(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 488 992**

(51) Int. Cl.:
C07K 7/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2009 E 09727031 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2260053**

(54) Título: **Análogos de oxitocina**

(30) Prioridad:

31.03.2008 US 40973 P
19.05.2008 EP 08251739

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2014

(73) Titular/es:

FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

(72) Inventor/es:

ALAGARSAMY, SUDARKODI;
GALYEAN, ROBERT;
WISNIEWSKI, KAZIMIERZ y
SCHTEINGART, CLAUDIO

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 488 992 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

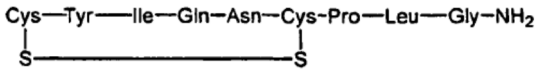
Análogos de oxitocina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos novedosos, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, uso de dichos compuestos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, entre otros, de afecciones de lactancia alterada así como a un método para el tratamiento de dichas afecciones, en donde se administran dichos compuestos.

Antecedentes

Los agonistas peptídicos del receptor de oxitocina incluyen la hormona natural oxitocina y carbetocina.



(oxitocina)

La oxitocina es un potente agente uterotónico, clínicamente usado para inducir el parto, y se ha mostrado que aumenta el inicio y mantenimiento de la lactancia, *Gimpl, G. et al., Physiol. Rev. 81 (2001) 629-683* y *Ruis H. et al., British Medical Journal 283 (1981) 340-342.* La carbetocina (1-desamino-1-carba-2-tirosina(O-metil)-oxitocina) también es un potente agente uterotónico usado clínicamente para el control de la atonía uterina y hemorragia excesiva. Investigación adicional indica que los agonistas de oxitocina son útiles para el tratamiento de inflamación y dolor, incluyendo dolor abdominal y de espalda; disfunción sexual, tanto masculina como femenina; síndrome del intestino irritable (SII), estreñimiento y obstrucción gastrointestinal; autismo, estrés, ansiedad (incluyendo trastorno de ansiedad) y depresión (*Pitman R.* et *al., Psychiatry Research,* 48:107-117*; Kirsch P et al., The Journal of Neuroscience, 25(49):11489-11493);* pérdida quirúrgica de sangre, el control de hemorragia puerperal, cicatrización e infección de heridas; mastitis y expulsión de la placenta; y osteoporosis. Además, los agonistas de oxitocina pueden ser útiles para el diagnóstico tanto de cáncer como de insuficiencia placentaria.

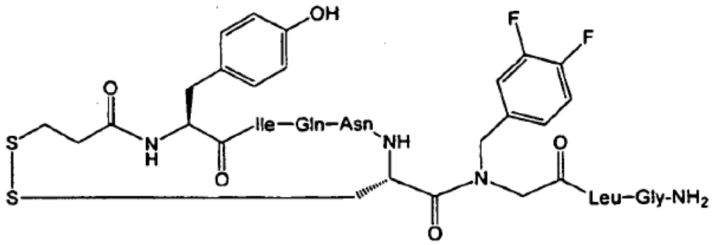
Una desventaja tanto de oxitocina como de carbetocina es su falta de selectividad sobre los receptores de vasopresina, especialmente el receptor V_2. Durante la administración de oxitocina esta desventaja se observa por tales efectos secundarios como antidiuresis e hiponatremia.

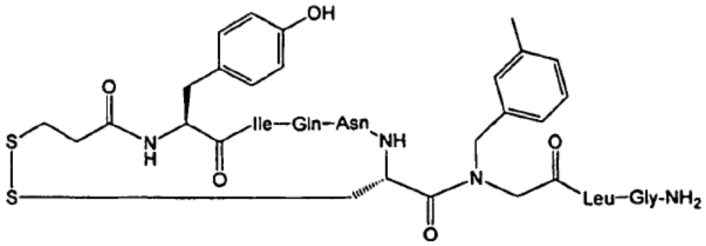
Para mejorar las propiedades farmacológicas de oxitocina, se han sintetizado análogos de oxitocina. Tales análogos se describen por Grozonka Z. et *al.* en *J. Med. Chem. 26 (1983)* 555-559 y *J. Med. Chem. 26 (1983) 1786-1787,* y por Engstrøm T. et *al.* en *E. J. Pharmacol. 355 (1998) 203-210.* Además, se han descrito análogos de oxitocina con actividad antagonista en el receptor de oxitocina por Fragiadaki M. *et al.* en *E. J. Med. Chem. (2007) 799-806.*

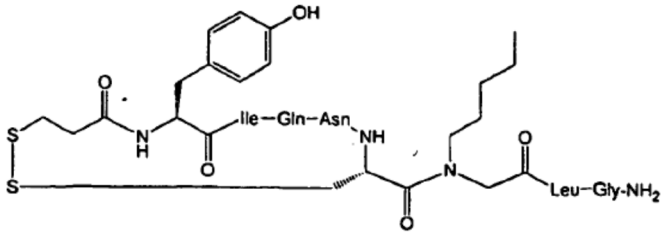
La presente invención puede proporcionar compuestos eficaces, selectivos, que proporcionan alternativas factibles y/o mejoras, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones de lactancia alterada.

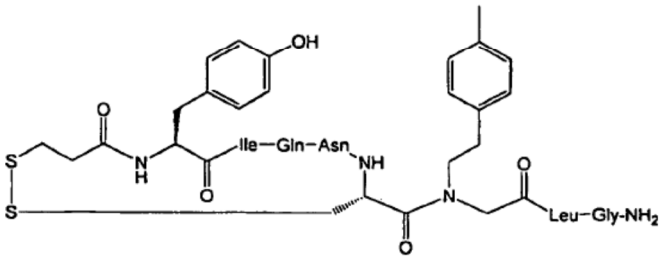
Divulgación de la invención

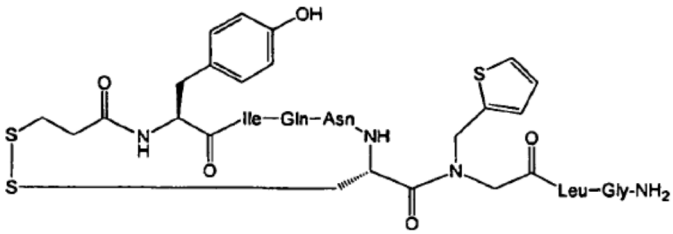
La presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

