

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 634**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08787073 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2324047**

54 Título: **Peptidomiméticos fijados por plantilla**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2015

73 Titular/es:

**POLYPHOR AG (50.0%)
Hegenheimermattweg 125
4123 Allschwil, CH y
UNIVERSITÄT ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROBINSON, JOHN ANTHONY;
MÖHLE, KERSTIN;
SEITZ, MARKUS;
MAILLARD, LUDOVIC T.;
MOUNME, ROBA;
GOMBERT, FRANK OTTO;
SELLIER-KESSLER, ODILE;
HENZE, HEIKO;
OBRECHT, DANIEL;
BISANG, CHRISTIAN y
LEDERER, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 537 634 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

Peptidomiméticos fijados por plantilla

5 La presente invención da a conocer peptidomiméticos de horquilla-beta fijados por plantilla que incorporan una cadena fijada por plantilla de 8 residuos de alfa-aminoácidos, que dependiendo de sus posiciones en la cadena, son Gly o Pro de ciertos tipos, tales como se define más adelante. Estos miméticos de horquilla-beta fijados por plantilla tienen actividad agonística o antagonista contra una tensina II, un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Además, la presente invención da a conocer un eficiente proceso sintético por el que estos compuestos, en caso deseado, pueden ser preparados en formato paralelo de biblioteca.

Muchos procesos biológicos médicamente significativos son mediados por transducción de señal que involucra los GPCR. La familia de los GPCR, comprende receptores para hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y virus (Th. Klabunde, G. Hessler, ChemBioChem 2002 3, 928-44). Para 210 receptores se conoce el ligando natural, otros 150, los llamados receptores huérfanos, han sido identificados dentro del genoma humano, pero su función (pato)fisiológica es desconocida (A. Wise, S.C. Jupe, S. Rees, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004, 44, 43-66).

Los GPCR pueden ser agrupados en tres familias principales: familia A (familia tipo rodopsina o similares a adrenérgico), familia B (parecidos a receptores de glucagon o de la familia similar a receptores de secretina) y familia C (receptores metabotrópicos de glutamato). Dentro de cada familia de receptores se conserva un determinado modelo de secuencia (la llamada huella dactilar) y varias características estructurales más allá de la topología de membrana compartida de modo general (T.K. Attwood, Trends Pharmacol. Sci. 2001, 22, 165-65). La familia A es de forma destacada la clase más grande. Los GPCR están unidos a membrana y se caracterizan por un dominio de siete separadores de hélice de transmembrana conservados. Como primera estructura GPCR en resolución atómica se dio a conocer la estructura 3D de rodopsina de bovino por cristalografía de rayos X (K. Palczewsky y otros Science 2000, 289, 739-45). Basándose en esta estructura se ha informado de varios modelos para otros GPCR utilizando modelado por homología (M.C. Gershengorn y otros Endocrinology 2001, 142, 2-10; S. Shacham y otros Med. Res. Rev. 2001, 21, 472-83). Recientemente, la estructura cristalina del GPCR β_2 -adrenérgico humano ha sido publicada (S.G. Rasmussen y otros Nature 2007, 450, 383-387).

Si bien a lo largo de los últimos 15 años, se han introducido en el mercado satisfactoriamente cerca de 350 agentes terapéuticos dirigidos a receptores de GPCR (Th. Klabunde, G. Hessler, ChemBioChem 2002, 3, 928-44; G. Vauquelin y otros Fundam. Clin. Pharmacol. 2005, 19, 45-56), es necesario investigar varios problemas toxicológicos que se han presentado principalmente por falta de selectividad de algunos de estos medicamentos. El documento WO0232932 da a conocer un agonista cíclico de urotensina II. Evidentemente existe una necesidad de nuevos compuestos para el tratamiento o prevención de enfermedades incluyendo, sin que ello sea limitativo, infecciones, cáncer, alergias, enfermedades cardiovasculares y periféricas y del sistema nervioso central.

Factores de transcripción son mediadores centrales de la transducción de señal. La manipulación de su actividad por pequeñas moléculas es un área que emerge rápidamente tanto de la biología química como del descubrimiento de medicamentos (D. Ghosh, A.G. Papavassilou, Curr. Med. Chem. 2005, 12, 691). Una clase de factores de transcripción contiene transductor de señal y activador de proteínas de transcripción (STAT), involucrados en muchos eventos relevantes biológicos y médicos, por ejemplo, muerte celular programada, organogénesis, inmunidad nativa y adaptativa o regulación del crecimiento celular (C.M. Horvath, TiBS, 2000, 25, 496). Los factores de transcripción llevan a cabo su función solos o reclutando componentes de los sistemas de transcripción para activar la transcripción. Un tipo de estos componentes son los coactivadores transcripcionales.

Muchos medicamentos ejercen sus efectos a través de factores de transcripción de los que aproximadamente 900 están asociados con enfermedades conocidas. Si bien factores de transcripción son agentes principales en la patogénesis de enfermedades, la complejidad de la biología de regulación transcripcional presenta todavía retos en el descubrimiento de nuevos medicamentos y también en el diseño de terapias que se dirigen directamente a moléculas involucradas en el proceso de transcripción. Dado que la especificidad de moduladores juega un papel crucial dentro de las intervenciones terapéuticas, también existe una clara necesidad de nuevos compuestos para el tratamiento o prevención de enfermedades incluyendo, sin que ello sea limitativo, varios tipos de cáncer, tales como leucemia promielocítica aguda, cáncer de seno, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, metastasis, enfermedades autoinmunes tales como hiperreactividad de las vías aéreas (AHR), inflamación eosinófila, producción de mucosidad, asma, enfermedades neurodegenerativas, restinosis y parásitos gastrointestinales nemátodos.

