticas, que se pueden administrar a través de cualquier método aceptable conocido en la técnica, de forma individual o en combinación. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden comprender un compuesto de las presentes enseñanzas en mezcla con uno o más medio de soporte, diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones se pueden formular para administración oral (incluyendo cavidad bucal o por vía sublingual) o por administración parenteral (incluyendo administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.)). Otras vías de administración incluyen administración epidural, rectal, intranasal o dérmica o por inhalación pulmonar. Las formulaciones especialmente preferentes proporcionan liberación sostenida de los compuestos de las presentes enseñanzas. Las composiciones están preferentemente en forma de formulaciones sólidas o líquidas y métodos para su preparación se describen generalmente en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17<sup>a</sup> Ed., Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985.

Dichas composiciones contienen generalmente una cantidad eficaz del uno o más compuestos activos de las presentes enseñanzas, junto con un vehículo adecuado para proporcionar la dosificación en una forma compatible con la vía de administración seleccionada. Preferentemente, el vehículo está en forma de un vehículo, un diluyente, un agente de tamponamiento, un agente para el ajuste de la tonicidad, un conservante y estabilizantes. Los excipientes que constituyen el vehículo deben ser compatibles con el principio o principios farmacéuticos activos y son preferentemente capaces de estabilizar a los compuestos sin ser perjudiciales para el sujeto que se está tratando.

Una forma de formulación de depósito o de liberación sostenida se puede usar de modo que cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación se administren en el torrente sanguíneo durante muchas horas o días después de la administración del compuesto o composición, por ejemplo, por inyección o deposición transdérmica. Formulaciones adecuadas para liberación sostenida incluyen polímeros biodegradables, tales como ácido L-láctico, ácido D-láctico, ácido DL-láctico, glicólido, ácido glicólico, e isómeros de los mismos. De forma análoga, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

Otras formulaciones de liberación sostenida pueden incluir, pero no se limitan a, formulaciones que incluyen al menos uno de los compuestos, que se desvelan en el presente documento, combinadas con liposomas, microesferas, emulsiones o micelas y estabilizantes líquidos.

Las dosis de los compuestos y composiciones de las presentes enseñanzas requeridas para los efectos terapéuticos deseados dependerán de la potencia del compuesto, la composición usada en particular y la vía de administración seleccionada. Los compuestos por lo general se administrarán en el intervalo de aproximadamente 0,001 g a 10 g por paciente al día. Por ejemplo, los compuestos se pueden administrar en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por paciente al día, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg por paciente al día, o aproximadamente 50 mg por paciente al día.

El régimen de dosificación más adecuado lo puede determinar mejor un profesional médico para cada paciente de forma individual. El régimen óptimo de dosificación con los compuestos y composiciones farmacéuticas de acuerdo

con las presentes enseñanzas depende de factores tales como la enfermedad o trastorno en particular que se está tratando, el efecto deseado, y la edad, peso o índice de masa corporal, y las condiciones físicas generales del paciente. La administración se puede realizar en una sola forma de dosificación individual para aliviar síntomas agudos o como una terapia continua en forma de dosis múltiples en el tiempo. Como alternativa, se pueden usar sistemas de infusión continua con formulaciones de liberación prolongada lenta. Dos o más compuestos o composiciones farmacéuticas de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden coadministrar simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Además, los compuestos y composiciones se pueden administrar de una manera similar con fines profilácticos. Por último, el mejor régimen de dosificación no decidirá el médico que prescribe para cada paciente de forma individual.

#### D. Usos terapéuticos

Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden facilitar y/o mantener la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes. En un aspecto, los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se dirigen a las mismas células dirigidas por AAP, AAP10, HP5, y/o análogos funcionales de los mismos, es decir los compuestos son capaces de modular la función de estas células al agonizar o antagonizar la función de AAP, AAP10, HP5, y/o análogos funcionales de los mismos. El alcance de las presentes enseñanzas, sin embargo, no se limita a compuestos que tienen propiedades agonistas antagonistas específicas de AAP. Las presentes enseñanzas tales se refieren a la preparación y uso de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías que se pueden asociar con comunicación de unión comunicante intercelular alterada y métodos de uso de estas composiciones, por ejemplo tal como se desvela en el documento WO 02/077017 "New Medical Uses of Intercellular Communication Facilitating Compounds."

En el presente documento se describen métodos para tratar a un sujeto que padece, o prevenir a un sujeto en riesgo de desarrollar, una afección asociada con GJIC alterada (por ejemplo, arritmia cardíaca u osteoporosis) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos de las presentes enseñanzas. Los individuos que se pueden tratar usando compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, animales, preferentemente mamíferos, por ejemplo, roedores (que incluyen ratones, ratas, hámsters, y lagomorfos, tales como conejos), perros, cerdos, cabras (generalmente cualquier animal doméstico), y primates. En un aspecto preferente, el sujeto es un ser humano.

Ejemplos de afecciones que se pueden tratar o prevenir usando compuestos de las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad cardiovascular; osteoporosis; inflamación del epitelio de las vías respiratorias; trastornos del tejido alveolar; incontinencia urinaria; audición alterada (por ejemplo, debido a enfermedades de la cóclea); lesiones endoteliales; diabetes (Tipo I o Tipo II) y complicaciones diabéticas (incluyendo retinopatía diabética y neuropatía diabética); aterosclerosis; afecciones relacionadas con el SNC; ataques; isquemia (por ejemplo, isquemia del sistema nervioso central, médula espinal, cerebro o tronco cerebral); trastornos del tejido dental (incluyendo enfermedad periodontal); enfermedades renales; manifestaciones hematológicas (por ejemplo, anemia, leucopenia, trombocitopenia, y pancitopenia, especialmente después del tratamiento con compuestos citostáticos o terapia de radiación); heridas (por ejemplo, heridas superficiales y heridas profundas resultantes de traumatismos); fracturas de huesos; disfunción eréctil; incontinencia de la vejiga urinaria; dolor neuropático; inflamación subcrónica y crónica; cáncer; insuficiencia de la médula ósea y trasplante de células madre; afecciones que surgen durante el trasplante de células y tejidos durante procedimientos médicos tales como cirugía; afecciones causadas por un exceso de especies que reaccionan con el oxígeno y/o radicales libres y/o óxido nítrico; enfermedades o trastornos del embarazo (por ejemplo, preeclampsia y parto prematuro); infertilidad femenina; y apoplejía. Además se pueden usar compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas para inducir el parto (por ejemplo, al facilitar el efecto de la oxitocina en la contracción del útero).

En un aspecto preferente, las presentes enseñanzas proporcionan un compuesto antiarrítmico farmacológicamente activo para el tratamiento o la prevención de arritmias y complicaciones trombóticas que surgen durante trastornos cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca isquémica aguda (por ejemplo, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, infarto de miocardio agudo), insuficiencia cardíaca congestiva (por ejemplo, insuficiencia cardíaca sistólica, diastólica, alto rendimiento, bajo rendimiento, en el lado derecho o izquierdo), enfermedades cardíacas congénitas, cor pulmonale, cardiomiopatías, miocarditis, enfermedad cardíaca hipertensiva, durante la revascularización coronaria, y similares. En realizaciones específicas, se pueden usar compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas para tratar y/o prevenir bradiarritmias (por ejemplo, debidas a enfermedad del nódulo sinusal, nódulo AV, haz de His, drama del haz derecho o izquierdo), y taquiarritmias asociadas con reentrada (por ejemplo, complejos prematuros auriculares, complejos de unión AV, complejos prematuros ventriculares, fibrilación auricular, palpitación auricular, taquicardia supraventricular paroximal, taquicardia por reentrada en el nódulo sinusal, taquicardia por reentrada nodal AV, y taquicardia ventricular no sostenida). Además, los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden ser útiles para el alivio de una afección patológica en la que la disminución de la velocidad de conducción es un factor importante, por ejemplo taquicardia ventricular, fibrilación ventricular, y fibrilación auricular. Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden administrar solos o en combinación con otros compuestos antiarrítmicos, tales como agentes de clase I (por ejemplo, lidocaína), agentes de clase II (por ejemplo, metoprolol o propranolol), agentes de clase III (por ejemplo, amiodarona o sotalol) o agentes de clase IV (por ejemplo, verapamilo).

Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas también se pueden usar para tratar de prevenir una o más de arritmia de reentrada, reentrada ventricular (por ejemplo, que se produce durante el infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio crónico, angina de pecho estable y angina de pecho inestable), cardiomiopatía infecciosa o autónoma, auricular fibrilación, repolarización alterna, taquicardia ventricular monomórfica, ondas T alternas, bradiarritmias, contracción reducida del tejido cardiaco, trombosis, y similares.

Las funciones adicionales en las que se ha visto implicada la comunicación intercelular de unión comunicante endotelial son el comportamiento migratorio de células endoteliales después de la lesión, angiogénesis, crecimiento endotelial y envejecimiento y la coordinación de respuestas vasomotoras (Christ et al. Braz. J Med Biol. Res., 33, 423-429 (2000)). Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden usar para aumentar las respuestas vasculares conducidas y para mejorar el suministro sanguíneo durante afecciones con mayor demanda metabólica (por ejemplo, ejercicio físico, taquicardia), y durante la isquemia.

Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden usar para citoproteger un tejido órgano de un mamífero con necesidad de dicho tratamiento. Citoproteger se refiere a reducir, presentar o aliviar síntomas asociados con hinchazón celular no deseada. Tejidos y órganos en particular que se beneficiarán del método incluyen los confinados o impactados de otro modo por una cápsula fibrosa tal como corazón o riñón. Además se incluyen tejidos asociados con huesos tales como cerebro, médula espinal y médula ósea. Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden usar para prevenir o tratar la lesión isquémica en los órganos de un mamífero con necesidad de dicho tratamiento, que incluyen, por ejemplo, el corazón, sistema nervioso central, riñón, tracto gastrointestinal, hígado, pulmones, y extremidades.

En el presente documento se describe el uso de los compuestos para tratar de prevenir manifestaciones hematológicas después del tratamiento con compuestos citostáticos o terapia de radiación. Se observa recuperación de la hematopoyesis alterada en pacientes después del tratamiento citostático con 5-fluorouracilo (5-FU). Esto incluye ausencia de recuperación de los recuentos sanguíneos periféricos, que incluyen neutropenia grave, anemia grave con reticulocitopenia y presencia de eritrocitos periféricos anómalos y trombocitopenia grave. Además, se observan disminuciones de 5-8 veces de celularidad de la médula ósea y contenido de precursores hematopoyéticos (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), unidades formadoras de colonias de estallido de eritroides (BFU-E), unidades formadoras de colonias mixtas (CFU-mix), y unidades formadoras de colonias globales (CFU-C) en médula ósea. (Véase, por ejemplo, Montecino-Rodriguez et al., Blood, 96, 917-924, (2000); Presley et al., Resumen N° 55, IGJC 2005, Whistier, Canadá (2005)). En este aspecto de las presentes enseñanzas se incluye el tratamiento o la prevención de situaciones clínicas generales asociadas normalmente con la pancitopenia iatrogénica.

Los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden usar para tratar de prevenir la osteoporosis. Se sabe que la GJC es importante en la formación ósea. La eficacia de los compuestos se puede evaluar, por ejemplo, mediante un aumento en la actividad de los osteoblastos en un ensayo convencional de actividad de osteoblastos que mide la formación de ondas de calcio y/o la actividad de la fosfatasa alcalina de células de osteoblastos en presencia de los compuestos. La actividad de la fosfatasa alcalina también se puede usar para proporcionar una medida de la actividad de los osteoblastos usando ensayos de colorimetría convencionales.

Preferentemente, uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas de acuerdo con las presentes enseñanzas se administran a un individuo con necesidad de los mismos en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que reduce los síntomas de una afección o patología dadas, y preferentemente que normaliza las respuestas fisiológicas en un sujeto con la afección o patología. La reducción de los síntomas o la normalización de las respuestas fisiológicas se pueden determinar usando métodos de rutina en la técnica y pueden variar con una afección o patología dadas. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas es una cantidad que restaura un parámetro fisiológico que se puede medir hasta básicamente el mismo valor (preferentemente hasta dentro de un  $\pm 30\%$ , más preferentemente hasta dentro de un  $\pm 20\%$ , y aún más preferentemente, hasta dentro de un  $\pm 10\%$  del valor) del parámetro en sujetos sin la afección o patología.

La cantidad eficaz la determinará el experto habitual teniendo en cuenta factores tales como la potencia del fármaco, edad y constitución del paciente, peso corporal, perfil farmacocinético del fármaco, y en general el fármaco se prescribirá para cada paciente o grupo de pacientes. Sin embargo, la cantidad eficaz del compuesto puede ser de al menos aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día, tal como al menos aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día, al menos aproximadamente 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día, y al menos aproximadamente 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día. Por otro lado, la cantidad eficaz del compuesto o dímero puede ser como máximo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, tal como máximo de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal/día y como máximo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día. Se espera que la cantidad eficaz del compuesto será de aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día, aproximadamente 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día o de aproximadamente 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal.

## E. Ensayos biológicos

Los compuestos preferentes de las presentes enseñanzas pueden mostrar unión, preferentemente unión específica, a un tejido, célula, o fracción celular en lo que en el presente documento se menciona como un "ensayo convencional de unión al sitio de AAP". El ensayo puede detectar y opcionalmente cuantificar la unión de un compuesto objetivo, por ejemplo, AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo. En una realización preferente, el compuesto puede ser un modulador de la función de dicho tejido, célula, o fracción celular (es decir el compuesto agoniza o antagoniza la función del péptido antiarrítmico). En otra realización, el compuesto puede ser un modulador de un receptor para el péptido antiarrítmico (es decir el compuesto es un agonista o un antagonista del receptor). Además, los compuestos preferentes de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden mostrar una buena función como moduladores de la comunicación de uniones comunicantes (por ejemplo, como agonistas o antagonistas de AAP). En un aspecto, los compuestos pueden funcionar como fármacos antiarrítmicos.