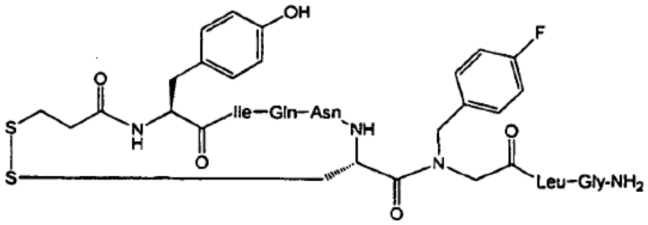


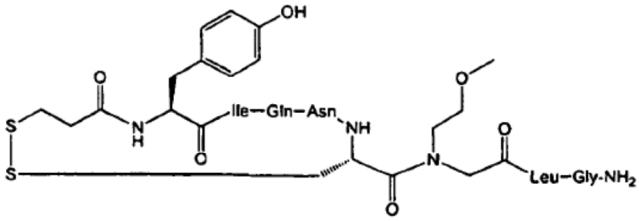

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

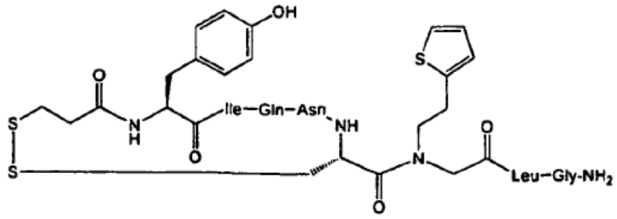

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

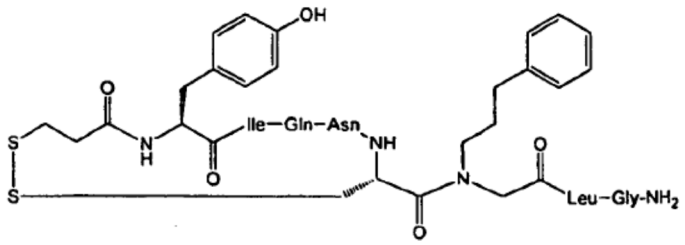

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

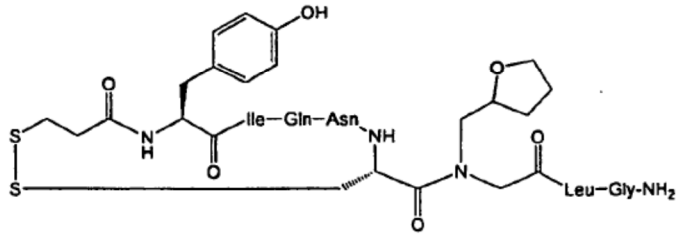

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

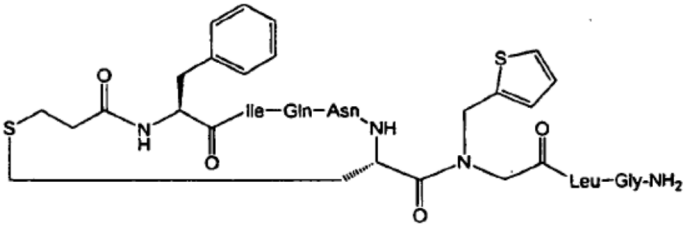

OH
F
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

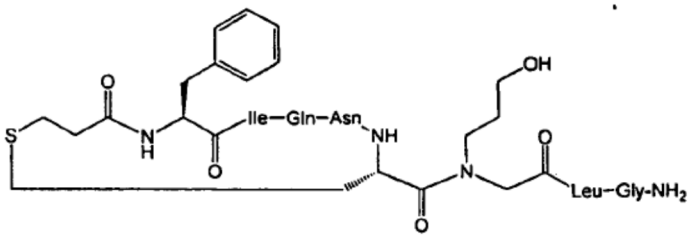

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

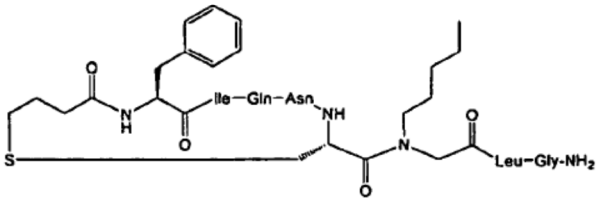

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

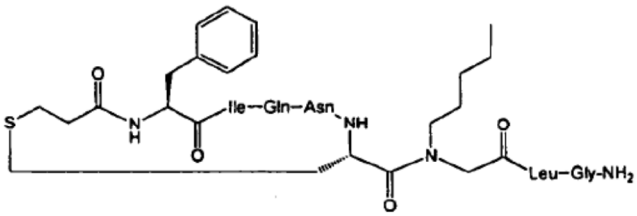

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

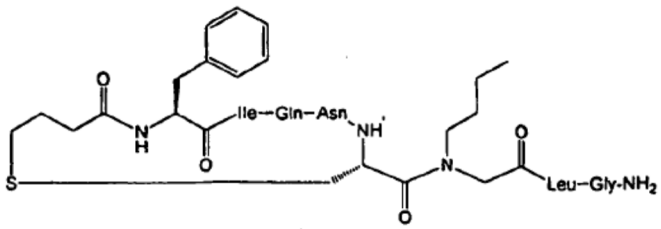

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

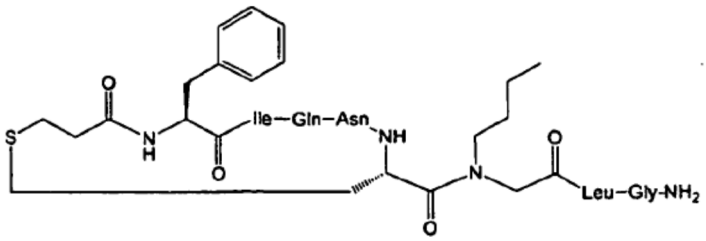

Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

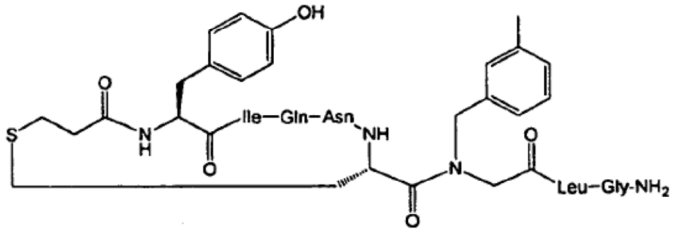

OH
Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

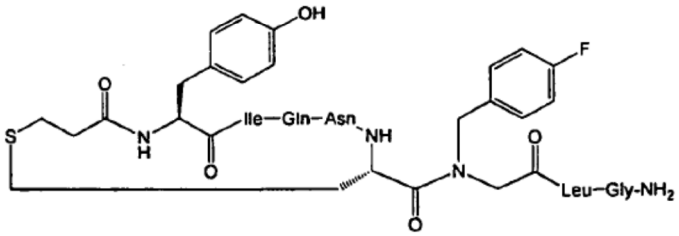

Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

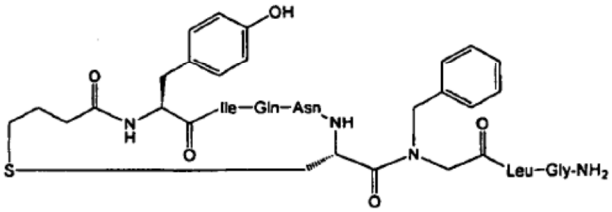

Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

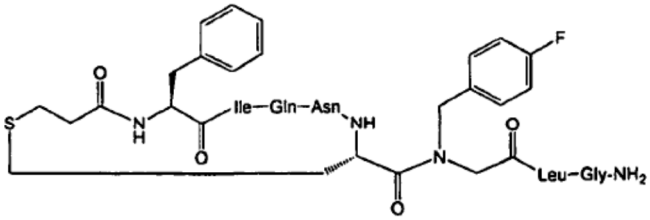

Ile–Gln–Asn
NH
Leu–Gly-NH2

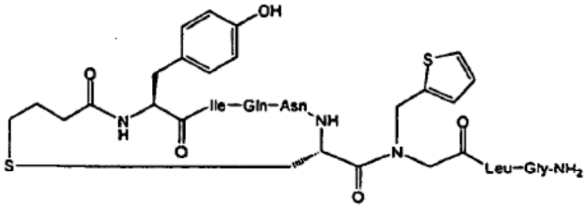

Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

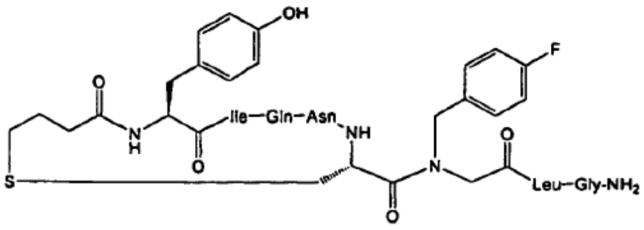

OH
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

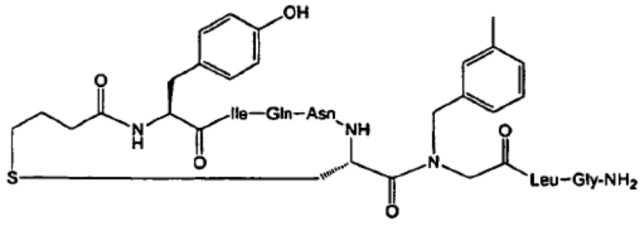

OH
F
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

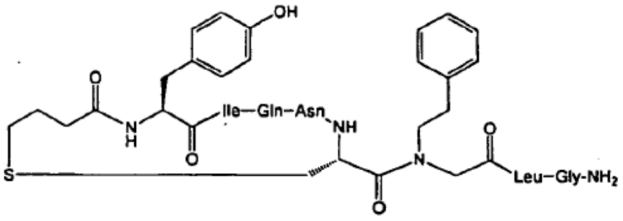

OH
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

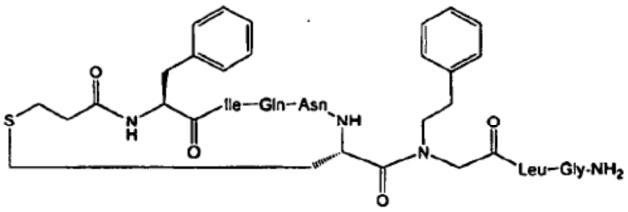

F
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

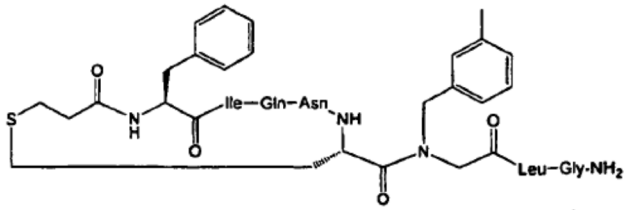

OH
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2

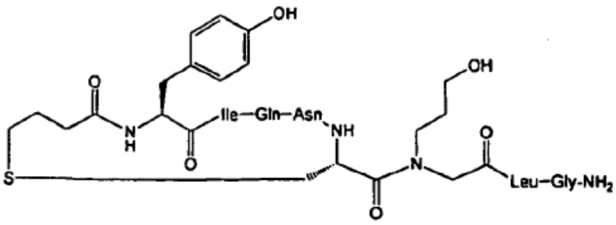

OH
F
Ile—Gln—Asn
Leu—Gly-NH2











o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables comprenden sales de adición ácida, por ejemplo, una sal formada por reacción con ácidos halhídricos tal como ácido clorhídrico y ácidos minerales, tal como ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico, así como ácidos sulfónicos o carboxílicos alifáticos, alicíclicos, aromáticos o heterocíclicos tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido embónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido halobencenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

Además, la presente invención se refiere a un compuesto como se explica anteriormente para el uso como un fármaco.