Se describe un nuevo enfoque general para descubrir ligandos potentes selectivos y transformables en medicamentos para los GPCR y moduladores de factores y coactivadores transcripcionales. Dentro del alcance de la presente invención, este enfoque es particularmente adecuado para descubrir ligandos para GPCR peptidérgicos y también como coactivadores transcripcionales.

Algunos de las interacciones ligandos/receptores de GPCR peptidérgicos de relevancia terapéutica son los siguientes:

5 Somatostatina (A.V. Schally y otros, Cell. Mol. Life Sci. 2004, 61, 1042-68) neuroquininas, neurotensinas (W. Rostène y otros Encyclop. Biol. Chem. 2004, 3, 3236; M. Boules y otros Expert. Opin. Investig. Drugs 2005, 14, 359-69; P. Kitabgi, Curr. Opin. Drug Disc. Devel. 2002, 5, 764-76), bradiquininas (F. Marceau y otros Nat. Rev. Drug Disc. 2004, 3, 845-52), vasopresinas (M. Ashton y otros Comb. Chem. And High Throughput Screening 2004, 7, 441-53), taquiquininas, bombesinas (E.R. Spindel y otros Recent Progress in Hormone Research 1993, 48, 365-91; R.T. Jensen y otros Growth Factors, Peptides and Receptors, p. 225-237, Ed. By T. W. Moody, Plenum Press, New York, 1993; A.V. Schally y otros Cell. Mol. Life Sci. 2004, 61, 1042-68), endotelinas (G. Ertl y otros Drugs 2004, 64, 1029-40), urotensina II (F.D. Russell, Pharmacol. Ther. 2004, 103, 223-43), GH-RH (A.V. Schally y otros Cell. Mol. Life Sci. 2004, 61, 1042-68), ghrelina (A.V. Schally y otros Cell. Mol. Life Sci. 2004, 61, 1042-68; E. Ghio y otros Clin. Endocrinol. 2005, 62, 1-17), melanocortinas (B.G. Irani y otros Curr. Pharm. Des. 2004, 10, 3443-79), péptido similar a glucagon 1 (GLP-1, C.J. Small y otros Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord. 2004, 3, 379-88) péptido YY (PYY, C.J. Small y otros Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord. 2004, 3, 379-88), VIP (A.V. Schally y otros Cell. Mol. Life Sci. 2004, 61, 1042-68), y receptores 1 y 2 activados por proteasa (PAR-1 y 2, H.G. Selnick y otros Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents 2003, 1, 47-59; V.S. Ossovskaya y otros Physiol. Rev. 2004, 84, 579-621; A.M. Coelho y otros Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents 2003, 1, 61-72; M. Steinhoff y otros Endocrin. Rev. 2005, 26, 1-43).

20 Algunos de las interacciones de factor de transcripción/coactivador transcripcional que tienen relevancia terapéutica son:

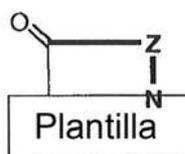
25 HIF-1alfa/p300 (A.L. Kung, S.D. Zabludoff, D.S. Francia y otros Cancer Cell 2004, 6, 33) Tcf4/beta-catenina (M. Lepourcelet, Y.N.P. Chen, D.S. Francia y otros Cancer Cell 2004, 5, 91), ERalfa/SRC-2, ERbeta/SRC-2, TRbeta/SRC-2 (T.R. Geistlinger, R.K. Guy, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6852), ESX/Sur2 (H. Shimogawa, Y. Kwon, Q. Mao y otros J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 3461).

30 En los compuestos que se describen más adelante, se introduce una nueva estrategia para estabilizar conformaciones de horquilla-beta en peptidomiméticos de armazón ("backbone-turn") que muestran actividad agonista o antagonista selectiva contra urotensina II. Esto comporta el transplante de la secuencia de horquilla a una plantilla cuya función consiste en restringir el núcleo de bucle del péptido en geometría de horquilla.

35 Los peptidomiméticos de horquilla unidos por plantilla han sido descritos en la bibliografía (D. Obrecht, M. Altorfer, J.A. Robinson, Adev. Med. Chem. 1999, 4, 1-68; J.A. Robinson, Syn. Lett. 2000, 4, 429-441), pero estas moléculas no han sido previamente evaluadas o dadas a conocer para desarrollo de actividad agonista o antagonista contra urotensina II. No obstante, la capacidad de generar peptidomiméticos de horquilla-beta utilizando métodos de síntesis combinatorios y paralelos ha sido establecida en la actualidad (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J.A. Robinson, Helv. Chim. Acta 2000, 83, 3097-3112). Estos procedimientos permiten la síntesis y cribado de grandes librerías de miméticos de horquilla, lo que ha su vez facilita considerablemente estudios estructura-actividad y, por lo tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas con potente actividad agonista o antagonista.