Los compuestos agonistas preferentes de las presentes enseñanzas pueden proporcionar una conductancia intracelular (Gj) que es básicamente la misma que, o es mayor que, la Gj de AAP en lo que en el presente documento se menciona como un "ensayo convencional de cardiomiocitos". Los compuestos antagonistas preferentes pueden proporcionar una Gj que es menor (por ejemplo, al menos inferior en aproximadamente un 10 %, o al menos en aproximadamente un 20 %) que la Gj de AAP y/o bloquear la capacidad de AAP para normalizar la Gj de una célula isquémica, es decir, devolver a la Gj a básicamente los mismos valores encontrados en células no isquémicas. Además, los compuestos preferentes de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden aumentar el tiempo de bloqueo de AV en un ratón después de infusión de  $\text{CaCl}_2$  en lo que en el presente documento se menciona como un "ensayo convencional de arritmia inducida por calcio". Los compuestos de las presentes enseñanzas pueden prevenir la disminución de la conducción cardíaca en presencia de diversas formas de estrés metabólico (por ejemplo, isquemia, hipoglucemia o acidosis) en lo que en el presente documento se menciona como un "modelo convencional de separación auricular aislada de disminución de la conducción inducida por estrés metabólico". Los compuestos de las presentes enseñanzas pueden mostrar adicionalmente disminuciones en la incidencia de arritmias de reentrada o en el tamaño de una zona de infarto observada en lo que en el presente documento se menciona como un "ensayo convencional de reentrada ventricular".

En algunas realizaciones, los compuestos de las presentes enseñanzas pueden presentar una buena vida media de acuerdo con en lo que en el presente documento se menciona como un "ensayo de estabilidad plasmática *in vitro*". Los compuestos que muestran una buena estabilidad en el ensayo tienen, en una realización, una vida media superior a aproximadamente 48 horas, o superior a 24 horas, o superior a 12 horas, o superior a 6 horas, o superior a 3 horas, o superior a 1 hora, o superior a 30 minutos, o superior a 20 minutos, o superior a 15 minutos, o superior a 10 minutos, o superior a 5 minutos, o superior a 1 minuto. En estas realizaciones, los compuestos de las presentes enseñanzas pueden mostrar mayor estabilidad en el torrente sanguíneo.

A continuación se describen adicionalmente ensayos útiles en particular para identificar y opcionalmente cuantificar la actividad de los compuestos de las presentes enseñanzas.

### 40 1. Ensayos convencionales de estabilidad plasmática

En el presente documento se describen compuestos que tienen mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo*. A modo de ejemplo, los compuestos de las presentes enseñanzas que comprenden un enlace peptídico pueden estar alquilados o de otro modo modificados para estabilizar el compuesto frente a la degradación enzimática. Como alternativa o adicionalmente, los compuestos pueden comprender uno o más D-aminoácidos. Es posible evaluar si un compuesto tiene mayor estabilidad en un ensayo de estabilidad convencional.

En un ejemplo de un ensayo de estabilidad plasmática *in vitro*, los compuestos se incuban en plasma o suero y se toman muestras a intervalos regulares para análisis por HPLC o LC/MS/MS, para cuantificar la cantidad de compuesto sin degradar. (Véase, por ejemplo, el documento WO 02/077017, cuya divulgación total se incorpora por referencia en el presente documento). Se estiman condiciones apropiadas (columna, disolvente, gradiente, y temperatura) para dichos análisis para asegurar que el pico del compuesto y los picos del plasma no tengan el mismo tiempo de retención. Esto se realiza con inyecciones posteriores de un compuesto, plasma, y una coinyección con el compuesto y el plasma, seguido de optimización de los parámetros del método de LC hasta que se obtiene una separación satisfactoria. También se toma y se evalúa una muestra de plasma de control sin el compuesto peptídico, tratada de la misma manera. Las muestras pueden incluir, pero no se limitan a, un blanco, el compuesto a una concentración adecuada (por ejemplo, 0,1 mg/ml), plasma sin compuesto, una o más muestras para  $t = 0$ , y una o más muestras a cada intervalo regular. Preferentemente, se toman muestras múltiples en paralelo. Las concentraciones de la muestra (altura del pico en mAU o recuentos de iones) se representan frente al tiempo y se ajusta a una función que describe una desintegración mono exponencial (por ejemplo, usando un paquete de Excel convencional). Preferentemente, un compuesto de acuerdo con las presentes enseñanzas tiene una vida media superior a aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, superior a aproximadamente 1 hora, o superior a aproximadamente 3 horas, o superior a aproximadamente 6 horas, o superior a aproximadamente 12 horas, o superior a aproximadamente 24 horas, o superior a aproximadamente 48 horas) tal como se determinó usando este ensayo.

La estabilidad plasmática se puede examinar *in vivo* usando Ensayos convencionales. Por ejemplo, se pueden administrar compuestos a un mamífero, tal como una rata, por inyecciones en bolo en volúmenes de aproximadamente 1 ml/kg para la dosificación tanto i.v. como p.o.. Preferentemente, los compuestos se someten a ensayo en paralelo con muestras de control tales como tampón o un péptido antiarrítmicos con una estabilidad conocida. Se toman muestras sanguíneas en diferentes periodos de tiempo (por ejemplo, a 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos B.D., en los que B.D. se refiere a antes de la dosis). Las cantidades de compuestos en las muestras se pueden cuantificar usando métodos de rutina en la técnica, tales como LC/MS/MS. Por ejemplo, las concentraciones de compuestos de muestras de plasma se pueden calcular a partir de una curva patrón externa que cubre intervalos de concentración de compuesto de 1,00 a 1000 nM. Los datos de concentraciones de plasma frente al tiempo se pueden usar para formar modelos farmacocinéticos en WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain view, CA) usando análisis no compartimental y los parámetros resultantes de AUC, F<sub>po</sub>, Cl<sub>b</sub>, t<sub>1/2</sub>, C<sub>máx</sub> y t<sub>máx</sub> se pueden determinar tal como se conoce en la técnica.

## 2. Ensayos convencionales de cardiomiocitos

Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden someter a ensayo en un ensayo de cardiomiocitos, que mide la función de unión comunicante de células cardiacas después de la administración de los compuestos. En un ejemplo, se aíslan células cardiacas a partir de un mamífero, tales como corazones de cobaya, por perfusión con colagenasa de acuerdo con el método de Langendorf. Las células se exponen al compuesto y se evalúan para la G<sub>j</sub> mediante pinzamiento zonal usando métodos conocidos en la técnica. La conductancia intercelular (G<sub>j</sub>) se calcula usando la fórmula:

$$G_j = \frac{\Delta I_p}{\Delta U_j} = \frac{I_{p,pulse} - I_{p,rest}}{U_p - U_a} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

en la que I<sub>p,pulse</sub> e I<sub>p,rest</sub> representan la corriente en la célula pasiva durante el pulso y antes del pulso respectivamente, y U<sub>p</sub> y U<sub>a</sub> representan el voltaje de la célula pasiva y activa. El cambio en el valor de G<sub>j</sub> después de la administración del compuesto se analiza por comparación de los cambios relativos en la G<sub>j</sub>. Por ejemplo, se puede determinar la G<sub>j</sub> relativa como una función del tiempo antes, y durante, la estimulación con el compuesto (por ejemplo, a aproximadamente 10<sup>-8</sup> M). Preferentemente, el compuesto proporciona una G<sub>j</sub>, que es básicamente la misma que la de la G<sub>j</sub> (± 10 %) de un péptido antiarrítmico tal como AAP, AAP10, HP5, y análogos funcionales del mismo. En un ejemplo, la célula es una célula isquémica, y el compuesto proporciona una G<sub>j</sub>, que es básicamente la misma que la de una célula no isquémica (± 20 %, preferentemente, ± 10 %). Detalles adicionales relativos a la realización de ensayos de cardiomiocitos se proporcionan en el documento WO 02/077017.

## 3. Ensayo convencional de arritmia inducida por calcio

Se pueden identificar péptidos adecuados para la administración a células cardiacas en un modelo *in vivo* de arritmias inducidas por calcio de acuerdo con el modelo de Lynch et al. (1981) J Cardiovasc. Pharmacol. 3: 49-60. Ratones CD-1 macho se anestesia con Ketamina (75 mg/kg) y medetomidina (1 mg/kg) IP. Una cánula i.v. se inserta en la vena de la cola. Una señal de ECG de dirección II se registra continuamente colocando electrodos de ECG de acero inoxidable en la pata delantera derecha y en la pata delantera izquierda. El electrodo de tierra se coloca en la pata posterior derecha. La señal se amplifica y se filtra usando componentes de fisiógrafo Gould y software para adquisición de datos po-ne-mah. A continuación, un compuesto de ensayo con un periodo equilibrio de 90 segundos se inyecta en la vena de la cola (más de 30 segundos). Ratones tratados previamente con vehículo se someten a ensayo como animales de control. El volumen de inyección es de 100 µl/30 g de ratones en todos los experimentos. La infusión de CaCl<sub>2</sub> (30 mg/ml, 0,1 ml/min/30 g de ratones, 100 mg/kg/min) comienza 3 min después de la administración IV de fármaco o de vehículo (solución salina al 0,9 %). El tiempo que transcurre desde la aparición del bloqueo de la conducción cardiaca se determina como el tiempo desde el inicio de la infusión de CaCl<sub>2</sub> hasta que se produce el primer suceso arrítmico. El primer bloqueo de la conducción se define como el primer RR interno, mayor que o igual a 3 veces un intervalo de RR a partir del periodo de tratamiento previo. El primer suceso arrítmico que se produce es un bloqueo de AV de segundo grado (fallo intermitente de la conducción de AV caracterizado por una onda P sin el complejo de QRS simultáneo) o un bloqueo de SA de segundo grado (intervalo de RR prolongado y con complejo de QRS sin una onda P precedente). Las respuestas se expresan con respecto al tiempo hasta que se produce bloqueo de AV de 2º grado en ratones tratados con vehículo.

## 4. Modelo convencional de separación auricular aislada de disminución de la conducción inducida por estrés metabólico

Péptidos adecuados para la administración a células cardiacas se pueden identificar en un modelo *in vitro* tal como se describe en Haugan et al. (J. Cardiovasc. Electrophysiol., 16, 537-545 (2005)).

Se sacrifican ratas (300-400 g) con un golpe fuerte en la nuca. El corazón se extirpa rápidamente y se transfiere a un pequeño plato que contiene tampón Tyrodes modificado oxigenado de 37° que contiene (en mM): NaCl 136, KCl 4, MgCl<sub>2</sub> 0,8, CaCl<sub>2</sub> 1,8 HEPES 5, MES 5, Glucosa 6, pH 7,3. La aurícula izquierda se disecciona cuidadosamente y se toma una muestra de tejido de aproximadamente 2 x 6 mm del apéndice auricular izquierdo y se coloca en una cámara para tejido (volumen de 5 ml), (Steiert Organ Bath, Hugo Sach Electronic,. Alemania). La cámara se perfunde durante todo el estudio con tampón Tyrodes oxigenado a 37 °C a una velocidad de 10 ml/min.

Un electrodo de estimulación bipolar (acero inoxidable revestido con Teflón, diámetro de 75 µM) se coloca en un extremo del tejido. La estimulación se realiza a 1 Hz usando pulsos rectangulares en umbral doble (duración del estímulo de 0,2 ms) administrado con un estimulador (Hugo Sachs, Tipo 215) a través de una unidad de aislamiento (Unidad Estimuladora Aislada Universal de tipo 263, Hugo Sachs, Alemania).

Dos microelectrodos separados de iridio puro (World Precision Instruments, impedancia de la punta 3,5-4,0 MΩ) se colocan en una línea a lo largo del eje largo de la preparación para registrar la CV auricular. Las distancias desde el electrodo de estimulación al primer y segundo microelectrodo son de 1,5-2,0 mm y 3,0-4,0 mm, respectivamente. Cada microelectrodo está conectado a un preamplificador de etapa de cabeza (amplificación 10x de las señales). Los preamplificadores están conectados a un módulo amplificador biopotencial que está conectado al sistema de adquisición de datos a través de un PLUGSYS de Hugo Sachs. Las señales se filtran a 1 kHz y se muestrean a 10 kHz.

Después de un período de equilibrio de 30 minutos, comienza la estimulación a 1 Hz. Durante los primeros 20 minutos del periodo de registro (periodo de la medida inicial), la cámara se perfunde con tampón Tyrodes oxigenado de a 37 °C, pH 7,3. Los compuestos (por ejemplo, compuestos de mimético de lisina modificado de las presentes enseñanzas, AAP, AAP10 o controles) se añaden a continuación al tampón de perfusión durante otro período de 20 minutos (periodo de tratamiento previo). Después de 20 minutos de tratamiento previo, la perfusión se cambia a un tampón Tyrodes no oxigenado, sin glucosa a 37 °C, pH 7,3 (con o sin compuestos de interés) durante 40 minutos (período de estrés metabólico).

El cambio en la velocidad de conducción durante el estrés metabólico se compara con un grupo de controles sin tratar. En las preparaciones sin tratar, la conducción disminuye en un 15-45 % durante el periodo de 40 minutos de estrés metabólico. En algunas realizaciones, los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden evitar la disminución de la conducción inducida por estrés metabólico durante el periodo de 40 minutos en comparación con los compuestos AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional de los mismos, es decir, los compuestos pueden conservar la conducción normal durante un episodio de estrés metabólico.

## 5. Ensayo hematológico

Los compuestos de las presentes enseñanzas también se pueden someter a ensayo para determinar sus efectos en la aceleración de la recuperación después de estrés inducido por 5-fluorouracilo (5-FU) en la proliferación de la médula ósea. Ratas macho se tratan con 5-FU (75-100 nmol/kg i.p.) durante 4 días. Se toman muestras sanguíneas de la punta de la cola antes del tratamiento con 5-FU (Día 0), y 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 días después de la primera dosis de 5-FU. Se toman medidas de recuentos de sangre periférica (granulocitos, linfocitos, eritrocitos, trombocitos, reticulocitos) y de hemoglobina del plasma. Después de identificación de ventana con pancitopenia grave, el estudio se repite durante el tratamiento simultáneo con un compuesto de las presentes enseñanzas.

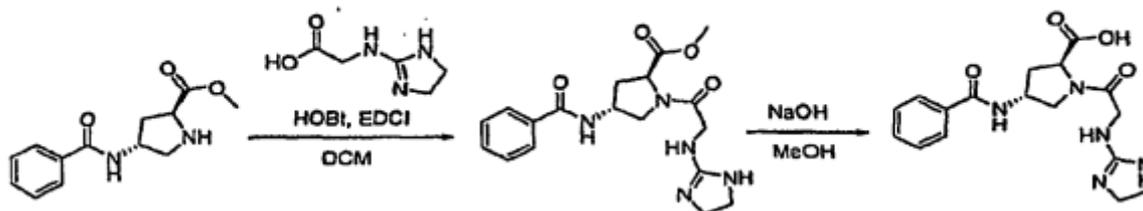
## F. Preparación de compuestos a modo de ejemplo

Los siguientes ejemplos no limitantes se presentan simplemente para ilustrar las presentes enseñanzas. El experto en la materia entenderá que existen numerosos equivalentes y variaciones sin ejemplificar pero que aún forman parte de las presentes enseñanzas.