Según esto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se ha explicado anteriormente como principio activo junto con un adyuvante, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica se puede adaptar para la administración oral, intravenosa, tópica, intraperitoneal, nasal, yugal, intraocular, intraauricular, sublingual o subcutánea o para la administración a través del aparato respiratorio, por ejemplo, en forma de un aerosol o un polvo fino suspendido en el aire. Por tanto, la composición puede estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, micropartículas, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones, parches transdérmicos o supositorios.

Se debe indicar que la composición según la presente invención puede incluir opcionalmente dos o más de los compuestos anteriormente esbozados. La presente composición farmacéutica puede comprender opcionalmente, por ejemplo, al menos un aditivo adicional seleccionado de un agente disgregante, aglutinante, lubricante, agente saborizante, conservante, colorante y cualquier mezcla de los mismos. Se encuentran ejemplos de tales otros aditivos en *'Handbook of Pharmaceutical Excipients';* Ed. A.H. Kibbe, 3ª Ed., American Pharmaceutical Association, EE UU y Pharmaceutical Press RU, 2000.

La presente composición farmacéutica se puede adaptar para la administración nasal. Puede comprender una preparación acuosa estéril de los compuestos de la invención preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa estéril se puede formular según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados. La formulación de inhalador nasal SYNTOCINON® (oxitocina) es ejemplar de una formulación farmacéutica adecuada aplicable también para los compuestos inventivos divulgados en el presente documento. Agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio son diluyentes aceptables ejemplares. La preparación también puede incluir excipientes tales como fosfato de sodio, ácido cítrico, cloruro de sodio, glicerina, solución de sorbitol, metilparabeno, propilparabeno y clorobutanol.

Además, la presente invención se refiere al uso de un compuesto como se ha esbozado anteriormente para, o para la fabricación de un medicamente para, el tratamiento de una o más afecciones médicas tales como afecciones de lactancia alterada; deterioro de la inducción del parto; afecciones de atonía uterina; hemorragia excesiva; inflamación y dolor, incluyendo dolor abdominal y de espalda; disfunción sexual, tanto masculina como femenina; síndrome del intestino irritable (SII), estreñimiento y obstrucción gastrointestinal; autismo, estrés, ansiedad (incluyendo trastornos de ansiedad) y depresión; pérdida quirúrgica de sangre, hemorragia puerperal, cicatrización e infección de heridas; mastitis y deterioro en la expulsión de la placenta; y osteoporosis. En el presente documento, el término ansiedad incluye trastorno de ansiedad. El trastorno de ansiedad incluye las subindicaciones trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, agorafobia, fobias, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés postraumático, y ansiedad por separación.

La dosis típica de los compuestos según la presente invención varía en un amplio intervalo y dependerá de varios factores tal como las necesidades individuales de cada paciente y la vía de administración. Un médico experto en la materia podrá optimizar la dosis respecto a la situación a mano.

Por ejemplo, si la composición de la invención es para potenciar el inicio y mantenimiento de la lactancia (por ejemplo, para administración intranasal), una dosis típica puede estar en el intervalo de 0,05 a 1,0 µg/kg de peso corporal para cada sesión de extracción de leche materna. Una dosis intranasal se puede dividir en, por ejemplo, 1, 2 o 3 subdosis (por ejemplo, inhalaciones), por ejemplo, administradas a uno o ambos orificios nasales según sea necesario. El experto en la materia o médico puede considerar variaciones relevantes a este intervalo de dosis e implementaciones prácticas para acomodar la situación a mano.

En un ejemplo adicional, la composición de la invención se puede administrar como una infusión intravenosa (iv), por ejemplo, para el tratamiento de la hemorragia puerperal o pérdida quirúrgica de sangre. En este ejemplo se puede administrar durante un periodo más largo. Una dosis de ejemplo para la administración por infusión intravenosa es 0,5-200 µg/kg peso corporal por hora.

En un ejemplo adicional, la composición de la invención puede ser para la administración subcutánea (SC), intranasal, o yugal, por ejemplo para tratar un trastorno de ansiedad o depresión. Una dosis de ejemplo para la administración subcutánea (sc), intranasal, o yugal es 0,5-1000 µg/kg de peso corporal. La dosis puede ser, por ejemplo, para la administración tantas veces al día como sea necesario, por ejemplo, una vez o dos veces al día.

Las abreviaturas usadas son:

AcOH	ácido acético
Boc	tert-butoxicarbonilo
BOP	hexafluorurofosfato de benzotriazol-1-il-oxi trisdimetilaminofosfonio
Bua	ácido butírico
Bu	butilo - los residuos alquilo se pueden indicar además como *n* (normal, es decir, sin ramificar), *i* (iso), *s* (sec) y *t* (terciario)
CH_3CN	acetonitrilo
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIC	N,N'-disisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
4-FBzlGly	N-(4-fluorobencil)glicina
Fmoc	9-fluorofenilmetoxicarbonilo
Fmoc-Cl	cloruro de 9-fluorofenilmetoxicarbonilo

h	hora(s)
HBTU	hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
Hcy	homocisteína
HF	fluoruro de hidrógeno
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IPA	alcohol isopropílico
MeOH	metanol
MBHA	4-metilbencihidrilamina
NMM	4-metilmorfolina
4-Pic	4-picolilo (4-piridilmetilo)
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi trispirrolidinfosfonio
tBu	tert-butilo
tBuOH	alcohol tert-butílico
TEA	trietilamina
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
Trt	tritilo [trifenilmetilo, $(C_6H_5)_3C$-]

A menos que se especifique de otra manera se usaron L-aminoácidos y se adhiere a la terminología condicional de aminoácidos.

Experimental (síntesis)

Se adquirieron los derivados de aminoácidos y las resinas de proveedores comerciales (Bachem, Novabiochem y Peptides International). Se sintetizaron N-Fmoc-N-$(R_2(CH_2)_p)$glicina, Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH y Fmoc-Hcy(t-butoxicarboniletil)-OH según la bibliografía [*Weber et al., J. Med. Chem., 46 1918 (2003), Prochazka et al. Collect. Czech. Chem. Commun., 57, 1335 (1992)* y Wisniewski et al. en el documento WO 03/072597]. Otros productos químicos y solventes fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, Fluka y Acros Organics.

Los compuestos en el presente documento se sintetizaron por métodos estándar en química de péptidos de fase sólida utilizando metodología tanto Fmoc como Boc. Todos los acoplamientos de aminoácidos protegidos con Fmoc estuvieron mediados con DIC/HOBt/DMF y todos los acoplamientos de aminoácidos protegidos con Boc estuvieron mediados con DIC o DCC en DCM. La eliminación del grupo Fmoc se realizó con piperidina al 20% en DMF y la eliminación del grupo Boc se realizó en TFA al 50%/DCM con m-cresol al 1% durante 5 y 25 minutos. Los lavados precisos de la resina se realizaron con DCM, IPA, DMF y MeOH. La neutralización, según fuese necesaria, se logró con 2 lavados de resina de TEA al 10%/DCM durante 5 minutos.

A menos que se proporcione de otra manera, todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente. Además de las referencias citadas anteriormente, la siguiente bibliografía de referencias estándar proporciona orientación adicional sobre el marco experimental general, así como sobre la disponibilidad de materiales de partida y reactivos requeridos:

Kates, S.A., Albericio, F., Eds., *Solid Phase Synthesis: A Practical Guide,* Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 2000;
Stewart, J.M., Young, J.D., *Solid Phase Synthesis,* Pierce Chemical Company, 1984;
Bisello, et *al., J. Biol. Chem.* 1998, 273, 22498-22505; y
Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149-2154.

La pureza del péptido sintetizado se puede determinar por HPLC de fase inversa analítica. La integridad estructural de los péptidos se puede confirmar usando análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de electroespray.

Se usaron las metodologías Fmoc y Boc para sintetizar el dipéptido unido a la resina en la posición 8 (Leu) y la posición 9 (Gly).

El derivado de aminoácido en la posición 7 del residuo de aminoácido se introdujo a través de una de dos vías: o bien se acopló ácido bromoacético al dipéptido unido a la resina en condiciones DIC/HOBt/DMF y el átomo de bromo se desplazó con N-$(R_2(CH_2)_p)NH_2$ proporcionando N-$(R_2(CH_2)_p)$glicina unido a la resina; o se acopló un derivado de N-Fmoc-N-$(R_2(CH_2)_p)$glicina o Fmoc-pro-OH al dipéptido unido a la resina según la metodología Fmoc. Todos los acoplamientos posteriores de aminoácidos siguieron la metodología Fmoc a menos que se especifique de otra manera.

El derivado de aminoácido introducido en la posición 6 era uno de: Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Hcy(t-butoxicarboniletil)-OH o Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH. Los análogos de péptidos donde la posición 6 era Fmoc-Cys(Trt)-OH requirieron acoplamiento de Mpa(Trt)-OH al extremo N del residuo nonapéptido unido a la resina.