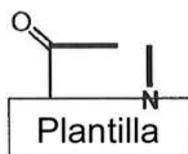
45 Los peptidomiméticos de horquilla-beta obtenidos por el enfoque descrito son útiles para el tratamiento de enfermedades renales, diabetes, disfunción cardiovascular, inflamaciones y también enfermedades alérgicas de las vías aéreas, tales como rinitis y asma alérgica.

Los peptidomiméticos de horquilla-beta de la presente invención son compuestos por fórmula general



(I)

50 en la que



es ^DPro-^LPro, ^DSer-^Lpro o ^DGlu-^Lpro y

Z es una cadena de 8 residuos de alfa-aminoácidos, siendo contadas las posiciones de dichos residuos de aminoácidos en dicha cadena empezando del aminoácido en el terminal-N, de manera que estos residuos de aminoácidos son, dependiendo de su posición en la cadena,

5

- P1: Asp;
- P2: Cys;
- P3: Phe, Tyr;
- P4: Trp, ^DTrp;
- P5: Lys, Orn;
- P6: Tyr;
- P7: Cys,
- P8: Cha, Leu, Val; y
- Cys a P2 y P7 pueden formar un puente de bisulfuro,

10

15

y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

De acuerdo con la presente invención, estos peptidomiméticos de horquilla-beta pueden ser preparados por un procedimiento que comprende

20

(a) acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posiciones 3, 4, ó 5, protegiéndose igualmente de manera apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

25

(b) retirando el grupo N-prottegido del producto obtenido de este modo;

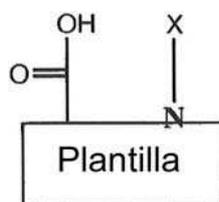
(c) acoplando el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido, que en el producto final deseado se encuentra más próximo en una posición al residuo de aminoácido N-terminal, siendo igualmente protegido de manera apropiada, cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

30

(d) eliminando el grupo N-prottegido del producto obtenido de este modo;

(e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que se ha introducido el residuo de aminoácido N-terminal;

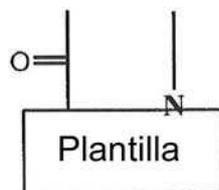
(f) acoplar el producto obtenido de este modo con un compuesto de fórmula general



II

35

en la que



40

es el definido en la reivindicación 1 y X es un grupo N-prottegido o, alternativamente,

(fa) acoplar el producto obtenido en la etapa (e) con un derivado apropiadamente N-prottegido de un aminoácido de fórmula general

45



o



50

en las que B y A son los definidos en la reivindicación 1, siendo igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(fb) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo; y
 (fc) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de un aminoácido de la anterior fórmula general IV o fórmula

5



en la que B3 es tal como se ha definido en la reivindicación 1

10 y, respectivamente, fórmula III, protegiendo igualmente de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(g) eliminado el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) o (fc);

(h) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 8, siendo adecuadamente protegido asimismo cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

15

(i) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

(j) acoplado el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido, que en el producto final se encuentra una posición más lejos de la posición 8, siendo asimismo adecuadamente protegido cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

20

(k) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

(l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que se han introducido todos los residuos de aminoácido;

(m) en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente los grupos reactivos liberados de este modo;

25

(n) en caso deseado, formar un enlace entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácido apropiados en las posiciones 2 y 7;

(o) desacoplar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;

(p) ciclizar el producto separado del soporte sólido;

30

(q) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en el caso deseado, cualesquiera grupos protectores que puedan encontrarse presentes en la molécula; y

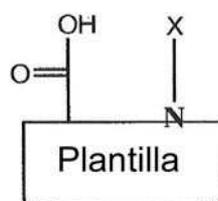
(r) en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal distinta farmacéuticamente aceptable.

35

Alternativamente, los peptidomiméticos de la presente invención pueden ser preparados por

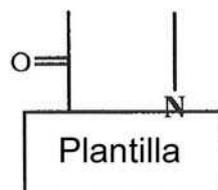
(a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general

40



II

en el que



45

es el que se define en la reivindicación 1 y X es un grupo N-protector o, alternativamente,

(a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido de un aminoácido de fórmula general

50



o

HOOC-A-H

IV

5

en la que B y A son los definidos en la reivindicación 1, habiendo sido igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(a'b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo; y

10 (a'c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de un aminoácido de la anterior fórmula general IV o

HOOC-B3-H

V

15

en la que B3 es el definido en la reivindicación 1

y, respectivamente, fórmula III, habiendo sido adecuadamente protegido también cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(b') eliminando el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (a') o (a'c)

20 (c') acoplar el producto obtenido de esta manera con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 8, cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido siendo igualmente protegido de manera apropiada;

(d') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

25 (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más allá de la posición 8, siendo adecuadamente protegido también cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(f) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

30 (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que se han introducido todos los residuos de aminoácidos;

(h') en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;

(i') formar en caso deseado un enlace entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas 2 y 7;

35 (j') desacoplar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;

(k') ciclizar el producto separado del soporte sólido;

(l') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en el caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que pueden encontrarse adicionalmente presentes en la molécula; y

40 (m') en caso deseado, convertir el producto obtenido de esta manera en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre de fórmula I o en una sal diferente farmacéuticamente aceptable.

45 Los peptidomiméticos de la presente invención pueden ser también enantiómeros de los compuestos de fórmula I. Estos enantiómeros pueden ser preparados por una modificación de los procedimientos anteriores en los que se utilizan enantiómeros de todos los materiales quirales de partida.