Los compuestos miméticos de lisina de las presentes enseñanzas se pueden sintetizar por medio de síntesis en fase sólida o en fase de disolución. En este contexto, se hace referencia a, entre muchos otros, Fields et al., "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis", Synthetic Peptides (2002, 2ª Edición).

El Esquema 1 representa una síntesis a modo de ejemplo de compuesto de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico.

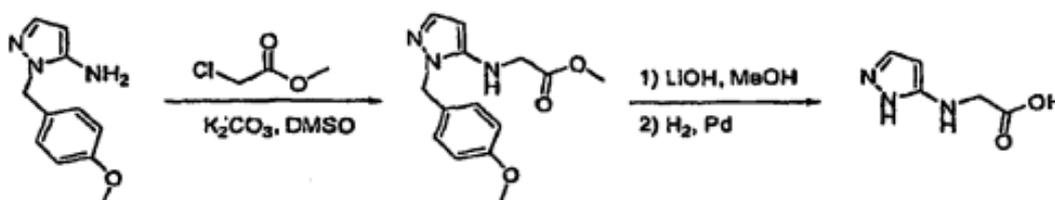
Esquema 1



Diferentes derivados de aminoácidos sustituidos con N se pueden usar para sintetizar otros compuestos. Por ejemplo, 2-cloro-1H-imidazol o 4-bromo-1H-imidazol se pueden tratar con glicina en agua (por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento que se expone en el European Journal of Medicinal Chemistry (1989), 24(6), 623-5) para formar ácido 2-(1H-imidazol-2-ilamino) acético o ácido 2-(1H-imidazol-4-ilamino)acético, respectivamente, que se pueden usar a continuación para sintetizar ácido (2S,4R)-1-(2-(1H-imidazol-2-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico o ácido (2S,4R)-1-(2-(1H-imidazol-4-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico de una forma similar a la del Esquema 1. Compuestos tales como ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(piridin-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(pirimidin-4-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico, y ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(pirimidin-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico se pueden sintetizarse de forma similar a partir de ácido 2-(piridin-2-ilamino)acético, ácido 2-(pirimidin-4-ilamino)acético, y ácido 2-(pirimidin-2-ilamino)acético, respectivamente.

Como alternativa, el derivado de glicina se puede sintetizar de acuerdo con el Esquema 2:

Esquema 2

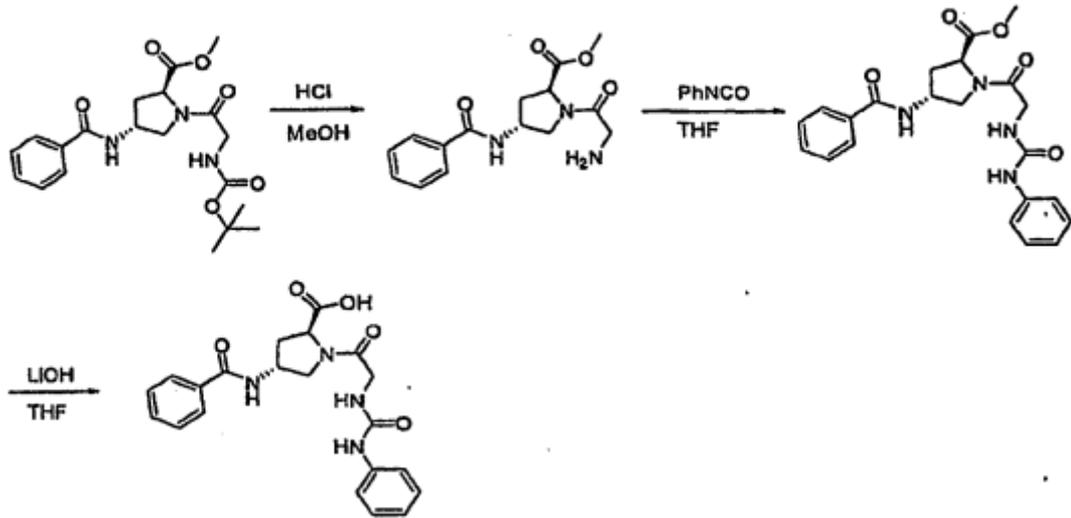


En el ejemplo anterior, el ácido 2-(1H-pirazol-5-ilamino)acético producido de este modo se puede usar para sintetizar ácido (2S,4R)-1-(2-(1H-pirazol-5-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico usando el método que se muestra en el Esquema 1.

Otros compuestos se pueden sintetizar de acuerdo con el Esquema 1 usando los materiales de partida apropiados de ácido carboxílico. Por ejemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-imidazol-2-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-pirazol-6-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico, o ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-imidazol-5-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico se pueden sintetizar de acuerdo con el Esquema 1 usando ácido 1H-imidazol-2-carboxílico, ácido 1H-pirazol-5-carboxílico, o ácido 1H-imidazol-5-carboxílico, respectivamente.

El Esquema 3 representa otra síntesis a modo de ejemplo de un compuesto. En este ejemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-fenilureido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico, R<sup>3</sup> es C(Q)NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>.

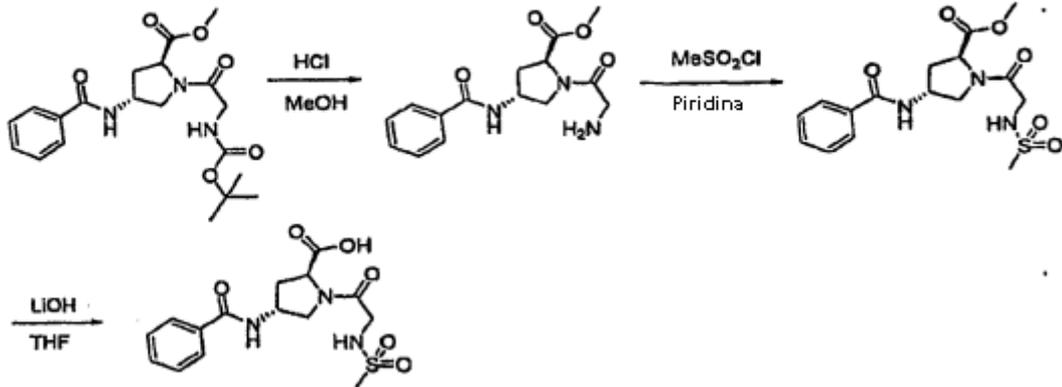
Esquema 3



Se pueden usar diferentes isocianatos (por ejemplo, isocianato de metilo o isocianato de isopropilo) en la síntesis del Esquema 3 para producir otras ureas (por ejemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-metilureido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico o ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-isopropilureido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico).

El Esquema 4 representa una síntesis a modo de ejemplo de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(metilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico.

Esquema 4



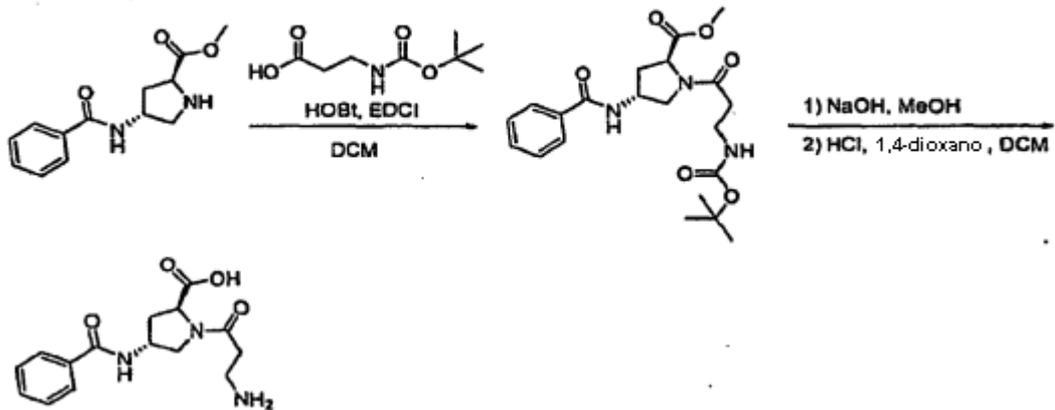
10

A partir de otros de cloruros sulfonilo (por ejemplo, cloruro de etanosulfonilo o cloruro de propano-2-sulfonilo), se pueden preparar sulfonamidas (por ejemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(etilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico o ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(1-metiletilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico) usando el método que se muestra en el Esquema 4.

15

Se pueden sintetizar compuestos adicionales (por ejemplo, ácido (2S,4R)-1-(3-aminopropanoil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico), por ejemplo, de acuerdo con el Esquema 5.

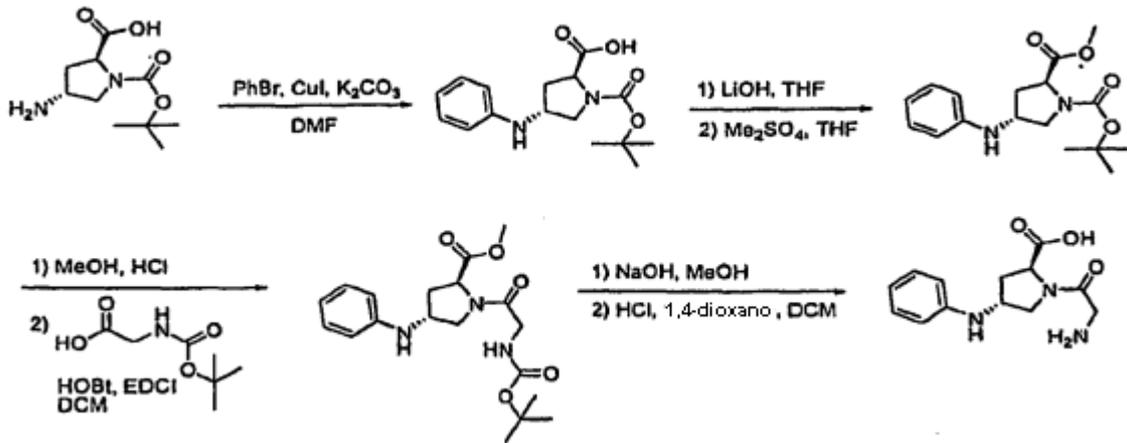
Esquema 5



El Esquema 6 muestra una síntesis a modo de ejemplo del compuesto, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetyl)-4-(fenilamino)pirrolidina-2-carboxílico.

5

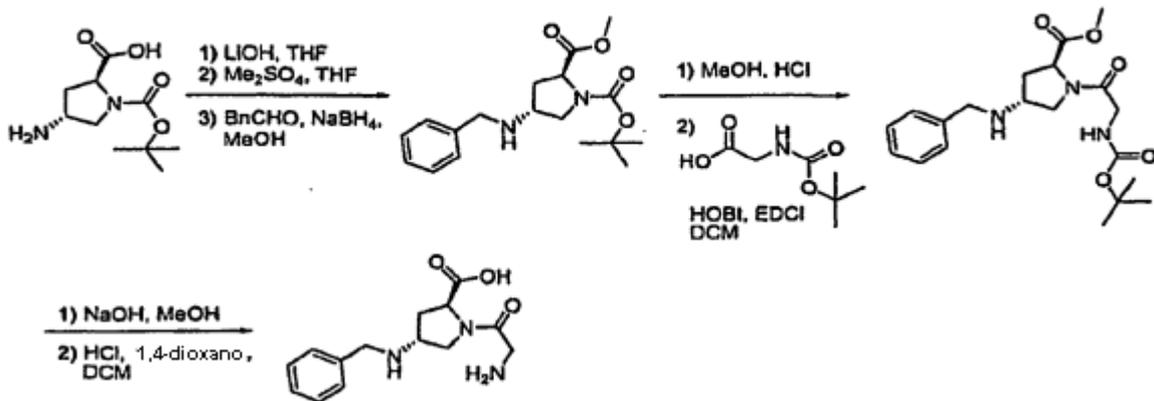
Esquema 6



De forma análoga, el Esquema 7 representa una síntesis a modo de ejemplo del compuesto ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetyl)-4-(benzilamino) pirrolidina-2-carboxílico.

10

Esquema 7

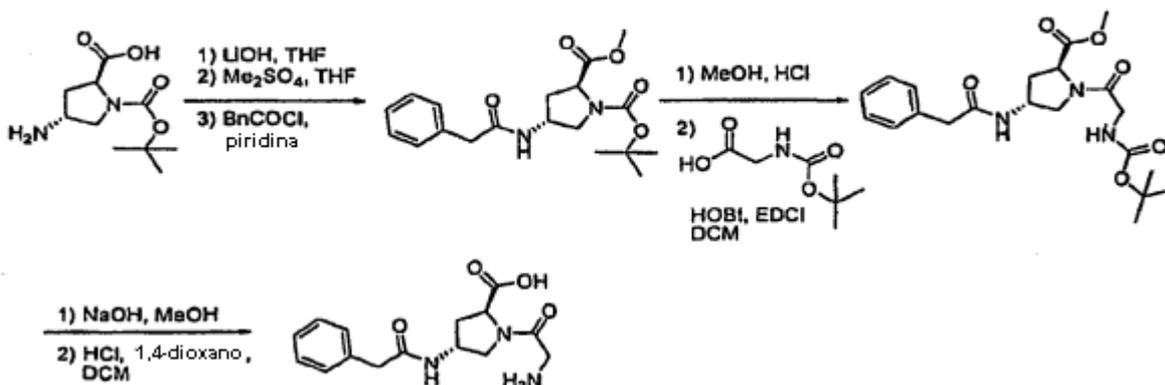


Se pueden preparar compuestos adicionales usando los materiales de partida apropiados de acuerdo con los métodos de los Esquemas 6 o 7.

15

El Esquema 8 muestra una síntesis a modo de ejemplo del compuesto ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetyl)-4-(2-fenilacetamido)pirrolidina-2-carboxílico.