Los péptidos sintetizados usando un soporte de resina de Rink amida se cortaron de la resina, junto con cualquier grupo protector lábil ácido tal como Boc, tritilo y t-butilo, con una solución TFA/TIS/H_2O 95/2,5/2,5 (v/v/v). Dichos péptidos se ciclaron después del corte del péptido de la resina. Los péptidos sintetizados usando un soporte de resina MBHA se cortaron de la resina con una solución HF/anisol 14/1 (v/v). Dichos péptidos se ciclaron antes del corte del péptido de la resina.

La ciclación del nonapéptido lineal a través de la formación de un (anillo) disulfuro se alcanzó por oxidación de los péptidos lineales disueltos en TFA al 10% (ac) con yodo. La ciclación del nonapéptido lineal a través de la formación de un enlace amida se alcanzó por mediación con HBTU/DIPEA/DMF o PyBOP/DIPEA/DMF a una alta dilución.

Los péptidos se purificaron por HPLC preparativa en tampones fosfato de trietilamonio (ac) y se desaló con el sistema tampón ácido acético (ac)/acetonitrilo. Las fracciones con una pureza que superaba el 97% se juntaron y liofilizaron.

La tabla 1 enumera los compuestos preparados mediante el procedimiento anterior.

Tabla 1: Compuestos preparados con la fórmula (I)

SEQ ID NO.	W	X	R_1	n	R_2	p	R_3
1	CH_2	S	4-metoxifenilo	1	CH_2-(R)-CH(OCH_3)-CH_2	-	enlace
2	CH_2	S	4-metoxifenilo	1	CH_2-(R)-CH(SCH_3)-CH_2	-	enlace
3	CH_2	S	4-etilfenilo	1	CH_2-(R)-CH(OCH_3)-CH_2	-	enlace
4	S	CH_2	4-etilfenilo	1	CH_2-(S)-CH(OH)-CH_2	-	enlace
5	CH_2	S	4-metoxifenilo	1	H	0	H
6	CH_2	S	4-etilfenilo	1	CH_2-(S)-CH(OH)-CH_2	-	enlace
7	S	S	4-hidroxifenilo	1	H	4	H
8	S	S	4-hidroxifenilo	1	fenilo	2	H
9	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-furilo	1	H
10*	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-piridilo	1	H
11	S	S	4-hidroxifenilo	1	3,4-difluorofenilo	1	H
12	S	S	4-hidroxifenilo	1	3-metilfenilo	1	H
13	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-metilfenilo	1	H
14	S	S	4-hidroxifenilo	1	H	5	H
15	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-metilfenilo	2	H
16	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-tienilo	1	H
17	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-piridilo	2	H
18*	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-piridilo	2	H
19	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-fluorofenilo	1	H
20	S	S	4-hidroxifenilo	1	metoxi	2	H
21	S	S	4-hidroxifenilo	1	ciclopropilo	1	H
22	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-metoxifenilo	1	H
23	S	S	4-hidroxifenilo	1	4-metilfenilo	1	H
24	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-tienilo	2	H
25	S	S	4-hidroxifenilo	1	fenilo	3	H
26	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-tetrahidrofurilo	1	H
27	S	S	4-hidroxifenilo	1	2-tetrahidrofurilo	1	H
28	S	CH_2	fenilo	1	metoxi	2	H
29	CH_2	S	fenilo	1	metoxi	2	H
30	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	metoxi	2	H
31	S	CH_2	fenilo	1	2-tienilo	1	H
32	S	CH_2	4-hidroxifenilo	1	fenilo	1	H
33	S	CH_2	4-hidroxifenilo	1	fenilo	2	H
34*	S	CH_2	fenilo	1	fenilo	1	H
35	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	H	4	H
36	S	CH_2	fenilo	1	OH	3	H
37	CH_2	S	fenilo	1	H	3	H
38	S	CH_2	fenilo	1	H	3	H
39	CH_2	S	fenilo	1	H	5	H
40	S	CH_2	fenilo	1	H	5	H
41	CH_2	S	fenilo	1	H	4	H
42	S	CH_2	fenilo	1	H	4	H
43	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	3,4-difluorofenilo	1	H
44	S	CH_2	4-hidroxifenilo	1	3-metilfenilo	1	H
45	S	CH_2	4-hidroxifenilo	1	4-fluorofenilo	1	H

46	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	fenilo	1	H
47*	S	CH_2	fenilo	1	4-fluorofenilo	1	H
48	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	2-tienilo	1	H
49*	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	4-fluorofenilo	1	H
50	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	3-metilfenilo	1	H
51*	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	fenilo	2	H
52*	S	CH_2	fenilo	1	fenilo	2	H
53	S	CH_2	fenilo	1	3-metilfenilo	1	H
54	CH_2	S	4-hidroxifenilo	1	OH	3	H

Los compuestos con SEQ ID NO. 1 a 6, 9, 10, 13, 17, 18, 21 y 22 son ejemplos comparativos.

Se proporcionan los siguientes ejemplos detallados para ilustrar adicionalmente la síntesis.

En todas las síntesis se realizó HPLC analítica en un cromatógrafo líquido Waters 600 usando una columna Vydac C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La HPLC preparativa se realizó en un cromatógrafo líquido Waters 2000 usando un cartucho PrePak 47 x 300 mm a una velocidad de flujo de 100 ml/min. El análisis del compuesto final se realizó en un cromatógrafo líquido 1100 Agilent usando una columna Vydac C18, 5 µm, 2,1 x 250 mm a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Finnigan MAT.

Compuesto 49; carba-1-[4FBzlGly^7]dOT:

Los derivados de aminoácidos usados fueron Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Boc-Tyr(tBu)-OH (Peptides International). Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH se sintetizó como anteriormente.

La resina del péptido completamente protegido se sintetizó manualmente, empezando de 1,45 g (0,87 mmol) de resina de Rink amida AM (malla 200-400, Novabiochem). Se realizaron acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivados de aminoácido Gly y Leu. El residuo de N-(4-fluorobencil)glicina se introdujo con un exceso de 4 veces de $BrCH_2CO_2H$/DIC/HOBt en DMF y posterior sustitución de bromo con un exceso de 10 veces de 4-fluorobencilamina en DMF. Se realizó acoplamiento mediado por DIC/DCM con un exceso de 4 veces de Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH. Posteriormente se realizaron acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivados de aminoácido Asn, Gln, Ile y Tyr. Los grupos Fmoc se eliminaron con piperidina al 20% en DMF. Tras la terminación de la síntesis en fase sólida, la resina se trató con una solución TFA/TIS/H_2O 96/2,5/1,5 (v/v/v) (50 ml) durante 1,5 horas y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el péptido lineal crudo se precipitó con éter dietílico. El precipitado en DMF (300 ml) se añadió en 3 porciones (3 x 100 ml) a una solución vigorosamente agitada de DIPEA (1 ml) en DMF (100 ml). Se añadió HBTU (150 mg) en DMF (5 ml) a la mezcla de reacción después de la adición de cada porción de 100 ml de solución de péptido; el pH de la solución de reacción se mantuvo a pH 9 mediante la adición de DIPEA puro, según se requirió. La reacción se siguió por HPLC analítico. La solución de reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en AcOH/CH_3CN/H_2O. La mezcla se cargó en una columna de HPLC y se purificó usando un tampón fosfato de trietilamonio con pH 5,2. El compuesto se eluyó con un gradiente de acetonitrilo. Las fracciones con una pureza que superaba el 97% se juntaron, se diluyeron con agua (2 volúmenes), y se cargaron en una columna pre-equilibrada con AcOH al 2% (ac). El compuesto deseado se eluyó con un gradiente rápido (3%/min) de CH_3CN. Las fracciones que contenían el producto deseado se juntaron y liofilizaron. Se obtuvieron 434 mg (~40% de rendimiento, basado en la carga de la resina de partida y asumiendo un contenido en péptido del 85%) de polvo amorfo blanco. HPLC: Tr = 19,4 min, gradiente: 5% de B durante 0,5 min. 5→30% de B en 0,5 min, 30→50% de B durante 20 min y 100% de B durante 5 min, t = 40ºC, solvente A TFA al 0,01% (ac), solvente B CH_3CN al 70%, TFA al 0,01% (ac); pureza: 99,3%; MS $(M+H)^+$: esperada 1042,4, observada 1042,5.

Los siguiente es una síntesis a gran escala (es decir aumento proporcional) ejemplar del compuesto 49; carba-1-[4FBzlGly^7]dOT:

Los derivados de aminoácidos usados fueron Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-4-FBzlGly-OH, Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Boc-Tyr(tBu)-OH (Peptides International). Fmoc-4-FBzlGly-OH y Fmoc-Cys(t-butoxicarbonilpropil)-OH se sintetizaron como anteriormente. El péptido se sintetizó por acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivado de aminoácido. La síntesis restante y la caracterización del compuesto 49 se siguió como se proporciona anteriormente. Se obtuvieron 434 mg (~40% de rendimiento, basado en la carga de la resina de partida y asumiendo un contenido en péptido del 85%) de polvo amorfo blanco.