50 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "alquilo", solo o en combinación, designa radicales de hidrocarburos saturados de cadena recta o ramificada que tienen hasta 24 átomos de carbono, preferentemente hasta 12 átomos de carbono. De manera similar, el término "alquenilo" indica radicales de hidrocarburos de cadena recta o ramificada que tienen hasta 24 átomos de carbono, preferentemente hasta 12 átomos de carbono y que contienen, como mínimo uno, dependiendo de la longitud de la cadena hasta cuatro dobles enlaces olefinicos. El término "inferior" indica radicales y compuestos que tienen hasta 6 átomos de carbono. Así, por ejemplo, los términos "alquilo inferior" y "cicloalquilo inferior" indican radicales de hidrocarburo saturados, de cadena recta o ramificada y respectivamente cíclicos, que tienen hasta 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec.-butilo, isobutilo, tert.-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. El término "arilo" indica radicales hidrocarburo carbocíclicos aromáticos que contienen uno o dos anillos de seis miembros, tales como fenilo o naftilo, que pueden estar sustituidos por hasta tres sustituyentes tales como Br, Cl, F, CF₃, NO₂, alquilo inferior o alquenilo inferior. El término "heteroarilo" designa radicales heterocíclicos aromáticos que contienen uno o dos anillos de cinco o seis miembros, conteniendo por lo menos uno de ellos hasta tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, S y N y estando dichos anillos opcionalmente sustituidos; indicándose a continuación en relación con la definición de R", ejemplos representativos de dichos radicales heteroarilo opcionalmente sustituidos.

65 La conformación horquilla-beta es altamente relevante para la actividad agonista o antagonista contra urotensina II de los miméticos de horquilla-beta de la presente invención. Las propiedades de conformación estabilizante de

horquilla-beta de las plantillas juegan un papel principal, no solamente en cuanto a las actividades selectivas descritas anteriormente, sino también para el proceso de síntesis definido anteriormente, dado que la incorporación de las plantillas en el inicio o cerca de la parte media de los precursores de péptidos lineales protegidos incrementa los rendimientos de la ciclización de manera significativa.

5 Tal como se ha mencionado anteriormente, son posiciones para enlaces entre hebras P2 y P7; consideradas conjuntamente. Estos enlaces entre hebras se sabe que estabilizan las conformaciones horquilla-beta y, por lo tanto, constituyen un importante elemento estructural para el diseño de miméticos de horquilla-beta.

10 Los residuos de aminoácidos más preferentes en la cadena Z son los derivados de alfa-aminoácidos naturales. A continuación, se adjunta una lista de aminoácidos que son adecuados, o lo son sus residuos, para los objetivos de la presente invención, correspondiendo las abreviaturas a la práctica habitual generalmente aceptada.

Código de tres letras		Código de una letra
Ala	L-Alanina	A
^D Ala	D-Alanina	^D A
Arg	L-Arginina	R
Asn	L-Asparagina	N
Asp	Ácido L-Aspártico	D
Cha	L-3-Ciclohexilalanina	
Cys	L-Cisteína	C
Glu	Ácido L-Glutámico	E
Glu(cHx)	Ácido L-Glutámico ciclohexil éster	
Gln	L-Glutamina	Q
Gly	Glicina	G
His	L-Histidina	H
Ile	L-Isoleucina	I
Leu	L-Leucina	L
Lys	L-Lisina	K
Met	L-Metionina	M
Orn	L-Ornitina	
Phe	L-Fenilalanina	F
Pro	L-Prolina	P
Dpro	D-Prolina	DP
Ser	L-Serina	S
Thr	L-Threonina	T
Trp	L-Triptofano	W
^D Trp	D-Triptofano	^D W
Trp(6Cl)	6-Cloro-L-Triptofano	
Tyr	L-Tirosina	Y
Val	L-Valina	V

15 La cadena peptídica **Z** dentro de los miméticos de horquilla beta de la invención comprende 8 residuos de aminoácidos. Las posiciones P1 a P8 de cada uno de los residuos aminoácidos de la cadena **Z** están definidas en manera inequívoca del modo siguiente: P1 representa el primer aminoácido de la cadena **Z** que está acoplado por su terminal N al terminal C de las plantillas ^DPro-LPro, ^DSer-LPro o ^DGlu-LPro; y P8 representa el último aminoácido de la cadena Z que está acoplado por su terminal C al terminal N de dichas plantillas.

20 Para los β-peptidomiméticos que tienen actividad agonista o antagonista contra urotensina II, los residuos de alfa-aminoácidos en las posiciones 1 a 8 de la cadena Z son:

- 25 - P1: Asp;
 - P2: Cys;
 - P3: Phe, Tyr;
 - P4: Trp, ^DTrp;
 - P5: Lys, Orn;

- 30 - P6: Tyr;
 - P7: Cys,
 - P8: Cha, Leu, Val; y
 Cys a P2 y P7 puede formar un puente de bisulfuro.

35 Los beta-peptidomiméticos especialmente preferentes de la invención incluyen los descritos en los Ejemplos 31 y 32.

Los procedimientos de la invención pueden ser llevados a cabo ventajosamente como síntesis en paralelo para conseguir bibliotecas de peptidomiméticos de horquilla-beta fijados por plantilla de la anterior fórmula general I. Estas síntesis paralelas permiten obtener conjuntos de numerosos compuestos (normalmente de 12 a 192, de

manera típica 96) de fórmula general I con altos rendimientos y purezas definidas, minimizando la formación de subproductos dímeros y polímeros. La elección adecuada del soporte sólido funcionalizado (es decir, soporte sólido más molécula enlazadora), plantillas y lugar de ciclización juegan papeles clave.