Esquema 8

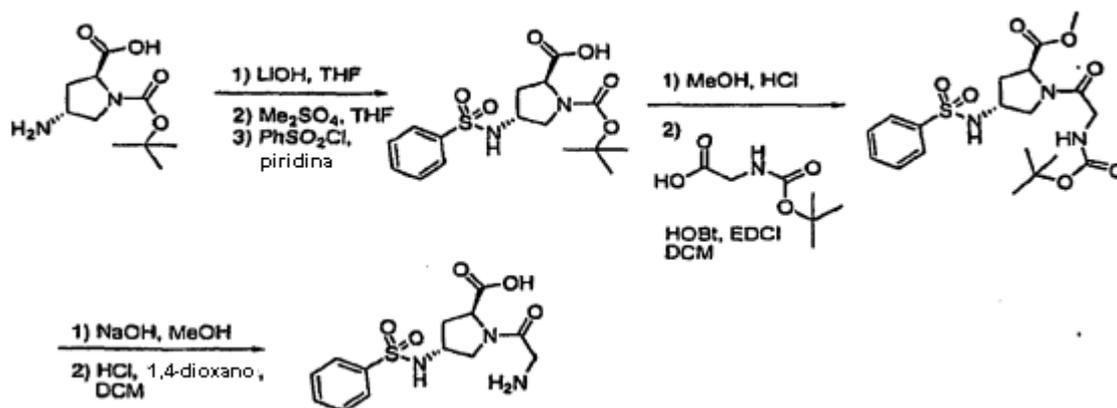


Se pueden preparar compuestos adicionales usando los materiales de partida apropiados de acuerdo con el método del Esquema 8.

5

Se pueden sintetizar compuestos adicionales, por ejemplo, de acuerdo con el Esquema 9, que representa la síntesis del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(fenilsulfonamido)pirrolidina-2-carboxílico.

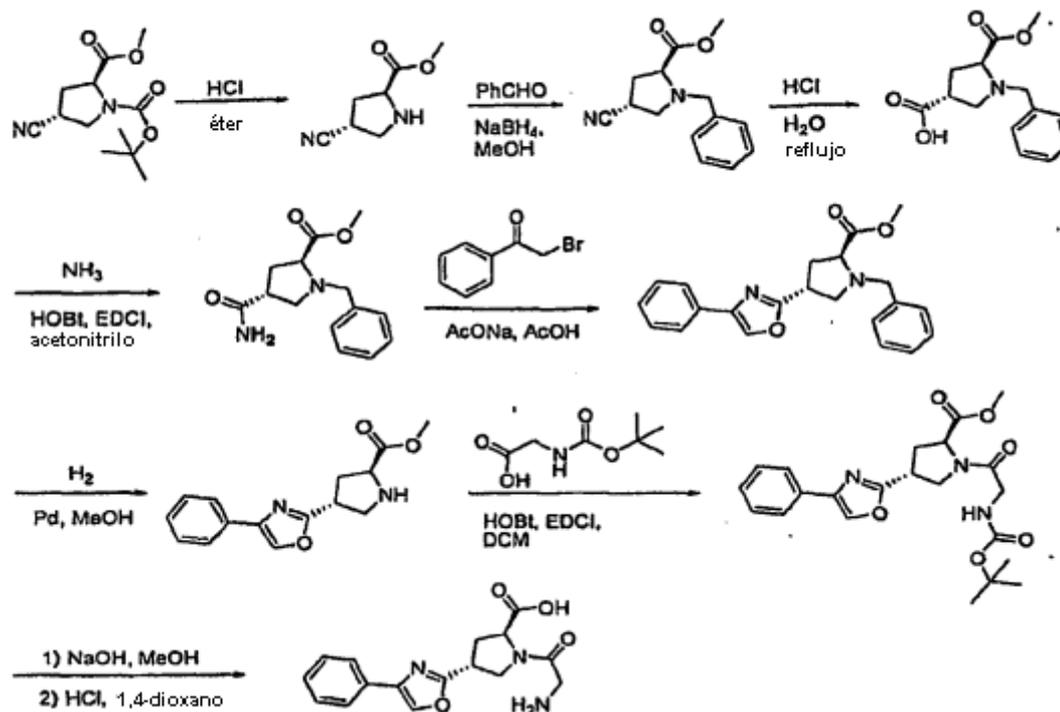
Esquema 9



10

El Esquema 10 muestra una síntesis a modo de ejemplo del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(4-feniloxazol-2-il)pirrolidina-2-carboxílico (véase, por ejemplo, Tetrahedron: Asymmetry, 14 (20), 3141-3152; 2003).

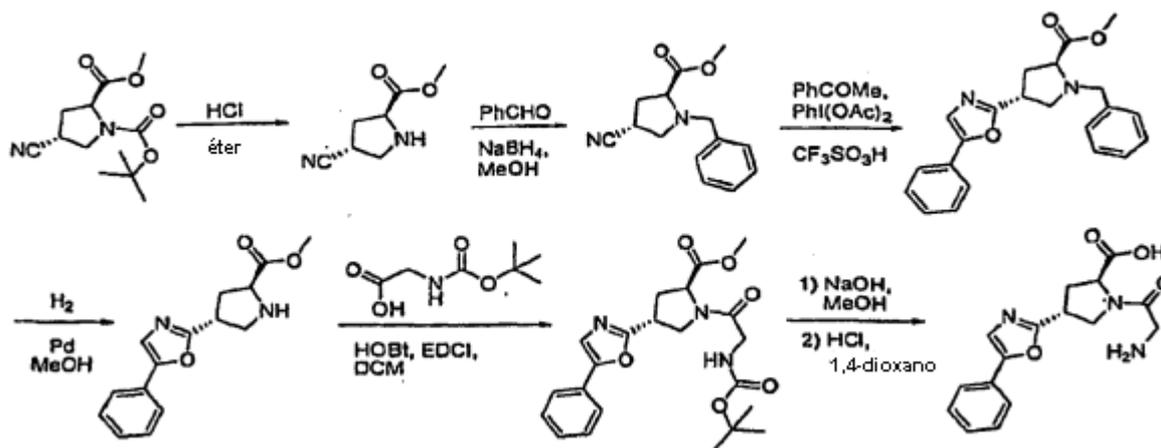
Esquema 10



El Esquema 11 representa la síntesis de otro compuesto, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(5-feniloxazol-2-il)pirrolidina-2-carboxílico (véase, por ejemplo, Journal of Heterocyclic Chemistry (1998), 35 (6), 1533-1534).

5

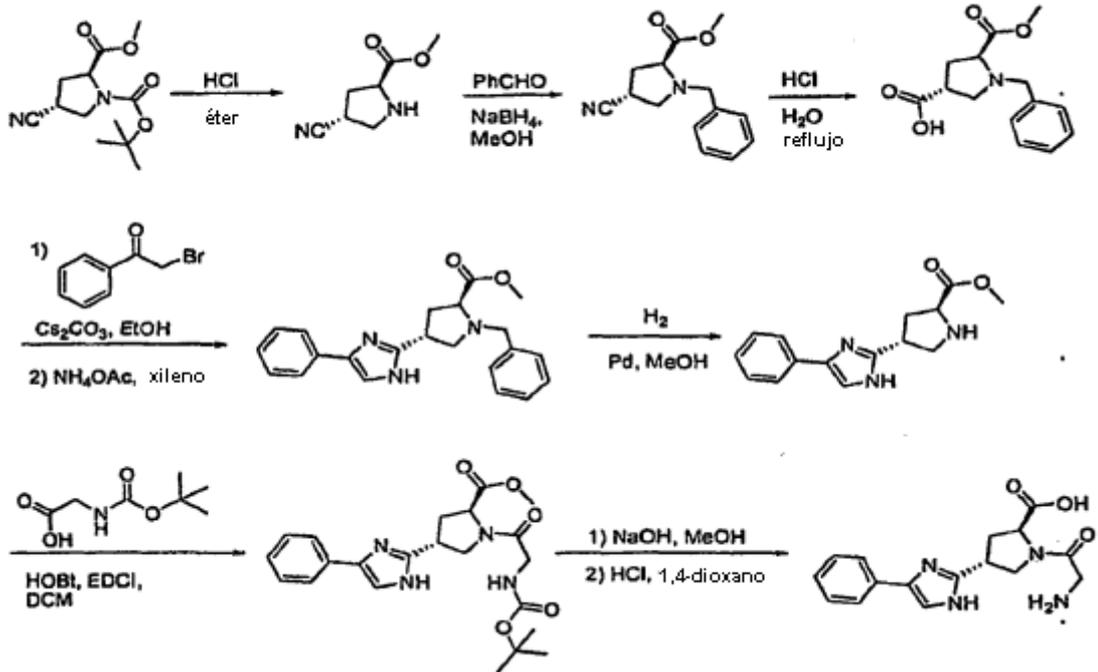
Esquema 11



Además, la síntesis de otro compuesto, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(4-fenil-1H-imidazol-2-il)pirrolidina-2-carboxílico, se muestra en el Esquema 12 (véase, por ejemplo, Tetrahedron: Asymmetry, 14 (20), 3141-3152; 2003; Journal of Medicinal Chemistry, 44 (18), 2990-3000; 2001).

10

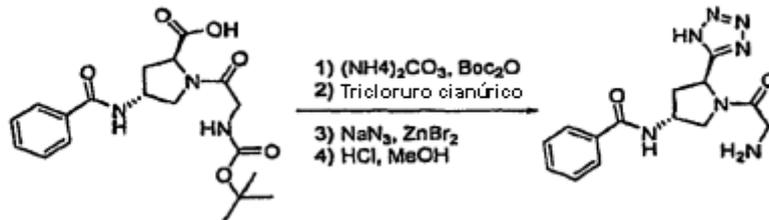
Esquema 12



El Esquema 13 representa una síntesis a modo de ejemplo de un compuesto N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(1H-tetrazol-5-il)pirrolidin-3-il)benzamida.

5

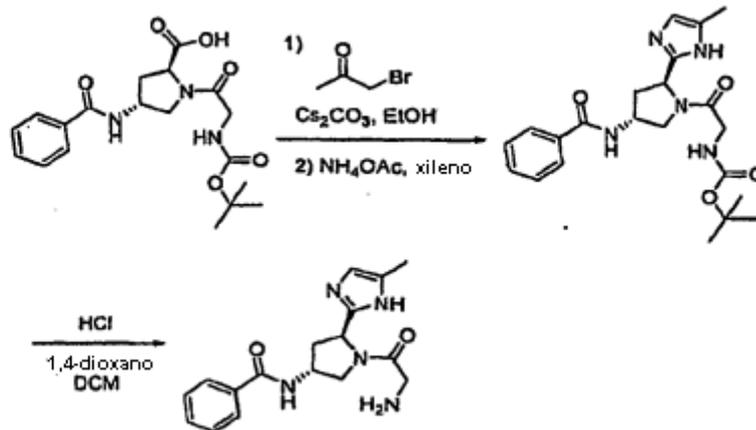
Esquema 13



El Esquema 14 muestra otro método mediante el que se pueden sintetizar determinados compuestos (véase, por ejemplo, Journal of Medicinal Chemistry, 44 (18), 2990-3000; 2001).

10

Esquema 14

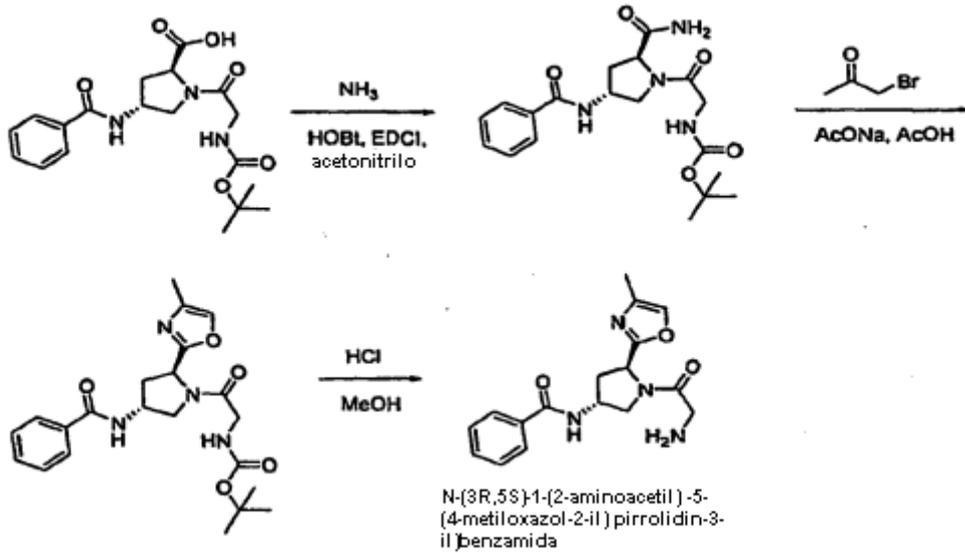


Además de la N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(5-metil-1H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida que se muestra en el Esquema 14, se pueden sintetizar compuestos que tienen diferentes de bioisómeros ácido carboxílico de acuerdo

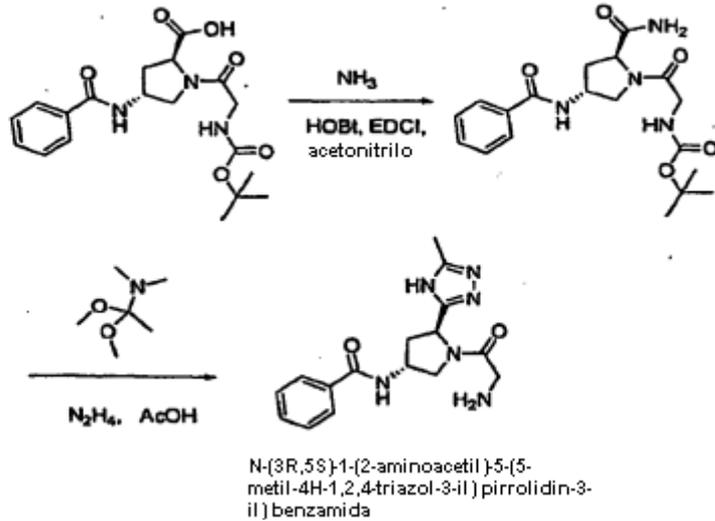
con este método mediante el uso de diferentes reactivos de bromocarbonilo (por ejemplo, N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(1H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida o N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(5-isopropil-1H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida).