Compuesto 10 [4-PicGly^7]dOT:

Los derivados de aminoácidos usados fueron Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Mpa(Trt)-OH (Peptides International). La resina del péptido completamente protegido se sintetizó manualmente, empezando de 1,33 g (0,65 mmol) de resina de Rink amida AM (malla 200-400, Novabiochem). Se realizaron acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivados de aminoácido Gly y Leu. El residuo de N-(4-picolil)glicina se introdujo con un exceso de 4 veces de $BrCH_2CO_2H$/DIC/HOBt en DMF y posterior sustitución de bromo con un exceso de 10 veces de 4-picolilamina en DMF. Se realizó acoplamiento mediado por DIC/DCM con un exceso de 4 veces de Fmoc-Cys(Trt)-OH y acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivados de aminoácido Asn, Gln, Ile, Tyr y Mpa. Los grupos Fmoc se eliminaron con piperidina al 20% en DMF. Tras la terminación de la síntesis en fase sólida, la resina se trató con una solución TFA/TIS/H_2O 96/2/2 (v/v/v) (50 ml) durante 1,5 horas y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el péptido lineal crudo se precipitó con éter dietílico. El precipitado se disolvió en TFA puro (50 ml), se echó en una solución magnéticamente agitada de acetonitrilo acuoso al 5% (600 ml) y el péptido se oxidó añadiendo I_2 0,1 M en metanol hasta que el color amarillo se mantuvo. El exceso de yodo se redujo con ácido ascórbico sólido (Sigma-Aldrich) y el pH de la solución se ajustó a aproximadamente 4 añadiendo amoniaco concentrado (ac). La mezcla se cargó en una columna de HPLC y se purificó usando un tampón fosfato de trietilamonio con pH 5,2. El compuesto se eluyó con un gradiente de acetonitrilo. Las fracciones con una pureza que superaba el 97% se juntaron, se diluyeron con agua (2 volúmenes), y se cargaron en una columna pre-equilibrada con AcOH al 2% (ac). El compuesto deseado se eluyó con un gradiente rápido (3%/min) de acetonitrilo. Las fracciones que contenían el producto deseado se juntaron y liofilizaron. Se obtuvieron 348,7 mg (~44% de rendimiento, basado en la carga de la resina de partida y asumiendo un contenido en péptido del 85%) de polvo amorfo blanco. HPLC: Tr = 21,7 min, gradiente: 5% de B durante 0,5 min. 5→10% de B en 0,5 min, 10→30% de B durante 20 min y 100% de B durante 5 min, t = 40ºC, solvente A TFA al 0,01% (ac), solvente B CH_3CN al 70%, TFA al 0,01% (ac); pureza: 99,9%; MS $(M+H)^+$: esperada 1043,4, observada 1043,4.

Compuesto 29; carba-6-[Phe^2,$MeOEtGly^7$]dOT:

Los derivados de aminoácidos usados fueron Boc-Gly-OH y Boc-Leu-OH (Bachem), Fmoc-Hcy(t-butoxicarboniletil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Boc-Phe-OH (Peptides International). Fmoc-Hcy(t-butoxicarboniletil)-OH se sintetizó como anteriormente.

La resina del péptido completamente protegido se sintetizó manualmente, empezando de 1,33 g de resina MBHA (0,94 mmol, Novabiochem). La resina se neutralizó con TEA al 10% en DCM. Se realizaron acoplamientos individuales mediados por DIC/DCM con un exceso de 1,7 veces de aminoácidos Boc-Gly-OH y Boc-Leu-OH. El residuo N-(2-metoxietil)glicina se introdujo con un exceso de 3,6 veces de $BrCH_2CO_2H$/DIC/HOBt en DMF y posterior sustitución de bromo con un exceso de 7 veces de 2-metoxietilamina y un exceso de 4 veces de DIPEA en DMF (10 ml); la reacción se agitó durante 5 horas. Se realizaron el acoplamiento individual mediado por DIC/DCM con un exceso de 4 veces de Fmoc-Hcy(t-butoxicarboniletil)-OH y acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt/DMF con un exceso de 3 veces de derivados de aminoácido Asn y Gln. Los dos acoplamientos individuales finales con Fmoc-Ile-OH y Boc-Phe-OH se realizaron con DIC/DCM para proporcionar el péptido lineal unido a la resina protegido deseado. Los grupos Fmoc se eliminaron con piperidina al 20% en DMF. La resina se trató con una solución de TFA/TIS/H_2O 95/3/2 (v/v/v) durante 2 horas para eliminar los grupos tritilo, Boc y t-butilo. Se añadieron BOP (4 eq) y DIPEA (10 eq) a una suspensión agitada de la resina en DMF (10 ml); después de 2 horas se añadieron PyBOP (2 eq) y DIPEA (5 eq). El péptido se cortó de la resina usando 70 ml de HF anhídrido que contenía 5 ml de anisol a 0ºC durante 90 minutos. El HF se eliminó al vacío y el péptido lineal crudo se lavó con éter dietílico (300 ml). El péptido se disolvió en AcOH/CH_3CN/H_2O 1/2/7 (v/v/v) (400 ml). La mezcla resultante se cargó directamente en una columna de HPLC y se purificó usando un tampón fosfato de trietilamonio con pH 2,3. El compuesto se eluyó con un gradiente de acetonitrilo. Las fracciones con una pureza que superaba el 97% se juntaron, se diluyeron con agua (2 volúmenes), y se cargaron en una columna pre-equilibrada con ácido acético al 2% (ac). El compuesto deseado se eluyó con una gradiente de AcOH al 1%/CH_3CN. Las fracciones que contenían el producto deseado se juntaron y liofilizaron.

Se obtuvieron 292,7 mg (~27% de rendimiento, basado en la carga de la resina de partida y asumiendo un contenido en péptido del 85%) de polvo amorfo blanco. HPLC: Tr = 16,7 min, gradiente: 5% de B durante 0,5 min. 5→30% de B en 0,5 min, 30→50% de B durante 20 min y 100% de B durante 5 min, t = 40ºC, solvente A TFA al 0,01% (ac), solvente B CH_3CN al 70%, TFA al 0,01% (ac); pureza: 100,0%; MS $(M+H)^+$: esperada 976,5, observada 976,3.

Los otros compuestos se prepararon por una variación análoga de estos procedimientos sintéticos.

Experimental (ensayos biológicos)

Ensayos del receptor *in vitro*:

Se determinó la actividad agonista de los compuestos en el receptor de hOT en un ensayo transcripcional de gen indicador mediante transfección transitoria de un ADN de expresión del receptor de hOT en una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) conjuntamente con un ADN indicador que contenía elementos del promotor que

responde a calcio intracelular regulando la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Véase, Boss, V., Talpade, D.J., Murphy, T.J. *J. Biol. Chem.*, 3 de Mayo 1996; 271(18), 10429-10432 para orientación adicional sobre este ensayo. Las células se expusieron a diluciones en serie de los compuestos diluidos 10 veces por dosis durante 5 horas, seguido por la lisis de las células, determinación de la actividad luciferasa, y determinación de las eficacias de los compuestos y valores de CE_{50} mediante regresión no lineal. Se usó oxitocina (OT) como un control interno en cada experimento, y los compuestos se probaron en al menos tres experimentos independientes. Para determinar la selectividad, los compuestos se ensayaron además en ensayos transcripcionales de gen indicador basados en luciferasa expresando el receptor de vasopresina humana (hV_2).

Para fines comparativos adicionales también se usó carbetocina como un compuesto de referencia.

Los resultados de los ensayos in vivo se representan en la tabla 2 a continuación. El valor de CE_{50} dado es la media geométrica expresada en nanomol/l (nM). Los valores de selectividad se dan como cocientes de CE_{50}.

Tabla 2: Resultados de las pruebas biológicas

Compuesto probado	CE_{50} para el receptor de hOT	CE_{50} para el receptor de hV_2	Selectividad hV_2/hOT
1	0,980	688,22	702
2	0,817	671,12	822
3	0,207	446,76	2158
4	0,033	17,70	544
5	0,370	448,67	1211
6	0,064	39,95	629
7	0,062	34,78	558
8	0,116	65,55	565
9	0,114	61,79	544
10	0,464	384,04	828
11	0,026	58,54	2217
12	0,011	29,78	2607
13	0,121	67,81	562
14	0,005	77,11	15124
15	0,040	101,77	2533
16	0,009	57,29	6067
17	0,023	47,27	2014
18	0,115	180,32	1561
19	0,012	82,03	6607
20	0,030	80,29	2659
21	0,006	9,87	1729
22	0,063	77,83	1245
23	0,148	83,55	565
24	0,016	86,10	5469
25	0,058	159,44	2736
26	0,072	226,14	3160
27	0,189	238,02	1259
28	0,847	1264,33	1493
29	0,957	1100,45	1149
30	0,109	69,68	639
31	0,297	760,80	2564
32	0,051	35,83	705
33	0,046	100,71	2203
34	0,405	718,38	1774
35	0,122	72,66	597
36	0,859	2551,62	2970
37	0,228	441,72	1941
38	0,271	227,03	839
39	0,254	2058,97	8115
40	0,069	1024,67	14945
41	0,227	1999,84	8793
42	0,086	1192,93	13901
43	0,104	123,61	1187
44	0,023	55,14	2404
45	0,036	140,24	3914