5 El soporte sólido funcionalizado es derivado convenientemente de poliestireno reticulado preferentemente con 1-5% de divinilbenceno; poliestireno recubierto con separadores de polietilén glicol (Tentagel[®]); y resinas de poli(acrilamida (ver también D. Obrecht, J.-M. Villalgordo. "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries", Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

10 El soporte sólido está funcionalizado por medio de un enlazador, es decir, una molécula separadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para fijación al soporte sólido y en el otro extremo un grupo funcional segmentable selectivamente, utilizado para las siguientes transformaciones químicas y procesos de segmentación. Para los objetivos de la presente invención, se pueden utilizar dos tipos de enlazadores:

15 Los enlazadores de tipo 1 están diseñados para liberar el grupo amida en condiciones ácidas (H. Rink, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3783-3790). Los enlazadores de este tipo forman amidas del grupo carboxilo de los aminoácidos; se incluyen entre los ejemplos de resinas funcionalizadas por estas estructuras enlazadoras resina 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] PS, 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido)aminometil]-4-metilbencidrilamina PS (amida Rink MBHA Resina PS), y resina 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxi-acetamido) aminometil] bencidrilamina resina PS (amida Rink BHA resina PS). Preferentemente, el soporte es derivado de poliestireno reticulado de modo más preferente con 1-5%, de divinilbenceno y funcionalizado por medio del enlazador 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido).

25 Los enlazadores de tipo 2 están diseñados para liberar eventualmente el grupo carboxilo en condiciones ácidas. Los enlazadores de este tipo forman ésteres lábiles a los ácidos con el grupo carboxilo de los aminoácidos, usualmente el bencilo lábil a los ácidos, bencidril y tritilo ésteres; incluyendo entre los ejemplos de dichas estructuras enlazadoras 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (enlazador Sasrin[®]), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink), ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB), tritilo y 2-clorotritilo. Preferentemente, el soporte se deriva de poliestireno reticulado de modo más preferente con 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado por medio del enlazador de 2-clorotritilo.

30 Cuando se llevan a cabo en forma de síntesis en paralelo los procesos de la invención pueden ser llevados a cabo ventajosamente tal como se describe más adelante, pero se observará de manera inmediata por los técnicos en la materia la forma en que estos procedimientos tendrán que ser modificados en el caso de que se desee sintetizar un único compuesto de la anterior fórmula I.

35 Una serie de recipientes de reacción (normalmente de 12 a 192, de manera típica 96) igual al número total de compuestos a sintetizar por el procedimiento paralelo son cargados con 25 a 1000 mg, preferentemente 60 mg, del soporte sólido apropiadamente funcionalizado, preferentemente de 1 a 3% de poliestireno reticulado o resina Tentagel.

40 El disolvente a utilizar debe ser capaz de hinchar la resina e incluye, sin que ello sea limitativo, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF, N-metilpirrolidona (NMP, dioxano, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), isopropilalcohol y similares. Las mezclas de disolvente se contienen en funciones de, como mínimo, un componente un disolvente polar (por ejemplo, 20% TFE/DCM, 35% THF/NMP) son beneficiosos para asegurar una elevada reactividad y solvatación de las cadenas de péptidos unidas a la resina (G.B. Fields, C.G. Fields, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4202-4207).

45 Con el desarrollo de varios enlazadores que liberan el grupo de ácido carboxílico del terminal C en condiciones débilmente ácidas, que no afectan a grupos lábiles a los ácidos, que protegen grupos funcionales de las cadenas laterales, se han hecho considerables avances en las síntesis de fragmentos de péptidos protegidos. El enlazador derivado de 2-metoxi-4-hidroxibencilalcohol (enlazador Sasrin[®], Merger y otros Tetrahedron Lett. 1988, 29 4005-4008) puede ser segmentado con ácido trifluoroacético diluido (0,5-1% TFA en DCM) y es estable a las condiciones de desprotección Fmoc durante las síntesis del péptido. Los grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu son compatibles con este esquema de protección. Otros enlazadores adecuados para el proceso de la invención incluyen el enlazador super lábil a los ácidos 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink, H. Rink, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787-3790), en el que la eliminación del péptido requiere 10% de ácido acético en DCM o 0,2% de ácido trifluoroacético en DCM; el enlazador derivado de ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB, Flörsheimer & Riniker, Peptides 1991, 1990 131) que es segmentado también con 1%TFA/DCM para proporcionar un fragmento de péptido que contiene todos los grupos protectores de cadenas laterales lábiles a los ácidos; y, en particular, el enlazador de 2-clorotritilcloruro (Barlos y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946), que permite el desacoplamiento del péptido utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 min.