5 Los Esquemas 15-17 representan otros métodos a modo de ejemplo para sintetizar determinados compuestos.

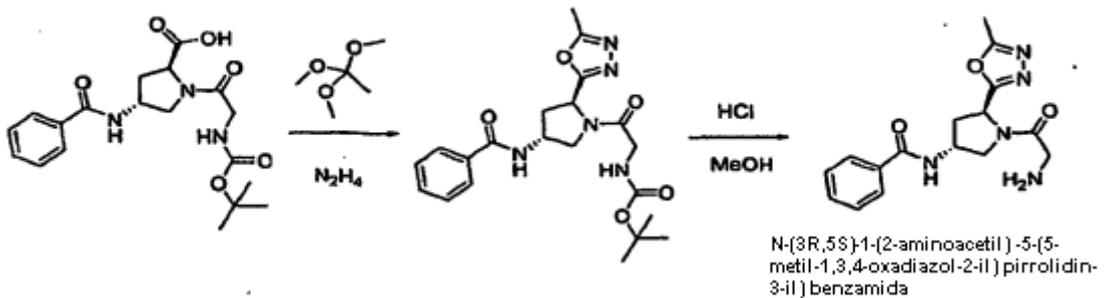
Esquema 15



Esquema 16



Esquema 17



Además de los compuestos que se muestran en los Esquemas 15-17, los compuestos que tienen diferentes de bioisómeros ácido carboxílico se pueden sintetizar de acuerdo con estos métodos variando los reactivos. Por ejemplo, se pueden usar diferentes reactivos de bromuro en el Esquema 15 (por ejemplo, para producir N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(oxazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida); se pueden usar diferentes dimetilaminocetales en el Esquema 16 (por ejemplo, para producir N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(4H-1,2,4-triazol-3-il)pirrolidin-3-il)benzamida o N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(5-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)pirrolidin-3-il)benzamida); y se pueden usar diferentes orto ésteres en el Esquema 17 (por ejemplo, para producir N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(1,3,4-oxadiazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida).

## 10 1. Síntesis general de péptidos

Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden preparar usando el método de síntesis que se desvela, por ejemplo, en el documento WO 98/11125 (cuya divulgación total se incorpora por referencia en el presente documento). Dichos métodos de síntesis darán como resultado un péptido primario o producto similar a un péptido que tiene un contrario de trifluoroacetato y que de ser adecuado para la preparación de un medicamento. En algunos casos, sin embargo, puede ser ventajoso realizar un intercambio de contraión a partir de trifluoroacetato por un anión farmacéuticamente aceptable o preferente (por ejemplo, acetato), por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, el péptido primario o producto similar a un péptido se puede liofilizar y disolver repetidamente en ácido clorhídrico diluido para obtener el clorhidrato purificado.

### 20 *Aparatos y estrategia de síntesis*

Quando se usa metodología en fase sólida, los péptidos modificados se sintetizaron en etapas en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno por filtración usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y terc-butiloxi-carbonilo (Boc) o grupos de protección adecuados de otro modo para N-amino y las funcionalidades de cadena lateral tales como Alilo, Alloc, Dde, Z, etc.. Cuando se usan técnicas en fase de disolución, los péptidos modificados se sintetizaron usando equipamiento condicional a lo largo de toda la síntesis.

### 30 *Disolventes*

El disolvente DMF (N,N-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemania) se purificó haciendo pasar a través de una columna rellena con una resina de intercambio catiónico fuerte (ácido fuerte MB/H Lewatit S 100, Bayer AG Leverkusen, Alemania) y se analizó para aminas libres antes de su uso mediante la adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) dando lugar a un color amarillo (anión de Dhbt-O-) si están presentes aminas. El disolvente DCM (diclorometano, calidad analítica, Riedel de-Häen, Alemania) se usó directamente sin purificación. Se usó acetonitrilo (calidad para HPLC, Lab-Scan, Dublín, Irlanda) directamente sin purificación.

### 40 *Aminoácidos*

Aminoácidos protegidos con Fmoc y Boc se adquirieron en Advanced ChemTech (ACT), Bachem y NeoMPS en formas de cadenas laterales protegidas adecuadas.

### 45 *Derivados de ácido benzoico*

Los derivados de ácido benzoico se adquirieron en Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

### 50 *Reactivos de acoplamiento*

El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquirió en (Riedel de-Häen, Alemania).

### 55 *Soportes sólidos*

Los péptidos se sintetizaron en TentaGel (por ejemplo, SRam) y Poliestireno (por ejemplo, resina de PAM) de Advanced ChemTech y Rapp.

### 60 *Catalizadores y otros reactivos*

Diisopropiletilamina (DIEA) se adquirió en Aldrich, Alemania, y etilendiamina de Fluka, hidrazina, piperidina y piridina de Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP) se adquirió en Fluka, Suiza y se usó como un catalizador en reacciones de acoplamiento que implican anhídridos simétricos. Etanoditiol y Tioanisol se adquirieron en Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (HOAt) se obtuvieron en Fluka, Suiza.

*Procedimientos de acoplamiento*

El primer aminoácido se puede acoplar como un anhídrido simétrico en DMF generado a partir del aminoácido protegido con N-□- y los aminoácidos posteriores se pueden acoplar en forma de ésteres de HOBt o HOAt generados in situ preparados a partir de aminoácidos protegidos con N-□- apropiados y HOBt o HOAt por medio de DIC en DMF. Las acilaciones se comprobaron con el ensayo de ninhidrina realizado a 80 °C para evitar la desprotección de Fmoc durante el ensayo (B. D. Larsen, A. Holm, Int. J. Pept. Protein Res., 43, 1-9 (1994)).

*Desprotección del grupo de protección (Fmoc y Fm)*

La desprotección del grupo Fmoc y del grupo Fm se realizó por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min.), seguido de lavado con DMF (5 x 15 ml, 5 min. cada uno) hasta que no se pudo detectar color amarillo alguno después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada.

*Desprotección del grupo de protección (Boc y tBu)*

La desprotección del grupo Boc y del grupo tBu se realizó por tratamiento con TFA al 50 % en DCM v/v (2 x 2 min, 1 x 30 min) seguido de lavado con DCM (6 x 2 min) y a continuación con tratamiento con DMF (2 x 2 min) con DIEA al 5 % en DMF v/v (3 x 2 min) y finalmente seguido de lavado con DMF (6 x 2 min).

*Desprotección del aloc y alilo*

Una solución de 3 equiv. de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> disueltos en 15-20 ml de CHCl<sub>3</sub>, AcOH, NMM (37:2:1) se añadió a la resina peptídica. El tratamiento continuó durante tres horas a temperatura ambiente acompañado de burbujeo de una corriente de N<sub>2</sub> a través de la mezcla.

*Acoplamiento de ésteres de Hobt*

Se disolvieron 3 eq de aminoácido protegido con N-α-amino en DMF junto con 3 equiv. de HOBt y 3 equiv. de DIC y a continuación se añadieron a la resina.

*Anhídrido simétrico formado previamente*

Se disolvieron seis equiv. de aminoácido protegido con N-α-amino en DCM y se enfrió a 0 °C. Se añadió DIC (3 equiv.) y la reacción continúa durante 10 minutos. El disolvente se retiró al vacío y el resto se disolvió en DMF. La solución se añadió inmediatamente a la resina seguido de 0,1 equiv. de DMAP.

*Escisión del compuesto a partir de la resina usando TFMSA*

La resina de peptidilo se trató con ácido trifluoroacético al 90 % (TFA, Riedel-de Hæen, Frankfurt, Alemania), ácido trifluorometanosulfónico al 4 % (TFMSA, Aldrich), etanoditiol al 2 %, tioanisol al 4 % v/v a t.a. durante 30-60 minutos. La resina filtrada se lavó con TFA y los filtrados y aguas de lavado se evaporaron a presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó a partir de ácido trifluoroacético-agua. El producto liofilizado en bruto se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se identificó por espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESMS).

*Escisión del compuesto a partir de resina usando TFA*

La resina de peptidilo se trató con ácido trifluoroacético al 95 % (TFA, Riedel-de Hæen, Frankfurt, Alemania), agua v/v o con TFA al 95 % y etanoditiol al 5 % v/v a t.a. durante 2 horas. La resina filtrada se lavó con TFA al 95 %-agua y los filtrados y aguas de lavado se evaporaron a presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó a partir de ácido acético-agua. El producto liofilizado en bruto se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se identificó por espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESMS).

*Condiciones de HPLC preparativa*

La cromatografía preparativa se realizó usando una estación de trabajo VISION (PerSeptive Biosystem) equipada con colector/automuestreador automático de fracciones AFC2000. Se usó el software VISION-3 para control del instrumento y adquisición de datos.

*Columna*

Kromasil (EKA Chemicals) KR100-10-C8 100 Å, C-8, 10 µm; CER 2230, 250 x 50,8 mm o una VYDAC 218TP101550, 300A, C-18, 10-15 µm, 250 x 50 mm. El sistema de tampón usado incluía A: TFA al 0,1 % en MQV; TFA al B: 0,085 %, MQV al 10 %, MeCN al 90 %. Los caudales fueron 35-40 ml/min y la temperatura de la columna fue de 25 °C. La detección de UV se realizó a 215 nm y 280 nm. Los gradientes adecuados se optimizaron para

péptidos individuales.

#### *Condiciones de HPLC analítica*

5 El análisis del gradiente por HPLC se realizó usando un sistema para HPLC HP 1100 de Hewlett Packard que consiste en una Bomba Cuaternaria HP 1100, un Automuestreador HP 1100, un Termostato de Columna HP 1100 y un Detector de Longitud de Onda Múltiple HP 1100. Se usó Hewlett Packard Chemstation para el software LC (rev. A.06.01) para el control del instrumento y adquisición de datos. Para HPLC analítica, se usaron diferentes columnas como apropiadas, tales como VYDAC 238TP5415, C-18, 5  $\mu$ m, 300A, o una Jupiter, Phenomenex 00F-4053-E0; C-18 de 5  $\mu$ m, 300 A 150 x 4,6 mm y otras. El sistema de tampón incluía A: TFA al 0,1 % en MQV; B: TFA al 0,085 %, MQV al 10 %, MeCN al 90 %. Los caudales fueron de 1 ml/min. La temperatura de la columna preferente fue de 40 °C. La detección de UV se realizó a 215 nm. Como anteriormente, los gradientes adecuados se optimizaron para los péptidos individuales.

#### 15 *Espectroscopia de masas*

Los péptidos se disolvieron en metanol de súper gradiente (Labscan, Dublín, Irlanda), agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) y ácido fórmico (Merck, Damstadt, Alemania) (50:50:0,1 en v/v/v) para dar concentraciones entre 1 y 10 mg/ml. Las soluciones de péptidos (20 ml) se analizaron en modo de polaridad positiva con ESI-TOF-MS usando una precisión del espectrómetro de masas LCT (Micromass, Manchester, Reino Unido) de +/- 0,1 m/z.

#### *Síntesis en fase sólida*

25 En todas las síntesis, se puso resina seca en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración. La resina se hinchó en DMF. El primer aminoácido se acopló en forma de un anhídrido simétrico formado previamente o en forma de un éster de HOBt activado previamente tal como se ha descrito anteriormente. El siguiente aminoácido de acuerdo con la secuencia se acopló en forma de un éster de HOBT formado previamente tal como se ha descrito anteriormente. Todos los acoplamientos continuaron durante al menos 2 horas a menos que se indique de otro modo. El acoplamiento del derivado de ácido benzoico a la funcionalidad amino de la cadena lateral en el aminoácido mimético de lisina se realizó en todos los casos usando un éster de HOBT formado previamente. El producto peptídico final se escindió del soporte sólido y se analizó por HPLC y MS tal como se ha descrito anteriormente.

35 En todos los casos, el derivado de ácido benzoico se vuelve a funcionalizar como un ácido carboxílico y se acopla en forma de un éster de HOBT generado *in situ* por medio de DIC en THF.

40 Todos los acoplamientos continuaron durante al menos 2 horas. Las acilaciones se comprobaron con el ensayo de ninhidrina realizado a 80 °C tal como se descrito anteriormente. Después de la síntesis completa, la resina de péptido se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada una), éter dietílico (3x 15 ml, 1 min cada una) y se secó al vacío. El péptido se escindió a continuación a partir de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó. Después de la purificación usando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, el producto peptídico se recogió y la identidad del péptido se confirmó por ES-MS.

#### *Síntesis en fase de disolución a modo de ejemplo*

45 Un aminoácido o un ácido hidroxilo- o tiohidroxilo acético protegido adecuadamente con un ácido carboxílico no protegido (1 equiv.) se disuelve en DMF junto con DIC (1 equiv.) y HOBT (1 equiv.). Después de 1 hora de activación previa, un componente básico de mimético de lisina protegido adecuado (LM) se añade con un grupo amino no protegido (1,1 equiv.) junto con TEA (1,3 equiv.) y la mezcla se agita durante una noche a temperatura ambiente.

50 La mezcla de reacción se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se extrae con (1) una solución acuosa de ácido clorhídrico (0,1 M) y (2) una solución acuosa de hidróxido sódico (0,1 M) y (3) agua para retirar el exceso de material de partida. La fase orgánica se trata con MgSO<sub>4</sub> (desechado), se filtra y se evapora a sequedad.

55 El grupo amino protegido restante del LM se desprotege usando TFA/DCM si el grupo de protección se basa en tBu, Pd ciclohexeno si se basa en bencilo, piperidina/DCM si se basa en fluorenilo, hidrazina si se basa en Dde. Después de finalizar la reacción de desprotección (1-2 horas), la mezcla de reacción se evapora a sequedad. El residuo se lava con éter dietílico y se disuelve en DMF junto con 1,3 eq de TEA y finalmente se añade a una solución de un ácido benzoico sustituido (1 equiv.) que se ha activado previamente por tratamiento con DIC (1 equiv.) y HOBT (1 equiv.) en DMF. La reacción de acoplamiento continúa durante una noche.

65 La mezcla de reacción se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se extrae con (1) una solución acuosa de ácido clorhídrico (0,1 M) y (2) una solución acuosa de hidróxido sódico (0,1 M) y (3) agua para retirar el exceso de material de partida. La fase orgánica se trata con MgSO<sub>4</sub> (desechado), se filtra y se evapora a sequedad.

Los grupos de protección restantes se desprotegen usando TFA/DCM si los grupos de protección se basan en tBu, Pd Ciclohexeno si se basan en Bencilo, Piperidina/DCM si se basan en Fluorenilo, Hidrazina si se basan en Dde. Después de finalizar la reacción de desprotección (1-2 horas), la mezcla de reacción se evapora a sequedad. El residuo se lava con éter dietílico y se disuelve en TFA/Agua y se purifica usando HPLC preparativa. Después de la purificación usando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, el producto peptídico se recogió y la identidad del péptido se confirmó por ES-MS.