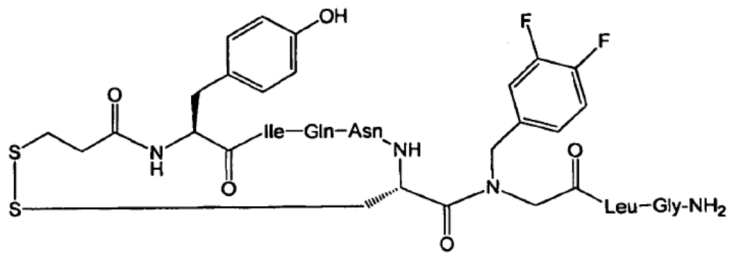
46	0,039	140,36	3632
47	0,228	1415,28	6221
48	0,089	253,03	2854
49	0,08	328,57	4293
50	0,077	212,57	2761
51	0,045	161,91	3614
52	0,779	3005,36	3860
53	0,562	1613,76	2870
54	0,013	496,61	37735
oxitocina	2,34	7,33	3
carbetocina	0,70	171,98	244

Los resultados anteriores indican que los compuestos de ejemplo están dentro del ámbito de la invención y pueden, por ejemplo, ser útiles en el tratamiento seguro y eficaz de seres humanos para inducir el parto, controlar la atonía uterina, fomentar y mantener la lactancia, etc.

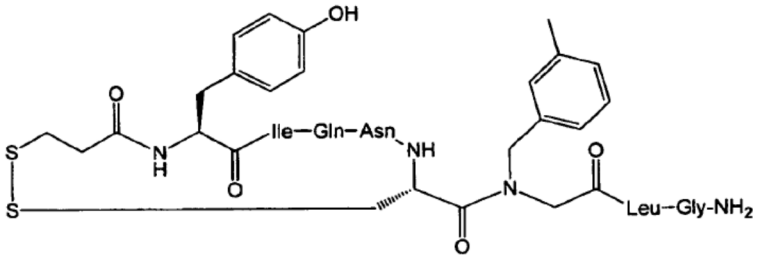
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en:

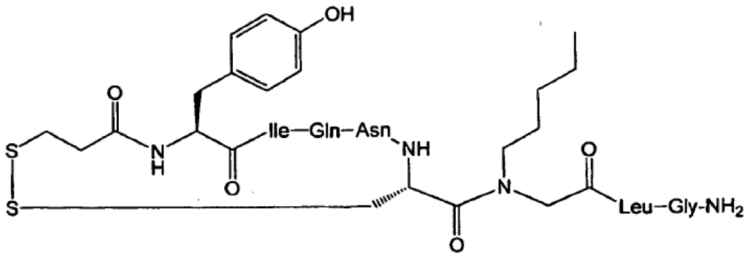
Compuesto 11



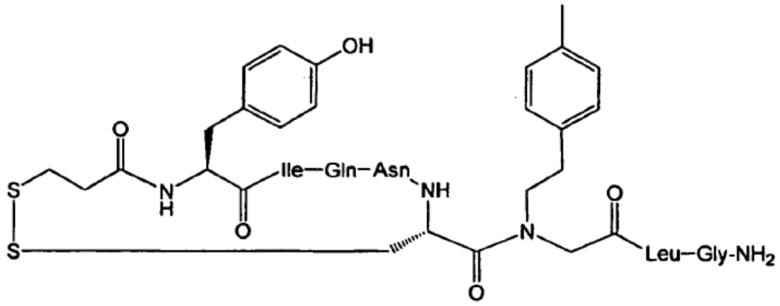
Compuesto 12



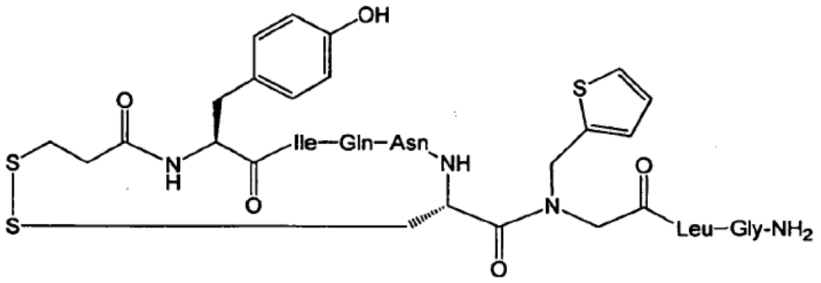
Compuesto 14



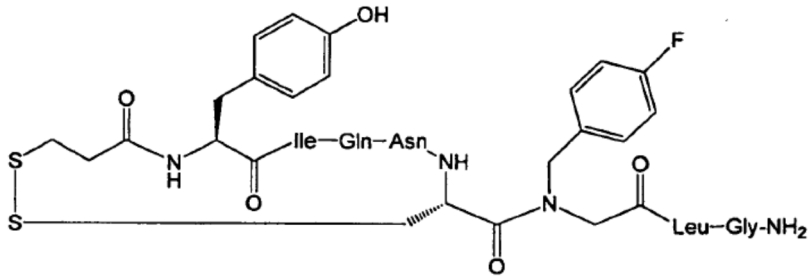
Compuesto 15



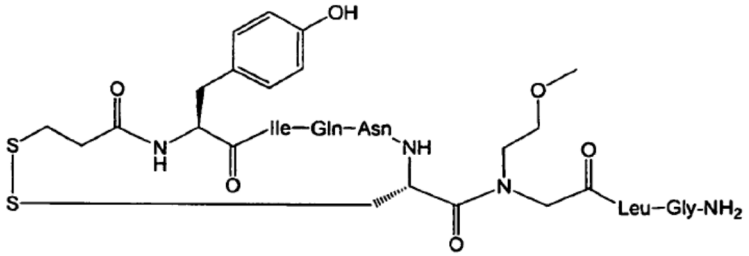
Compuesto 16



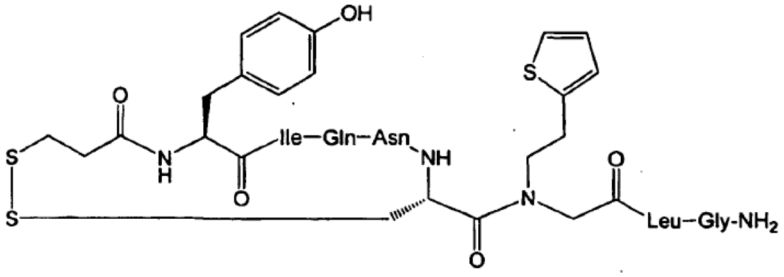
Compuesto 19



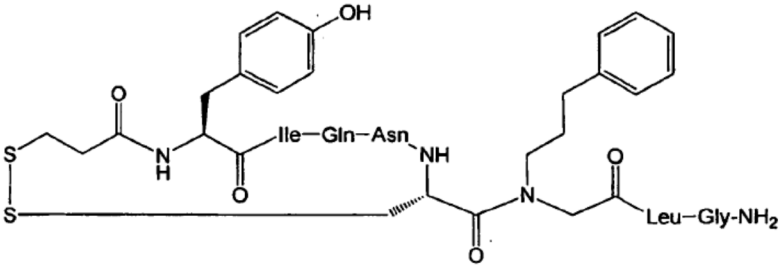
Compuesto 20



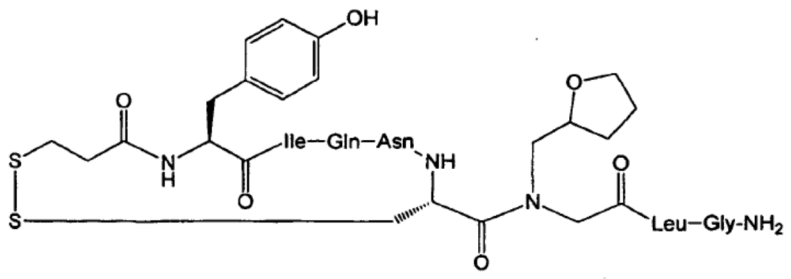
Compuesto 24



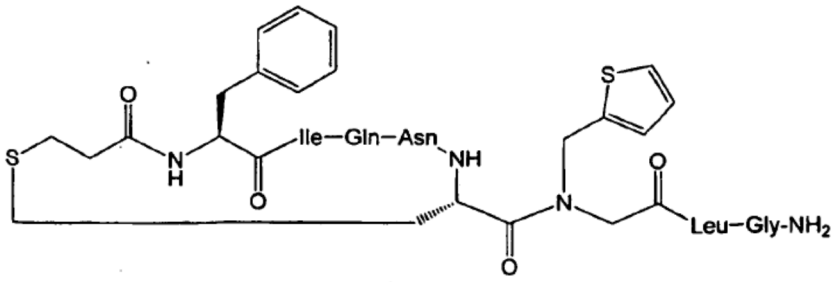
Compuesto 25



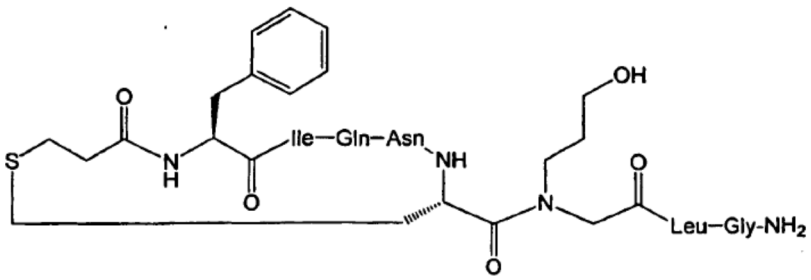
Compuesto 26



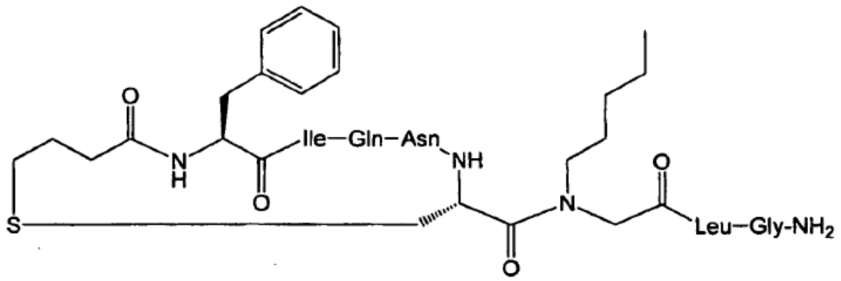
Compuesto 31



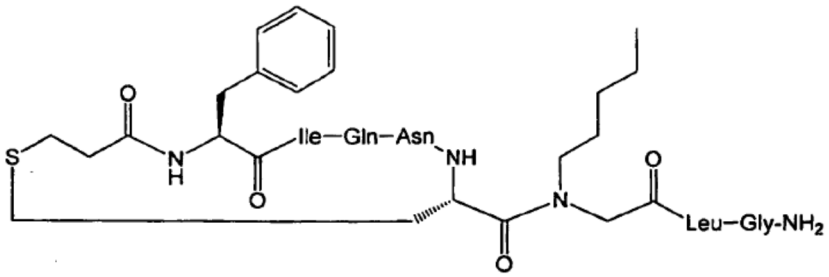
Compuesto 36



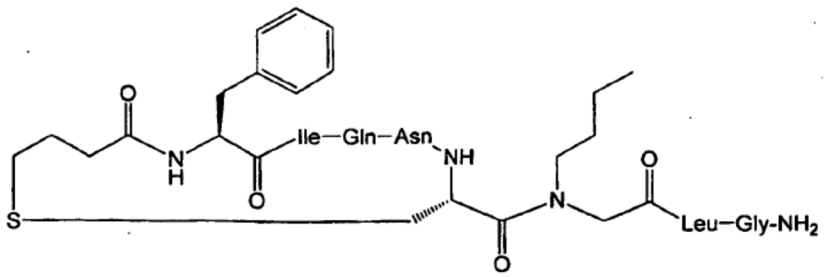
Compuesto 39



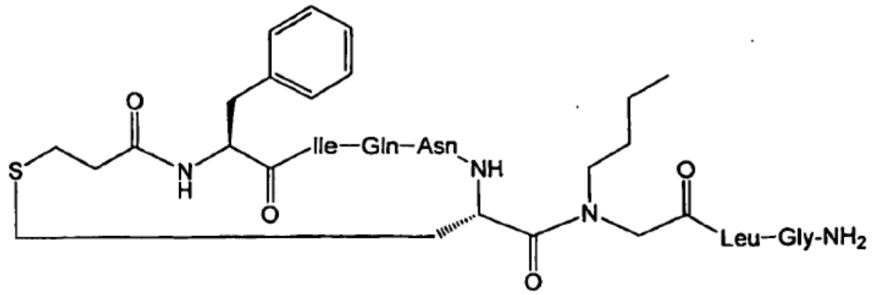
Compuesto 40



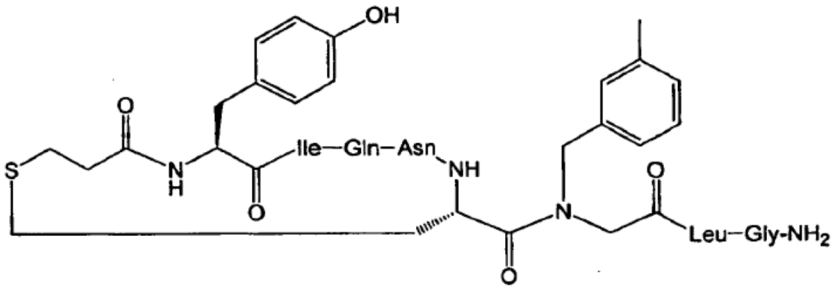
Compuesto 41



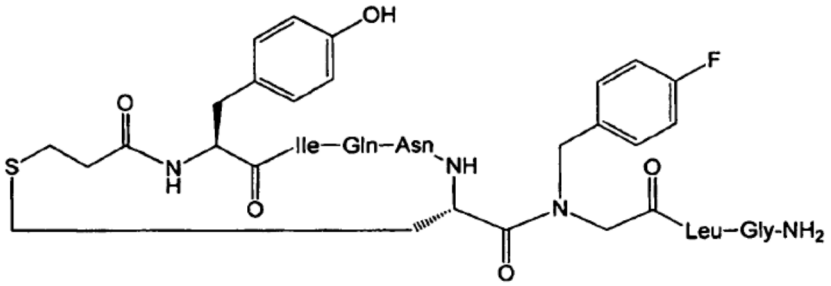
Compuesto 42



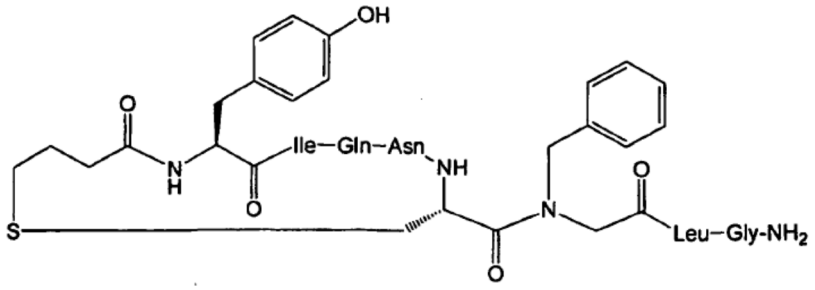
Compuesto 44



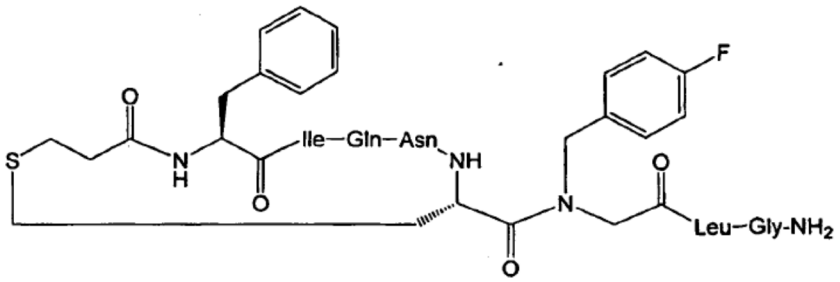
Compuesto 45



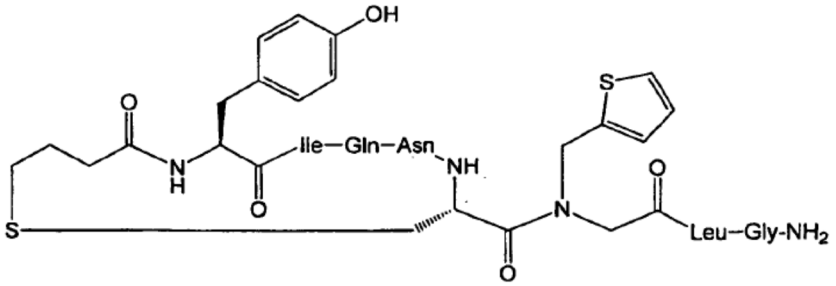
Compuesto 46



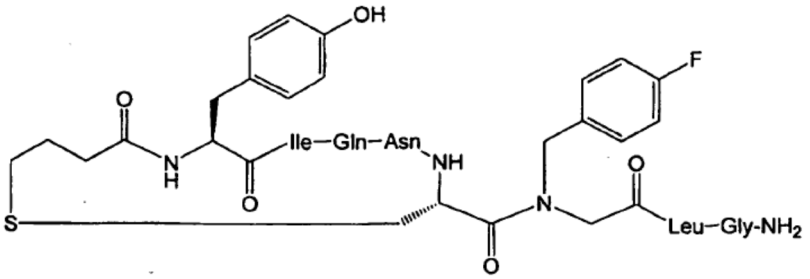
Compuesto 47



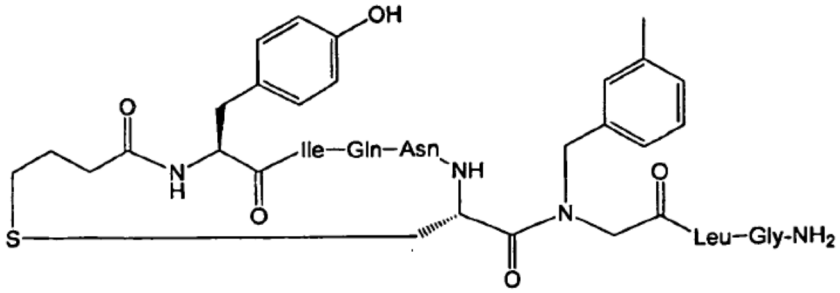
Compuesto 48



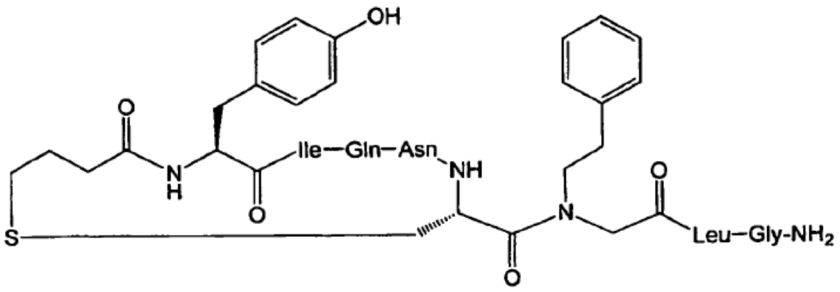
Compuesto 49



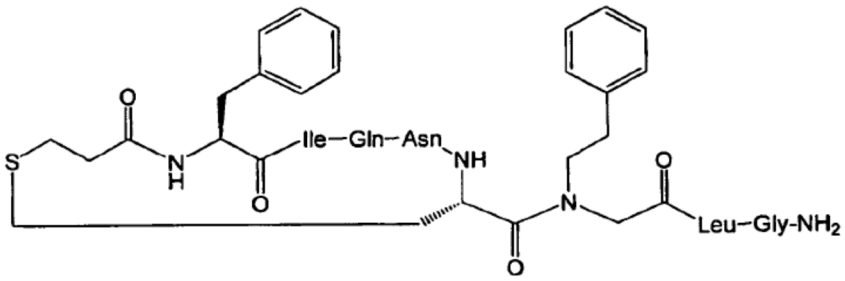
Compuesto 50



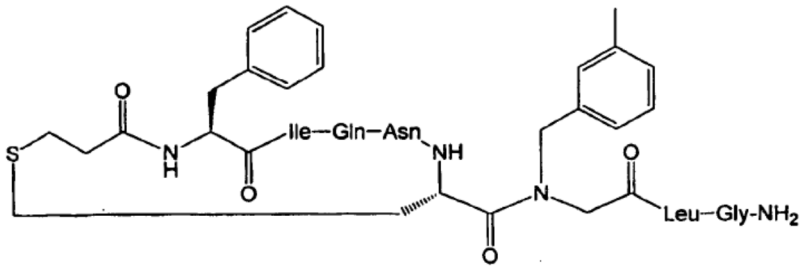
Compuesto 51



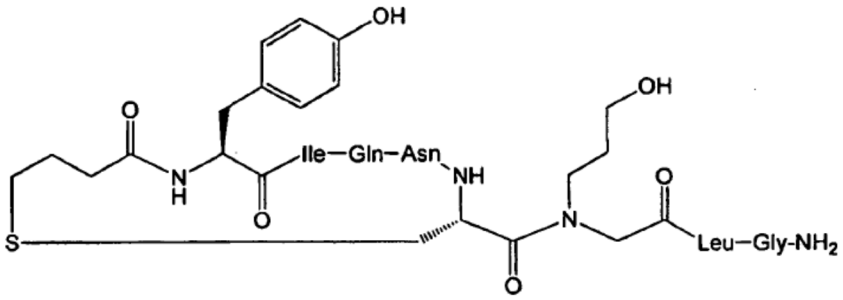
Compuesto 52



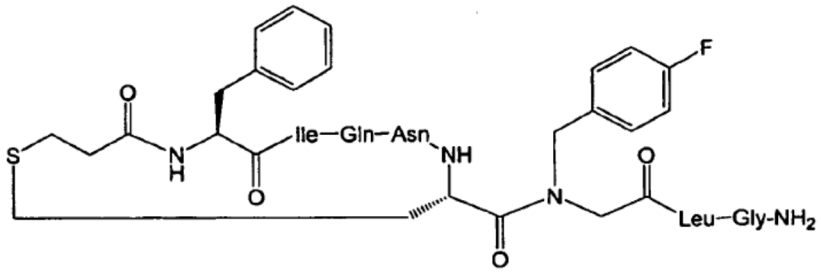
Compuesto 53

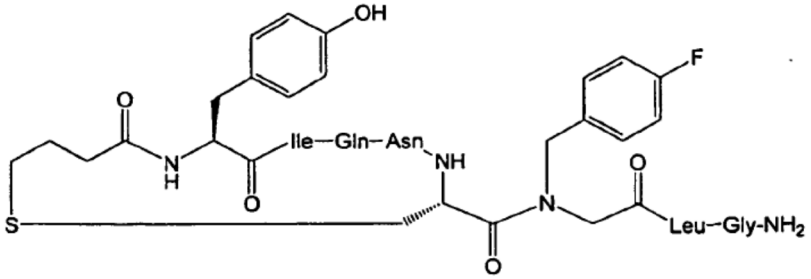