65 Son grupos protectores adecuados para aminoácidos y, respectivamente para sus residuos, por ejemplo,

- para el grupo amino (tal como se encuentra presente, por ejemplo, también en la cadena lateral de la lisina)

5	Cbz	benciloxicarbonilo
	Boc	tert.-butiloxicarbonilo
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	Alloc	aliloxicarbonilo
	Teoc	trimetilsililetoxicarbonilo
	Tcc	tricloroetoxicarbonilo
10	Nps	o-nitrofenilsulfonilo;
	Trt	trifenilmetil o tritilo;

- para el grupo carboxilo (tal como se encuentra presente, por ejemplo, también en la cadena lateral del ácido aspártico y el ácido glutámico) por conversión en ésteres con los componentes de alcohol

15	tBu	tert.-butilo
	Bn	bencilo
	Me	metilo
	Ph	fenilo
20	Pac	fenacilo
		Alilo
	Tse	trimetilsililetilo
	Tce	tricloroetilo;

25 - para el grupo guanidino (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de la arginina)

	Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo;
	Ts	tosil (es decir, p-toluenesulfonil);
	Cbz	benciloxicarbonilo;
30	Pbf	pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo;

- para el grupo hidroxilo (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de treonina y serina)

35	tBu	tert.-butilo;
	Bn	bencilo;
	Trt	tritilo;

- y para el grupo mercapto (tal como se encuentra presente, por ejemplo en la cadena lateral de cisteína)

40	Acm	acetamidometilo;
	tBu	tert.-butilo;
	Bn	bencilo;
	Trt	tritilo; y
	Mtr	4-metoxitritilo

45 Los derivados del aminoácido 9-fluorenilmetoxicarbonilo-(Fmoc)-protegido son utilizados preferentemente como bloques constituyentes para la construcción de los miméticos de bucle de horquilla-beta fijados por plantilla de fórmula I. Para la desprotección, es decir, segmentación del grupo Fmoc, se puede utilizar 20% piperidina en DMF o 2% DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene)/2% piperidina en DMF.

50 La cantidad de reactivo, es decir, del derivado de aminoácido, es usualmente de 1 a 20 equivalentes basándose en miliequivalentes por gramo (meq/g) de carga del soporte sólido funcionalizado (típicamente 0,1 a 2,85 meq/g para resinas de poliestireno) pesadas originalmente en el tubo de reacción. Se pueden utilizar equivalentes adicionales de reactivos, en caso necesario, para llevar la reacción a su terminación en un tiempo razonable. Las estaciones de trabajo preferentes (no obstante, sin limitación) son la estación Labsource's Combi-chem, Protein Technologies' Symphony y el sintetizador MultiSyn de Tech's-Syro, este último equipado adicionalmente con una unidad de transferencia y una caja de depósito durante el proceso de desacoplamiento del péptido lineal completamente protegido con respecto al soporte sólido. Todos los sintetizadores son capaces de proporcionar un ambiente controlado; por ejemplo, se pueden conseguir reacciones a temperaturas distintas de la temperatura ambiente y también en atmósfera de un gas inerte en caso deseado.

65 La formación de enlaces amida requiere la activación del grupo alfa-carboxilo para la etapa de acilación. Cuando se lleva a cabo esta activación por medio de las habitualmente utilizadas carbodiimidas, tal como dicitohexilcarbodiimida (DCC, Sheehan & Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067-1068) o diisopropilcarbodiimida (DIC, Sarantakis y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 73, 336-342), la dicitohexilurea y, respectivamente la diisopropilurea resultantes son respectivamente insoluble y soluble en los disolventes utilizados

de modo general. En una variante del método de la carbodiimida se incluye 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, Köning & Geiger, Chem. Ver 1970, 103, 788-798) como aditivo a la mezcla de acoplamiento. El HOBt impide deshidratación, suprime la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las reacciones de acoplamiento lentas. Algunos reactivos de fosfonio han sido utilizados como reactivos de acoplamiento directos, tales como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP, Castro y otros Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis 1976, 751-752), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-BOP, Coste y otros Tetrahedron Lett. 1990, 31, 205-208), o tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TB-TU), o hexafluorofosfato (HBTU, Knorr y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930); estos reactivos de fosfonio son también adecuados para formación in situ de ésteres de HOBt con los derivados de aminoácidos protegidos. Más recientemente se han utilizado también como reactivos de acoplamiento difenoxifosforil azida (DPPA) o tetrafluoroborato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N'-tetrametiluronio (TATU) o hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N'-tetrametiluronio (HATU)/7-aza-1-hidroxi benzotriazol (HOAt, Carpino y otros Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281) o tetrafluoroborato de -(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-1,1,3,3-tetrametiluronio (TCTU), o hexafluorofosfato (HCTU, Marder, Shivo and Albericio: HCTU y TCTU: New Coupling Reagents: Development and Industrial Applications, Poster Presentation, Gordon Conference February 2002).

Debido al hecho de que son esenciales reacciones de acoplamiento casi cuantitativas, es deseable tener pruebas experimentales para completar las reacciones. El ensayo de ninhidrina (Kaiser y otros Anal. Biochemistry 1970, 34, 595), en el que una respuesta colorimétrica positiva a una parte alícuota de un péptido unido a la resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, se puede llevar a cabo de manera fácil y rápida después de cada etapa de acoplamiento. La química de Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo Fmoc cuando es liberado con la base (Meienhofer y otros Int. J. Peptide Protein Res. 1979, 13, 35-42).

El intermediario unido a la resina dentro de cada recipiente de reacción es liberando por lavado del exceso de agentes retenidos, disolventes o subproductos por exposición repetitiva a disolvente o disolventes puros por uno de los siguientes métodos:

- 1) Los recipientes de reacción son llenados de disolvente (preferentemente 5 ml), agitados durante un tiempo de 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y escurridos para expulsar el disolvente;
- 2) Los recipientes de reacción son llenados de disolvente (preferentemente 5 ml) y escurridos a un recipiente receptor, tal como un tubo de pruebas o vial.