## 2. Síntesis en fase sólida del compuesto 2: Ácido (2S,4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-benzollamino-pirrolidina-2-carboxílico

La resina de PAM (Advanced Chemtech) se hinchó en DMF, se lavó con Trietil amina al 5 % (TEA) en DMF y se lavó con DMF hasta que no se pudo detectar ningún color amarillo después de la adición de no Dhbt-OH a la DMF drenada. (2S,4R) Boc-4Amp (Fmoc)-OH se acopló en forma de anhídrido simétrico tal como sigue a continuación.

Se disolvieron 3 eq de (2S,4R) Boc-4Amp(Fmoc)-OH en DCM y se enfrió a 0 °C. Se añadió DIC (1,5 equiv.) y la reacción continuó durante 10 minutos. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se disolvió en DMF. La solución se añadió inmediatamente a la resina seguido de 0,1 equiv. de DMAP. El acoplamiento continuó durante una noche. El reactivo de acoplamiento en exceso se retiró mediante lavado con DMF. La desprotección del grupo Fmoc se realizó por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min.), seguido de lavado con DMF hasta que no se pudo detectar ningún color amarillo después de la adición de no Dhbt-OH a la DMF drenada.

El acoplamiento del ácido benzoico se realizó tal como sigue a continuación. 3 equiv. ácido benzoico se disolvieron en DMF junto con 3 equiv. de HOBt y 3 equiv. de DIC y a continuación se añadieron a la resina. El acoplamiento continuó durante una noche. El reactivo de acoplamiento en exceso se retiró mediante lavado con DMF. Antes de la desprotección del grupo Boc, la resina se trató con DCM. La desprotección del grupo Boc se realizó por tratamiento con TFA al 50 % en DCM en v/v (2 x 2 min, 1 x 30 min) seguido de lavado con DCM y a continuación con DMF y el tratamiento con DIEA al 5 % en DMF en v/v y finalmente seguido de lavado con DMF.

El acoplamiento de Boc-Gly-OH se realizó tal como sigue a continuación. 3 equiv. de Boc-Gly-OH se disolvieron en DMF junto con 3 equiv. de HOBt y 3 equiv. de DIC y a continuación se añadieron a la resina. El acoplamiento continuó 2 horas. El reactivo de acoplamiento en exceso se retiró mediante lavado con DMF. El acoplamiento se repitió y continuó durante una noche. Antes de la escisión del péptido a partir del soporte sólido de la resina peptídica se lavó con DCM y a continuación con éter y finalmente se secó al vacío.

La escisión del dipéptido a partir de la Resina de PAM se realizó tal como sigue a continuación. La resina peptídica se trató con ácido trifluoroacético (TFA, Riedel-de Hæen) y después de 10 min, un volumen correspondiente a un 10 % del volumen total de TFA de ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA, Aldrich) se añadió a temperatura ambiente y la reacción continuó durante 2 horas. Las resinas filtradas se lavaron con TFA. El material de partida se precipitó en la solución de TFA mediante la adición de éter dietílico.

El material de partida se recogió en forma de un aceite de color marrón. La solución de éter se extrajo adicionalmente con agua y la fase acuosa se evaporó. La cantidad total de material de partida se purificó usando HPLC prep. (columna - Vydac C18): Tampón A: TFA al 0,1 % en Agua; Tampón B: AcCN al 90 %; TFA al 0,1 %; Agua al 9,9 %. Flujo: 35 ml/min. Gradiente: 0 - 47 min de A al 100 % a A al 75 % (Lineal). Pureza por HPLC: 99 %. MS: M+H calculado = 291,12; M+H encontrado = 291,7.

## 3. Síntesis en fase de solución del compuesto 2

A una solución de NaHCO<sub>3</sub> (58,64 g, 0,698 moles) en agua (625 ml) se añadió clorhidrato del éster metílico de *N*-BOC-*trans*-4-amino-L-prolina (50 g, 0,1745 moles, CNH Technologies, 98 %) en porciones, seguido de EtOAc (500 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C. Una solución de cloruro de benzoílo (20,26 ml, 0,1745 moles) en EtOAc (100 ml) se añadió durante 25 min a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con 2 x 200 ml de EtOAc. La fracción orgánica combinada se lavó con 200 ml de HCl 1 N, 100 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 100 ml de salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró para proporcionar 60,67 g de (2S,4R)-4-benzamidopirrolidina-1,2-dicarboxilato de 1-*terc*-butilo y 2-metilo en forma de un aceite pesado (rendimiento de un 99,8 %; rendimiento de un 94 % ajustado al EtOAc residual). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm; para dos conformeros): 7,78-7,7 (m, 2 H), 7,56-7,4 (m, 3 H), 6,25-6,1 (m, 1 H), 4,8-4,67 (m, 1 H), 4,51-4,41 (m, 0,4 H), 4,34 (dd, *J* = 7,7 Hz, 0,6 H), 3,97-3,84 (m, 1 H), 3,76 (s, 3H), 3,52 (dd, *J* = 11, 4 Hz, 0,6 H), 3,39 (dd, *J* = 11, 4 Hz, 0,4 H), 2,47-2,21 (m 2 H), 1,46 (s, 3,6 H), 1,43 (s, 5,4 H). MS (*m/z*, ESI positivo, para M+Na): 371.

(2S,4R)-4-benzamidopirrolidina-1,2-dicarboxilato de 1-*terc*-butilo y 2-metilo (60,19 g, contiene EtOAc al 5,6 %; 0,1631 moles) se disolvió en Et<sub>2</sub>O (100 ml), y el disolvente se evaporó al vacío para retirar el EtOAc residual. El aceite residual se disolvió en Et<sub>2</sub>O (100 ml). Se añadió solución de HCl 2 N en Et<sub>2</sub>O (700 ml) (exotermia suave; la precipitación comenzó después de aproximadamente 5 min). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 21 h. En ese momento, se añadieron 200 ml de solución de HCl 2 N en Et<sub>2</sub>O, y la mezcla se agitó durante un periodo adicional de 24 h. El precipitado se filtró, se lavó con 500 ml de éter dietílico, se secó al vacío a temperatura

ambiente durante 24 h para proporcionar 46,03 g de clorhidrato de (2S,4R) 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de metilo (rendimiento de un 99 %). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, δ, ppm): 7,91-7,84 (m, 2 H), 7,6-7,44 (m, 3H), 4,78 (t, J = 8,5 Hz, 1 H), 4,69-4,59 (m, 1 H), 3,77 (dd, J = 12, 6,6 Hz, 1 H), 3,52 (dd, J = 12,5 Hz, 1 H), 2,67-2,5 (m, 2 H). MS (m/z, ESI positivo, para M+H): 249.

5

A una solución de BOC-Gly-OH (28,13 g, 0,1606 moles) y 1-hidroxibenzotriazol (0,1686 moles, 25,64 g; contiene H<sub>2</sub>O al 11,12 % en peso) en THF (1,3 l) se añadió clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (0,1686 moles, 32,328 g) (Matraz A). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, a continuación la agitación se detuvo y se permitió que el residuo oleoso se asentara. En un matraz separado (Matraz B), se añadió NaOH (0,1606 moles; 32 ml de solución 5 N) a una suspensión de clorhidrato de (2S,4R) 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de metilo (0,1606 moles, 45,73 g) en THF (0,52 l) durante 15 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, momento durante el cual la mayor parte de los sólidos se disolvieron. La solución del éster de HOBT preparado en el Matraz A se añadió al Matraz B a temperatura ambiente durante 15 min, dejando atrás el residuo oleoso. El residuo en el Matraz A se lavó con 250 ml de THF, y la solución de THF se decantó del aceite oleoso y se añadió a la mezcla en el Matraz B. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Se añadió agua (500 ml), y la mezcla se concentró al vacío para retirar THF (volumen residual de ~ 550 ml). Se añadió EtOAc (500 ml), seguido de salmuera (300 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con 2 x 300 ml de EtOAc. La fracción orgánica combinada se lavó con 2 x 250 ml de HCl 1 N, 2 x 250 ml de solución sat. de NaHCO<sub>3</sub>, y 150 ml de salmuera, después se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró para proporcionar 48,31 g de (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo en forma de un sólido espumoso (rendimiento de un 74 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm; para dos conformeros): 7,81-7,72 (m, 2 H), 7,57-7,39 (m, 3 H), 6,41 (d, J = 6 Hz, 0,8 H), 6.,25 (d, J = 6 Hz, 0,2 H), 5,32 (s a, 1 H), 4,88-4,74 (m, 1 H), 4,65 (t, J = 7 Hz, 1 H), 4,11-3,86 (m, 2 H), 3,83-3,78 (m, 1 H), 3,76 (s, 3 H), 3,69-3,56 (M, 1 H), 2,65-2,3 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H). MS (m/z, ESI positivo, para M+Na): 428.

25

A una solución de (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonil-amino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (23,33 g, 0,0575 moles) en metanol (450 ml) se añadió NaOH (0,2875 moles, 144 ml de solución acuosa 2 N) de -1 a 1 °C durante 15 min. La mezcla se agitó de -5 a -1 °C durante 2,5 h. Se añadió HCl (0,2875 moles, 144 ml de solución acuosa 2 N) de -3 a 1 °C durante 25 min. MeOH se retiró por destilación al vacío, a continuación se añadieron 500 ml de EtOAc. La fase acuosa se saturó con NaCl y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con 2 x 250 ml de EtOAc de solución combinada de EtOAc se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró para proporcionar 22,54 g de ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico en forma de un sólido espumoso de color blanco (contiene EtOAc al 6,6 % en peso; rendimiento de un 94 % ajustado al EtOAc residual). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, δ, ppm): 7,87-7,79 (m, 2 H), 7,58-7,42 (m, 3 H), 4,81-4,7 (m 1 H), 4,69-4,56 (m, 1 H), 4,05-3,72 (m, 3 H), 3,67-3,49 (m, 1 H), 2,64-2,28 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H). MS (m/z, ESI positivo) para M+H: 392; para M+Na: 414.

Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico (21,97 g; contiene EtOAc al 6,6 % en peso; 0,0524 moles, ajustado al EtOAc residual) se disolvió en dioxano (100 ml). El disolvente se evaporó al vacío para retirar residual EtOAc. El residuo se disolvió en dioxano anhidro (200 ml) y se añadió HCl (100 ml de solución ~3,6 N recién preparada en dioxano) a 10-12 °C. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente (la precipitación comenzó después de aproximadamente 2 min). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 h, momento en el cual se añadieron 30 ml de solución de HCl ~3,6 N, y la mezcla se agitó durante periodo adicional de 5,5 h. Los sólidos precipitados se filtraron usando presión de N<sub>2</sub>, se lavó con 4 x 25 ml de dioxano, y se secó al vacío a temperatura ambiente durante 24 h para proporcionar 18,7 g del producto en bruto en forma de un sólido de color blanco. El producto en bruto se disolvió en *i*-PrOH (104 ml) y se añadieron 210 ml de éter dietílico durante 1 h (se forma precipitado inmediatamente después de la adición de éter). La mezcla se agitó durante 1 h, se filtró usando presión de N<sub>2</sub>, se lavó con 2 x 50 ml de solución de Et<sub>2</sub>O-*i*-PrOH a 3:1, y se secó al vacío a temperatura ambiente durante 24 h y a 40 °C durante 48 h para proporcionar 15,7 g de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ, ppm, para dos conformeros): 8,77 (d, J = 7 Hz, 0,8 H), 8,71 (d, J = 7 Hz, 0,2 H), 8,68-7,95 (a, 2 H), 7,92-7,83 (m, 2 H), 7,59-7,43 (m, 3 H), 4,87-4,79 (m, 0,2 H), 4,68-4,54 (m, 0,8 H), 4,54-4,44 (m, 1 H), 4,0 - 3,47 (m, 4 H), 2,47-2,12 (m, 2 H). HRMS calc. para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H): 292,1297, encontrado: 292,1294.

#### 55 4. Síntesis de los compuestos 64-68 y 70-78

Ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico (0,05 g, 0,1 mmoles), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (*Aldrich*, 0,021 g, 0,15 mmoles, 1,2 equivalentes) y clorhidrato de 1-(3,3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (*Aldrich*, 0,029 g, 0,15 mmoles, 1,2 equivalentes) se disolvieron en acetonitrilo (15 ml) en una atmósfera de nitrógeno con enfriamiento con hielo. La temperatura se elevó gradualmente a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 2 horas, y la mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente durante una noche. La solución de reacción se enfrió de nuevo a 0 °C, se añadió solución acuosa al 25-30 % de la amina correspondiente (preparada a partir de un reactivo puro obtenido en *Aldrich*) (0,1 ml), y la agitación continuó con refrigeración durante 30 minutos y a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió acetonitrilo (5 ml) a la mezcla de reacción, y los compuestos volátiles se retiraron al vacío. El residuo semisólido se purificó por cromatografía en gel de sílice (*EMD*, 0,040-0,063 mm) (disolvente en desarrollo: gradiente de metanol-

65

diclorometano al 3-5 %) para proporcionar las amidas correspondientes con un rendimiento de un 80-87 %.

El producto a partir de la etapa anterior se disolvió en diclorometano seco (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió solución etérea 1 M de ácido clorhídrico (*Aldrich*) (1 ml) mientras que la temperatura se mantenía por debajo de 30 °C. La mezcla de reacción se agitó durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. El precipitado se filtró, se lavó con diclorometano (2 ml) y éter dietílico (2 ml) y se secó a alto vacío para proporcionar una sal de clorhidrato de los compuestos 64-68 y 70-78 correspondientes con un rendimiento de un 75-84 % y una pureza de al menos un 98 %.

10 **5. Síntesis del compuesto 80:** ácido (2S,4R)-1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico

A una solución de Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (0,05 g, 0,17 mmoles) y trietilamina (*Aldrich*) (0,19 ml, 1,37 mmoles, 8 equivalentes) en acetona (3 ml) se añadió lentamente anhídrido acético (0,13 ml, 1,37 mmoles, 8 equivalentes) con agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 3 horas mientras que se controlaba por LCMS. Después de la finalización, los compuestos volátiles se retiraron al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa (columna: Xterra MSC18 50 x 250 mm, 10u) usando gradiente de metanol/agua de 40/60 a 90/10 (ácido fórmico al 0,1 % en metanol y ácido fórmico al 0,1 % en agua) para proporcionar 0,020 g (rendimiento de un 35 %) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco con solubilidad limitada en disolventes orgánicos.