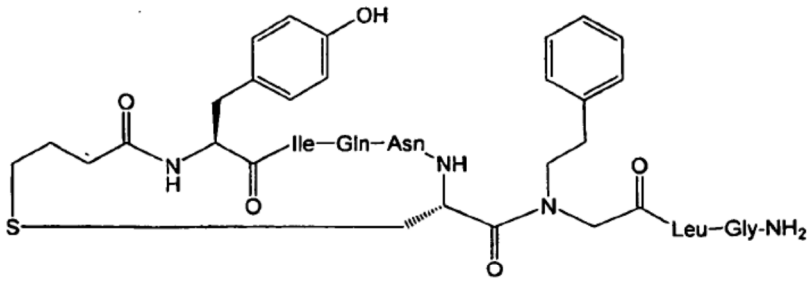
Compuesto 54

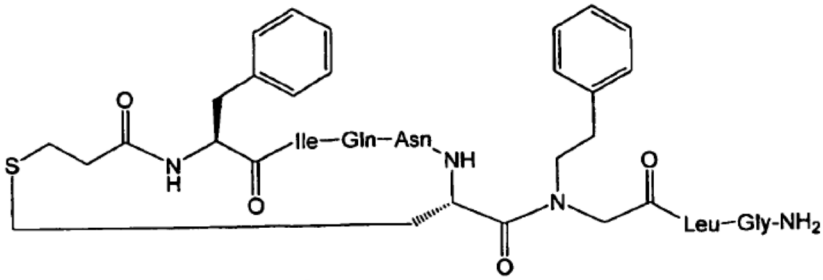


2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

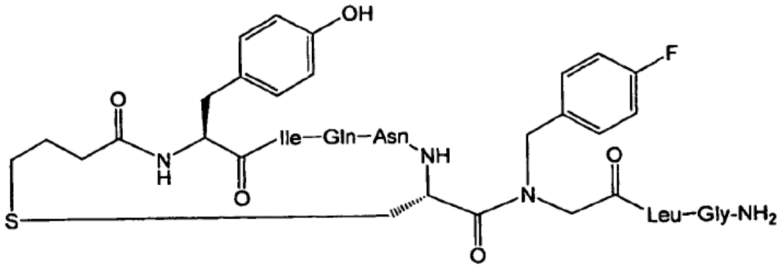








3. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como un fármaco.

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 como principio activo junto con un adyuvante, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de uno o más de afecciones de lactancia alterada, deterioro de la inducción del parto, afecciones de atonía uterina, hemorragia excesiva, inflamación, dolor, dolor abdominal, dolor de espalda, disfunción sexual masculina y femenina, síndrome del intestino irritable (SII), estreñimiento, obstrucción gastrointestinal, autismo, estrés, ansiedad, depresión, trastorno de ansiedad, pérdida quirúrgica de sangre, hemorragia puerperal, cicatrización, infección, mastitis, deterioro en la expulsión de la placenta y osteoporosis.

7. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones de lactancia alterada, deterioro de la inducción del parto, afecciones de atonía uterina, hemorragia excesiva, inflamación, dolor, dolor abdominal, dolor de espalda, disfunción sexual masculina y femenina, síndrome del intestino irritable (SII), estreñimiento, obstrucción gastrointestinal, autismo, estrés, ansiedad, depresión, trastorno de ansiedad, pérdida quirúrgica de sangre, hemorragia puerperal, cicatrización, infección, mastitis, deterioro en la expulsión de la placenta y osteoporosis.