Ambos procesos de lavado anteriormente descritos se repiten hasta 50 veces (preferentemente unas 10 veces), controlando la eficiencia del reactivo, disolvente y eliminación de subproductos por procedimientos tales como TLC, GC, o inspección de los lavados.

El procedimiento anteriormente descrito de reacción del compuesto unido a resina con reactivos en los tubos de reacción, seguido de la eliminación de exceso de reactivos, subproductos y disolventes se repite con cada transformación sucesiva hasta que se ha obtenido el péptido lineal final unido a resina completamente protegido.

Antes de que este péptido lineal completamente protegido sea desacoplado del soporte sólido es posible, en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de esta forma. A este efecto, el grupo o grupos funcionales en cuestión deben ser protegidos inicialmente por un grupo protector que puede ser eliminado selectivamente sin afectar el resto de grupos protectores presentes. El Alloc (aliloxicarbonilo) es un ejemplo de dicho grupo protector amino que puede ser retirado selectivamente, por ejemplo, mediante Pd⁰ y fenilsilano en CH₂Cl₂, sin afectar el resto de grupos protectores, tales como Fmoc, presentes en la molécula. El grupo reactivo liberado de esta manera puede ser tratado con un agente adecuado para introducir el sustituyente deseado. Así, por ejemplo, un grupo amino puede ser acilado por medio de un agente acilante que corresponde al sustituyente acilo a introducir.

Antes de que este péptido lineal completamente protegido sea desacoplado del soporte sólido es también posible, en caso deseado, formar un enlace entre hebras entre cadenas laterales de residuos apropiados de aminoácidos en las posiciones 2 y 7.

Los enlaces entre hebras y su formación han sido explicados anteriormente en relación con las explicaciones llevadas a cabo con respecto a grupos del tipo H que, por ejemplo, pueden ser puentes de bisulfuro formados por residuos de cisteína y de homocisteína en las posiciones 2 y 7; o bien puentes de lactama formados por residuos de ácido glutámico y ácido aspártico que enlazan ornitina y, respectivamente residuos de lisina, o por residuos de ácido glutámico que enlazan residuos de ácido 2,4-diaminobutírico situados en posiciones 2 y 7 por formación de enlaces amida. La formación de estos enlaces entre hebras, puede ser realizada por procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para la formación de los puentes de bisulfuro se aplica preferentemente una solución de 10 equivalentes de solución de yodo en DMF o en una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH durante 1,5 horas que se repite otras 3 horas con una solución reciente de yodo después de filtrado de la solución de yodo, o en una mezcla de DMSO y solución de ácido acético

con tampón de 5% de NaHCO₃ a pH 5-6 durante 4 horas, o en agua después de ajuste a pH 8 con solución de hidróxido amónico con agitación durante 24 horas, o en una solución de NMP y tri-n-butilfosfina (preferentemente 50 equivalentes).

- 5 Para la formación de puentes de lactama se aplica durante 16 horas una solución de 2 equivalentes de HATU (*N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridina-1-ilmetil]-*N*-metil-metanamino hexafluorofosfato *N*-óxido) en DMF seco y una solución de 4 equivalentes de DIPEA (Diisopropil etilamina) en DMF seco.

10 El desacoplamiento del péptido lineal completamente protegido con respecto al soporte sólido se consigue exponiendo la resina cargada a una solución de un reactivo de segmentación (preferentemente de 3 a 5 ml). El control de la temperatura, la agitación y el control de la reacción se implementan tal como se ha descrito anteriormente. Los recipientes de reacción se conectan mediante una unidad de transferencia con una caja de recipientes que contiene tubos de depósito para recoger eficientemente las soluciones de producto segmentadas. Las resinas que permanecen en los recipientes de reacción son lavadas a continuación de 2 a 5 veces, tal como se ha indicado anteriormente con 3 a 5 ml de un disolvente apropiado para extraer (separar por lavado) la mayor cantidad posible de los productos desacoplados. Las soluciones del producto obtenidas de este modo son combinadas teniendo en cuenta evitar mezclas cruzadas. Las soluciones/extractos individuales son manipulados a continuación según necesidades para aislar los compuestos finales. Las manipulaciones típicas incluyen, sin que ello sea limitativo, la evaporación, concentración, extracción líquido/líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones adicionales en solución.

25 Las soluciones que contienen derivados de péptido lineal completamente protegido que han sido separadas del soporte sólido y neutralizadas con una base son evaporadas. La ciclización es efectuada a continuación en solución utilizando disolventes, tales como DCM, DMF, dioxano, THF y similares. Se pueden utilizar diferentes reactivos de acoplamiento que se han mencionado anteriormente para la ciclización. La duración de la ciclización es de unas 6-48 horas, preferentemente unas 16 horas. El avance de la reacción es seguido, por ejemplo, mediante RP-HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Fase Inversa). A continuación, el disolvente es eliminado por evaporación, y el derivado de péptido cíclico completamente protegido es disuelto en un disolvente no visible con agua, tal como DCM, y las solución es extraída con agua o una mezcla de disolventes visibles en agua, a efectos de eliminar cualquier exceso de reactivo de acoplamiento.