20 **6. Síntesis del compuesto 81:** ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxílico

A una solución de (2S,4R) 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de metilo (intermedio en la síntesis del Compuesto 2) (0,05 g, 0,20 mmoles), clorhidrato de 1-(3,3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (*Aldrich*) (0,043 g, 0,22 mmoles, 1,1 equivalentes), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (*Aldrich*) (0,030 g, 0,22 mmoles, 1,1 equivalentes) y ácido 2-(*tert*-butoxicarbonil(metil)amino)acético (*Aldrich*) (0,038 g, 0,20 mmoles) en diclorometano anhidro (10 ml) se añadió *N*-metilmorfolina (0,05 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 2 horas y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (*EMD*, 0,040-0,063 mm) (disolvente en desarrollo: gradiente de metanol/diclorometano al 3-5 %) para proporcionar 0,064 g (rendimiento de un 75 %) del producto de acoplamiento (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(metil)amino)acetil) pirrolidina-2-carboxilato de metilo.

A una solución de la amida que se ha mencionado anteriormente (0,064 g, 0,15 mmoles) en metanol (5 ml) se añadió solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (0,38 ml, 0,75 mmoles, 5 equivalentes) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 5 minutos. La reacción se controló por LCMS y se finalizó en 2 horas. Se añadió ácido clorhídrico 2 N acuoso (*Aldrich*) (0,38 ml, 0,75 mmoles, 5 equivalentes) a 0 °C durante 5 min. El metanol se retiró por destilación al vacío. Se añadieron acetato de etilo (10 ml) y agua (1 ml). La fase acuosa se saturó con cloruro sódico y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentró para proporcionar un producto espumoso de color blanco del ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonil (metil)amino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico que se usó en la siguiente etapa sin purificación.

El ácido a partir de la etapa anterior se disolvió en diclorometano seco (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió una solución etérea 1 M de ácido clorhídrico (*Aldrich*) (1 ml) mientras que la temperatura se mantenía por debajo de 30 °C. La mezcla de reacción se agitó durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. El precipitado formado se filtró, se lavó con diclorometano (2 ml), éter dietílico (2 ml) y se secó a alto vacío. El producto se purificó adicionalmente por HPLC preparativa (columna: Xterra MSC18 19 x 150 mm) usando gradiente de metanol/agua de un 5 % a un 95 % (ácido fórmico al 0,1 % en metanol y ácido fórmico al 0,1 % en agua) para proporcionar 0,026 g (38 % durante 3 etapas) del producto deseado.

50 **7. Síntesis del compuesto 82:** ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico

A una solución de ácido (2S,4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Compuesto 2, 0,05 g, 0,17 mmoles) y trietilamina (*Aldrich*) (0,048 ml, 0,34 mmoles, 2 equivalentes) en acetona (3 ml) se añadió lentamente anhídrido trifluoroacético (0,024 ml, 0,17 mmoles) con agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 1,5 horas con supervisión cuidadosa por LCMS. Después de la finalización, los compuestos volátiles se retiraron al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa (columna: Xterra MSC18 50 x 250 mm, 10 u) usando gradiente de metanol/agua de un 5 % a un 90 % (ácido fórmico al 0,1 % en metanol y ácido fórmico al 0,1 % en agua) para proporcionar 0,012 g (rendimiento de un 18 %) del producto deseado.

60 **8. Síntesis del compuesto 84:** ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(dimetilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico

A una solución de ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Compuesto 2, 0,05 g, 0,17 mmoles) en metanol (3 ml) a temperatura ambiente se añadió formaldehído acuoso al 37 % (*Aldrich*) (0,1 ml).

- La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 3 horas, a continuación se enfrió a 0 °C, y se añadió cianoborohidruro sódico (*Aldrich*) (0,043 g, 0,69 mmoles, 4 equivalentes) en porciones durante 5 minutos. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, el disolvente se retiró *al vacío* y el residuo sólido se purificó por HPLC preparativa (columna: XTerra MS C18, 5 u, 19 x 150 mm) usando gradiente de metanol/agua de un 5 % a un 95 % (ácido fórmico al 0,1 % en metanol y ácido fórmico al 0,1 % en agua) para proporcionar 0,017 g (rendimiento de un 31 %) del producto deseado.

**9. Síntesis del compuesto 85:** ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-formamidoacetil) pirrolidina-2-carboxílico

- Se añadió anhídrido acético (Acros) (0,32 ml, 3,4 mmoles, 10 equivalentes) gota a gota a una solución de ácido (2S,4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Compuesto 2, 0,1 g, 0,34 mmoles, 1 equivalente) en ácido fórmico (J.T.Baker) (1 ml) a 0 °C. Después de que la adición fue completa, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante un periodo adicional de 24 horas. La mezcla de reacción se controló por TLC y LCMS. Se añadió una cantidad adicional de anhídrido acético (0,32 ml, 3,4 mmoles, 10 equivalentes) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua con hielo (1 ml) y los compuestos volátiles se retiraron *al vacío* para producir un producto oleoso en bruto que se purificó adicionalmente por HPLC (columna: Waters Atlantis 19 x 150 mm) usando gradiente de ácido fórmico al 0,1 % en H<sub>2</sub>O/MeOH MeOH al 20-40 % durante 15 minutos para proporcionar 0,031 g (29 %) del producto deseado.
- Los procedimientos generales que se han explicado anteriormente se usaron para la síntesis de los compuestos a modo de ejemplo que se enumeran en la Tabla 1.

**Tabla 1**

Compuesto	Nombre	MH+ encontrado	MH+ calculado	Pureza por HPLC	Rendimiento en %
1	Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	336,17	336,11	89	18
3	Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	305,2	305,14	87	28
4	Ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	321,18	321,13	95	37
6 (referencia)	Ácido (2S,4R)1-(2-amino-4-carboxi-butiril)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico	363,16	363,14	97	18
11	Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	321,05	321,13	99	36
12	Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	305,27	305,14	99	37
13	Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	336,18	336,11	99	40
14	Ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	291,29	291,12	99	15
24 (referencia)	Ácido 3-(2-amino-acetilamino)-5-(4-metil-benzoilamino)-benzoico	327,22	327,12	99	25
26 (referencia)	Ácido 3-(2-amino-acetilamino)-5-benzoilamino-benzoico	313,13	313,11	99	10
28 (referencia)	Ácido (2S,4R) {[4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	336,19	336,11	97	39
29 (referencia)	Ácido (2S,4R) {[4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	321,29	321,13	97	30
30 (referencia)	Ácido (2S,4R)2-[[4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-acético	305,28	305,14	98	28
35 (referencia)	Ácido (2S,4S) {[4-(benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	291,29	291,12	95	24

ES 2 443 242 T3

36 (referencia)	Ácido (2S,4S) {[4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	321,35	321,13	97	33
37 (referencia)	Ácido (2S,4S){[4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	336,09	336,11	92	37
38 (referencia)	Ácido (2S,4S) {[4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	305,29	305,14	95	41 .
39 (referencia)	Ácido [2-amino-3-(4-benzoilamino-fenil)-acetilamino]-acético	341,22	341,14	98	20
40 (referencia)	Ácido {2-amino-3-[4-(4-metoxi-benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	371,28	371,15	93	56
41 (referencia)	Ácido {2-amino-3-[4-(4-Nitro-benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	386,28	386,12	93	45
42 (referencia)	Ácido {2-amino-3-[4-(4-metil benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	355,25	355,15	77	40
43 (referencia)	Ácido [(1-benzoil-imidazolidina-2-carbonil)-amino]-acético	277,17	277,11	90	22
44 (referencia)	Ácido {[1-(4-nitro-benzoil)-imidazolidina-2-carbonil]-amino}-acético	322,15	322,09	95	24
48 (referencia)	Ácido (3-amino-5-benzoilamino-benzoilamino)-acético	313,33	313,11	98	22
49 (referencia)	Ácido (3-amino-5-(4-metoxi-benzoilamino)-benzoilamino)-acético	343,29	343,12	89	45
50 (referencia)	Ácido (3-amino-5-(4-metil-benzoilamino)-benzoilamino)-acético	327,21	327,12	96	40
51 (referencia)	Ácido (3,5-di-amino-benzoilamino)-acético	209,11	209,08	98	51
52 (referencia)	Ácido (2S,4R)4-benzoilamino-1-(2-hidroxi-acetil)-pirrolidina-2-carboxílico	292,15	292,29	93	25
54 (referencia)	Ácido 3-benzoilamino-5-(2-hidroxi-acetilamino)-benzoico	314,10	314,09	96	12
56 (referencia)	Amida del ácido 1-benzoil-3-(2-hidroxi-acetil)-imidazolidina-2-carboxílico	278,12	278,09	95	17
64	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida	291	291,1	98	77
65	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida	305	305,1	> 99	82
66	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida	317,1	318,1	> 99	76
67	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida	333,2	333,2	> 99	81
68	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida	331,3	331,2	99	84
69	(2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxamida	391	391,2	> 99	80
70	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida	361,1	361,2	> 99	81
71	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida	359	359,2	99	81
72	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida.	347	347,2	99	79

73	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida	345	345,2	> 99	78
74	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida	346,9	347,2	> 99	83
75 (referencia)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)pirrolidina-2-carboxamida	374,9	375,2	> 99	75
76	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3-metilbutan-2 il)pirrolidina-2-carboxamida	361	361,2	99	80
77	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3,3-dimetilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida	374,9	375,2	99	83
78 (referencia)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-fenilpirrolidina-2-carboxamida	367,2	366,9	99	82
79 (referencia)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-tetrahidrofurano-3-il)pirrolidina-2-carboxamida	360,3	380,2	> 99	13
80	Ácido (2S,4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidapirrolidina-2-carboxílico	334,1	334,1	> 99	35
81	Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino) acetil)-pirrolidina-2-carboxílico	306,2	306,1	> 99	38
82	Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico	388	388,1	> 99	18
83	Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxílico	392,3	392,2	> 99	30
84 (referencia)	Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(dimetilamino) acetil)pirrolidina-2-carboxílico	320	320,1	> 99	31
85	Ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil) pirrolidina-2-carboxílico	320,1	320,1	> 99	29

## G. Datos de ensayos biológicos

### 1. Efecto de los compuestos en arritmias inducidas por calcio

5

El efecto antiarrítmico de los compuestos de acuerdo con las presentes enseñanzas se sometió a ensayo en un modelo de arritmias inducidas por calcio de acuerdo con el modelo de Lynch et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. (1981), 3: 49-60. Ratonés CD-1 macho se anestesiaron con Ketamina (75 mg/kg) y medetornidina (1 mg/kg) IP. Una cánula i.v. se insertó en la vena de la cola. Una señal de ECG de dirección II se registra continuamente colocando electrodos de ECG de acero inoxidable en la extremidad delantera derecha y en la extremidad delantera izquierda. El electrodo de tierra se colocó en la extremidad posterior derecha. La señal se amplificó y se filtró usando componentes de fisiógrafo Gould y software para adquisición de datos po-ne-mah. Después de un periodo de equilibrio de 90 segundos se inyectó un compuesto de ensayo en la vena de la cola (más de 30 segundos). Los ratones tratados previamente con vehículo (solución salina al 0,9 %) se someten a ensayo como animales de control.

10

15

El volumen de inyección fue de 100 µl/30 g de ratones en todos los experimentos. La infusión de CaCl<sub>2</sub> (30 mg/ml, 0,1 ml/min/30 g de ratones, 100 mg/kg/min) comenzó 3 min después de la administración IV de fármaco o de vehículo. El tiempo que transcurre desde la aparición del bloqueo de la conducción cardiaca se determinó como el tiempo desde el inicio de la infusión de CaCl<sub>2</sub> hasta que se produjo el primer suceso arrítmico. El primer bloqueo de la conducción se definió como el primer intervalo de RR, mayor que o igual a 3 veces un intervalo de RR a partir del periodo de tratamiento previo. El primer suceso arrítmico que se produce fue un bloqueo de AV de segundo grado (fallo intermitente de la conducción de AV caracterizado por una onda P sin el complejo de QRS simultáneo) o un bloqueo de SA de segundo grado (intervalo de RR prolongado y con complejo de QRS sin una onda P precedente).

20

25

Los ratones tratados previamente con vehículo (solución salina al 0,9 %) se sometieron a ensayo todos los días como una medida del nivel de control en el animal sin tratar. El volumen de inyección fue de 100 µl en todos los

experimentos. El tiempo que transcurre desde la aparición de arritmias se determinó como el momento desde el comienzo de la infusión de  $\text{CaCl}_2$  hasta el primer suceso del bloqueo de la conducción definido como el fallo intermitente de la conducción de SA o AV caracterizado por activación retardada de la onda P (bloqueo de SA) o por una onda P sin el complejo QRS simultáneo (bloqueo de AV). El tiempo que transcurre desde la aparición del bloqueo de AV se proporciona a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	Tiempo hasta el bloqueo de AV (seg.)
Solución Salina (control)	62 - 78
2	134,7
6	117,9
26	122,8
52	135,6
54	121,7
56	128,1
64	111,7
65	115,2
66	122,7
67	134,4
68	143,8
80	111,5
81	123,2
82	113,8
83	110,9
84	108,8

A partir de los datos presentados en la Tabla 2 sigue que el tratamiento previo de un ratón con una gama de compuestos de las presentes enseñanzas dio como resultado un aumento consistente en el tiempo con un bloqueo de AV en el ratón después de la infusión de  $\text{CaCl}_2$ . Los compuestos de las presentes enseñanzas presentan por lo tanto propiedades antiarrítmicas.

## 2. Efecto de los compuestos en la disminución de la conducción auricular inducida por estrés metabólico

La capacidad para mantener la conducción durante el estrés metabólico se sometió a ensayo en un modelo in vitro tal como se describe en Haugan et al (J. Cardiovasc. Electrophysiol., 2005: 16: 537-545). Se sacrificaron ratas (300-400 g) con un golpe fuerte en la nuca. El corazón se extirpó rápidamente y se transfirió a un pequeño plato que contenía tampón Tyrodes modificado oxigenado de 37 °C que contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4,  $\text{MgCl}_2$  0,8,  $\text{CaCl}_2$  1,8 HEPES 5, MES 5, Glucosa 6, pH 7,3. La aurícula izquierda se diseccionó cuidadosamente y se tomó una muestra de tejido de aproximadamente 2 x 6 mm del apéndice auricular izquierdo y se colocó en una cámara para tejido (volumen de 5 ml), (Steiert Organ Bath, Hugo Sachs Electronic., Alemania). La cámara se perfundió durante todo el estudio con tampón Tyrodes oxigenado a 37 °C a una velocidad de 10 ml/min.

Un electrodo de estimulación bipolar (acero inoxidable revestido con Teflón, diámetro de 75  $\mu\text{M}$ ) se colocó en un extremo del tejido. La estimulación se realizó a 1 Hz usando pulsos rectangulares en umbral doble (duración del estímulo de 0,2 ms) administrado con un estimulador (Hugo Sachs, Tipo 215) a través de una unidad de aislamiento (Unidad Estimuladora Aislada Universal de tipo 263, Hugo Sachs, Alemania).

Dos microelectrodos separados de iridio puro (World Precision Instruments, impedancia de la punta 3,5-4,0 M $\Omega$ ) se colocaron en una línea a lo largo del eje largo de la preparación para registrar la CV auricular. Las distancias desde el electrodo de estimulación al primer y segundo microelectrodos son de 1,5-2,0 mm y 3,0-4,0 mm, respectivamente. Cada microelectrodo se conectó a un preamplificador de etapa de cabeza (amplificación 10x de las señales). Los preamplificadores se conectaron a un módulo amplificador biopotencial que estaba conectado al sistema de adquisición de datos a través de un PLUGSYS de Hugo Sachs. Las señales se filtraron a 1 kHz y se muestrearon a 10 kHz.

Después de un período de equilibrio de 30 minutos, comenzó la estimulación a 1 Hz. Durante los primeros 20 minutos del periodo de registro (periodo de la medida inicial), la cámara se perfundió con tampón Tyrodes oxigenado de a 37 °C, pH 7,3. A continuación, la muestra de ensayo (Compuesto 2) o de control se añadió al tampón de perfusión durante otro período de 20 minutos (periodo de tratamiento previo). Después de 20 minutos de tratamiento previo, la perfusión se cambió a un tampón Tyrodes no oxigenado, sin glucosa a 37 °C, pH 7,3 (con o sin compuestos de interés) durante 40 minutos (período de estrés metabólico). Los resultados de estos experimentos se muestran gráficamente en la Figura 1.

Haciendo referencia a la Figura 1, en las preparaciones que contienen el control, la velocidad de conducción disminuyó en un 22 %. En contraste, en las preparaciones tratadas con el Compuesto 2, la velocidad de conducción auricular no cambió en comparación con la medida inicial.

A partir de los datos presentados en la Figura 1 sigue que el tratamiento previo de una separación auricular de rata aislada con un compuesto de las presentes enseñanzas evitó significativamente la disminución de la conducción cardíaca inducida por estrés metabólico. Las enfermedades cardíacas tales como auricular fibrilación, aleteo auricular, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular todas están caracterizadas por la presencia de disminución anómala de la conducción cardíaca. Por lo tanto, a través del efecto sobre la conducción cardíaca, se espera que los compuestos de las presentes enseñanzas ejerzan efectos antiarrítmicos.

### 3. Ensayo de estabilidad en plasma

Para predecir su estabilidad en plasma, los compuestos de las presentes enseñanzas se incubaron en plasma de rata macho (plasma a 1:1: tampón a pH 7,4) a una concentración 1 µM a 37 °C. Después de 3 horas, la reacción se interrumpió con acetonitrilo frío. La solución se centrifugó y el sobrenadante se analizó con LC-MS usando las siguientes condiciones de HPLC: Columna Thermo Hypersil-Keystone Aquasil C18 (50 mm x 2,1·mum, 5 µM) a temperatura ambiente; Disolvente A: ácido fórmico al 0,1 % en agua; Disolvente B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo; gradiente de disolvente: de A al 100 % a A al 50 % durante más de 2,5 min, a A al 10 % durante más de 1,5 min, y volviendo a A al 100 % y volviendo a equilibrar durante 1,5 min; caudal: 0,8 ml/min. El porcentaje del compuesto restante se calculó dividiendo los recuentos del área de la señal de LC-MS de la muestra de incubación de 3 horas entre el tiempo = 0 recuentos de área. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 3 que sigue a continuación.

**Tabla 3**

Compuesto	% Restante
2	93
64	27
65	87
66	100
67	100
68	96
69	92
70	93
71	90
72	88
73	95
80	100
81	100
82	34
83	100
84	100
85	107

#### 4. Ensayo de estabilidad metabólica

5 Para predecir la estabilidad del compuesto bajo el metabolismo del primer paso (Fase I), se incubaron compuestos de las presentes enseñanzas con microsomas de hígado de rata macho a una concentración 1  $\mu\text{M}$  y 0,5 mg/ml de concentración de proteína a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Después de 15 min, la reacción se interrumpió con acetonitrilo frío. La solución se centrifugó y el sobrenadante se analizó con LC-MS usando las condiciones de HPLC que se han descrito anteriormente en la sección 3. El porcentaje restante se calculó dividiendo los recuentos del área de LC-MS de la muestra de incubación de 15 minutos entre el tiempo = 0 recuentos de área, y la vida media del compuesto se derivó usando cinética de reacción de primer orden. Basándose en este ensayo, los Compuestos 2, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 10 70, 71, 72, 73, 80, 81, 82, 83 y 84 presentaron vidas medias superiores a 30 minutos en microsomas de hígado de rata macho.

#### 5. Modelo canino de tamaño de infarto y arritmia por reperfusión

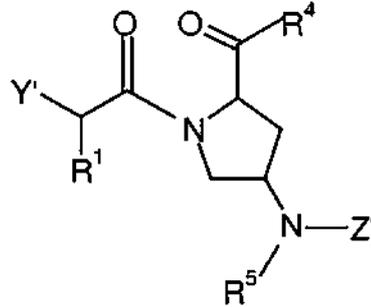
15 El Compuesto 2 se sometió a ensayo en perros sometidos a una oclusión de la arteria coronaria durante 60 minutos y una reperfusión de 4 h, tal como se describe en Hennan et al. (J. Exp. Pharmacol. Ther., 317, 236-43 (2006)). El Compuesto 2 se administró por IV 10 min antes de la reperfusión en forma de un bolo + infusión IV a dosis de: bolo de 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + infusión de 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (n = 6); bolo de 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + infusión de 1,9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (n = 7); bolo de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + infusión de 19  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (n = 6); bolo de 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + infusión de 57  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (n = 5); vehículo de control (n = 7). Los complejos ventriculares prematuros (PVC) se cuantificaron durante la reperfusión. Cuatro o más PVC consecutivos se definieron como taquicardia ventricular (VT). La incidencia total de VT se redujo significativamente con las dos dosis más elevadas del Compuesto 2 (sucesos de  $1,7 \pm 0,8$ ;  $2,2 \pm 1,4$ ;  $p < 0,05$ ) en comparación con los controles ( $23,0 \pm 6,1$ ). Los PVC totales se redujeron significativamente a partir de un  $11,1 \pm 1,6$  % en animales de control a un  $2,0 \pm 0,7$  % y un  $1,8 \pm 0,8$  % después de las dos dosis más elevadas del Compuesto 2. El tamaño del infarto, expresado como porcentaje del ventrículo izquierdo, se redujo significativamente de  $19,0 \pm 3,5$  en los controles a un  $7,9 \pm 1,5$  y un  $7,1 \pm 0,8$  % ( $p < 0,05$ ) a las dos dosis más elevadas de 2. Estos resultados demuestran que los compuestos de las presentes enseñanzas son compuestos antiarrítmicos potentes con efectos cardioprotectores.

#### 6. Modelo *in vitro* de hinchazón celular y de captación de colorante

30 Se pueden identificar péptidos capaces de demostrar citoprotección en un modelo de isquemia *in vitro* inducido por inserción celular y por captación de colorante. En este experimento, se estudió el efecto del Compuesto 2 sobre captación del colorante calceína mediante inhibición metabólica en células de glioma C6 cultivadas que sobreexpresan conexina 43. Las células se incubaron en condiciones de control y durante isquemia estimulada (SI) durante 40 minutos en presencia de calceína (200  $\mu\text{M}$ ). Después de la incubación, las células se sometieron a microscopía por epifluorescencia para determinar la captación de calceína. La incubación de células C6 en medio de SI aumentó la captación del colorante en 5 veces por encima de los valores de control. La captación fue inhibida de forma dependiente de la dosis por el Compuesto 2, y la captación mínima se obtuvo con el Compuesto 2 a 100  $\mu\text{M}$  (un 32 % de reducción relativa de la respuesta inducible por SI;  $p < 0,05$  frente al vehículo). Las células de control presentaron hinchazón celular durante el periodo de estrés de 40 min, mientras que las células tratadas con el Compuesto 2 no lo hicieron.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula III:



5

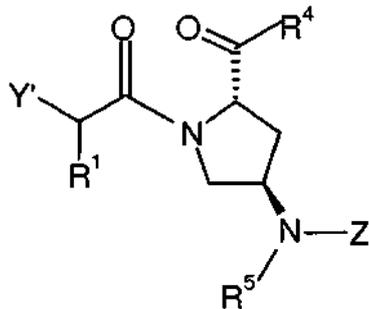
o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo,  
en la que:

- 10 R<sup>1</sup> es hidrógeno;  
Y' es NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, en la que R<sup>2</sup> es hidrógeno, y R<sup>3</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-10</sub>, C(O)R<sup>6</sup> y C(O)OR<sup>6</sup>;  
R<sup>4</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-10</sub>; y  
15 Z' es benzoílo, opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos Q, en donde cada grupo Q se selecciona independientemente entre F, Cl, Br, I, alquilo C<sub>1-10</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, O-alquilo C<sub>1-10</sub>, OH, NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1-10</sub>), N(alquilo C<sub>1-10</sub>)<sub>2</sub> y NHC(O)alquilo C<sub>1-10</sub>.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>3</sup> es hidrógeno.

20 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>3</sup> es C(O)R<sup>6</sup>, y R<sup>6</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-10</sub> opcionalmente sustituido.

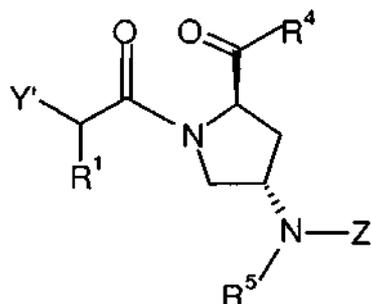
4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la siguiente estructura:



25

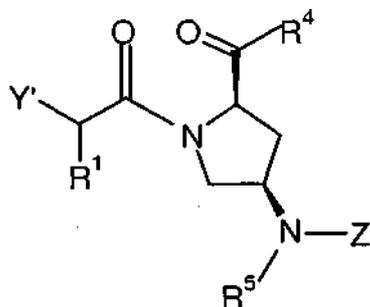
o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

30 5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la siguiente estructura:



o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

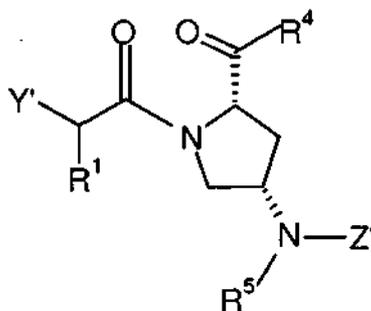
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la siguiente estructura:



5

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la siguiente estructura:



10

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es:

15

Ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico; o  
 Ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

20

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 u 8 que es:

25

Ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico, o  
 Ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

30

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

10. Un compuesto que es:

35

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N.ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida;

40

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida; o  
 Ácido 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

5

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 que es:

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida;  
 10 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida;  
 15 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida; o  
 Ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

20

12. El compuesto de la reivindicación 1 que es:

Ácido 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 25 Ácido 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico;  
 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida; o  
 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxamida;

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

30

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 12 que es:

Ácido (2S, 4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico;  
 35 Ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;  
 Ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico;  
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida; o  
 40 (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxamida;

o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

40

14. El compuesto de la reivindicación 1 que es ácido 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico, o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

45

15. El compuesto de la reivindicación 14 que es ácido (2S, 4R)1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico, o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en terapia.

18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método para prevenir o tratar una afección patológica, en donde la afección patológica es isquemia.

55

19. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método para prevenir o tratar lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero.

60

20. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método para prevenir o tratar una afección patológica, en donde la afección patológica es enfermedad cardiovascular.

21. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método para prevenir o tratar una afección patológica de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la enfermedad cardiovascular es fibrilación auricular, aleteo auricular, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular.

65

22. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método para prevenir o tratar una afección patológica de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el compuesto se formula para administración parenteral u oral.
- 5 23. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección patológica, en donde la afección patológica es isquemia.
- 10 24. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero.
- 15 25. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección patológica, en donde la afección patológica es enfermedad cardiovascular.
- 20 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la enfermedad cardiovascular es fibrilación auricular, aleteo auricular, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular.
27. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que el compuesto se formula para administración parenteral u oral.

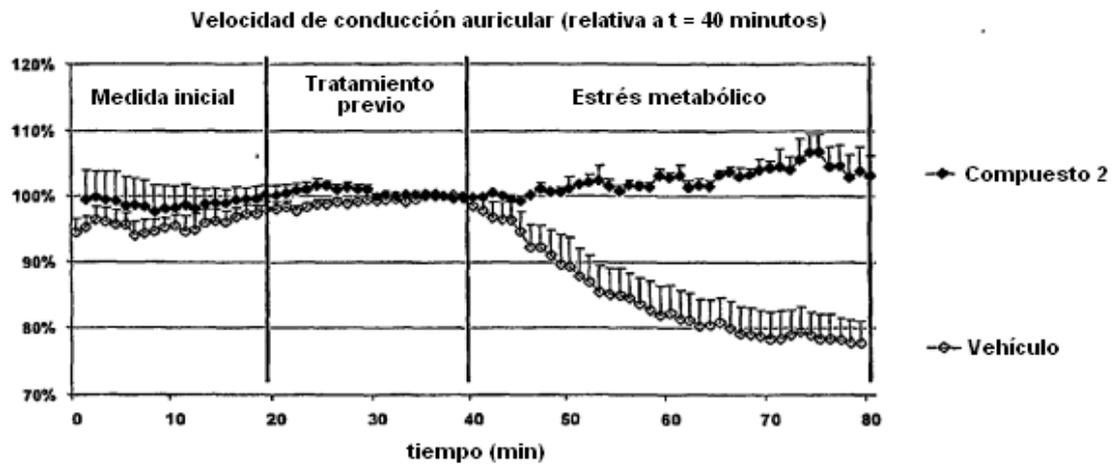


Figura 1