De manera alternativa, el desacoplamiento y desprotección completa del péptido completamente protegido con respecto al soporte sólido se puede conseguir manualmente en recipientes de vidrio.

- 35 Finalmente, el derivado de péptido completamente protegido es tratado con 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS u otra combinación de agentes de barrido para llevar a cabo la segmentación de grupos protectores. El tiempo para la reacción de segmentación es habitualmente de 30 minutos a 12 horas, preferentemente unas 2,5 horas.

Después de desprotección completa se puede utilizar uno de los siguientes procedimientos para continuar el trabajo:

- 40 1) Los volátiles son evaporados hasta estado seco y el péptido en bruto es disuelto en 20% AcOH en agua y extraído con isopropil éter u otros disolventes que son adecuados para ello. La capa acuosa es acogida y evaporada hasta estado seco, y el derivado de péptido cíclico completamente desprotegido de fórmula I es obtenido como producto final;
- 45 2) La mezcla de desprotección completa es concentrada en vacío. Después del precipitado del péptido completamente desprotegido en dietiléter preferentemente 0°C el sólido es lavado hasta 10 veces, preferentemente 3 veces, secado, y el derivado de péptido cíclico completamente desprotegido de fórmula I es obtenido como producto final.

50 Tal como se ha mencionado anteriormente, es por lo tanto posible, en caso deseado, convertir un producto completamente desprotegido de fórmula I obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable conseguido de este modo en un compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de estas operaciones puede ser llevada a cabo por procedimientos bien conocidos en esta técnica.

55 Los materiales plantilla iniciales de fórmula II utilizados en los procedimientos de la invención, por lo tanto, materiales pre-iniciales y la preparación de estos materiales iniciales y pre-iniciales se describen en la solicitud de patente internacional PCT/EP02/01711 de los mismos solicitantes, publicada con el numeral WO 02/070547 A1.

60 Los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser utilizados en un amplio rango de aplicaciones para tratar, en particular (sin que ello sea limitativo) enfermedades renales, enfermedades cardiorrenales, diabetes, inflamación, insuficiencia cardíaca, hipertensión, disfunción endotelial, resistencia a la insulina, hiperglicemia, reacciones alérgicas incluyendo asma y enfermedades atópicas.

65 Estos peptidomiméticos de horquilla-beta pueden ser administrados por sí mismos o se pueden aplicar como formulación apropiada junto con portadores, diluyentes o excipientes bien conocidos en esta técnica.

Se pueden administrar solos, en forma de mezclas de varios de estos peptidomiméticos de horquilla-beta o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos, tales como agentes antiinflamatorios o agentes antimicrobianos o agentes anticáncer o agentes anti HIV.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser fabricados por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de tabletas recubiertas, levigación, emulsificación, encapsulado, retención o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de manera convencional utilizando uno o varios portadores fisiológicamente aceptables, diluyentes excipientes o auxiliares que faciliten el proceso de los peptidomiméticos de horquilla-beta activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende del procedimiento de administración escogido.

15 Para administración tópica, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser formulados como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. Tal como es bien conocido en este sector.

20 Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

25 Para inyecciones, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser formulados en soluciones adecuadas, preferentemente en tampones compatibles fisiológicamente, tales como solución de Hink, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Las soluciones pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión de estabilización y/o dispersantes. De manera alternativa, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden encontrarse en forma de polvo para su combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su utilización.

30 Para administración transmucosal, se utilizan penetrantes apropiados de la barrera a permear en la formulación, tal como es conocido en este sector.

35 Para administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente combinando los peptidomiméticos de horquilla-beta activos de la invención con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en esta técnica. Estos portadores posibilitan la formulación de los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención en forma de tabletas pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, emulsiones, suspensiones, etc., para ingestión oral por el paciente a tratar. Para formulaciones orales, tales como, por ejemplo, materiales en polvo, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados incluyen cargas, tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol, i sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación y agentes de unión. En caso deseado, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Las formas de dosificación sólida pueden ser recubiertas de azúcar o dotadas de recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar.

45 Para preparaciones líquidas tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los portadores adecuados, excipientes o diluyentes incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes de sabor, conservantes, agentes colorantes y similares.

50 Para administración bucal, la composición puede adoptar la forma de tabletas, pastillas, etc. formuladas del modo habitual.

55 Para administración por inhalación, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención son suministrados de manera conveniente en forma de una pulverización aerosol a base de pack presurizado o nebulizador, con la utilización de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso, de un aerosol presurizado la dosis unitaria puede ser determinada facilitando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para utilización en un inhalador o insuflador conteniendo una mezcla en polvo de los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención y una base adecuada de un material en polvo, tal como lactosa o almidón.

60 Los compuestos pueden ser formulados también en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios, junto con bases de supositorios apropiadas, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

65 Además de las formulaciones que se han descrito, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser también formulados como preparados de depósito. Estas formulaciones de actuación a largo plazo, se pueden administrar por implantación (por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Para la fabricación de dichos preparados de depósito, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser formulados con materiales polímeros o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable)

o resinas de intercambios iónico o como sales poco solubles.

Además, se pueden utilizar otros sistemas de suministro farmacéutico, tales como liposomas y emulsiones que son también conocidos en este sector. Ciertos disolventes orgánicos, tales como dimetil sulfóxido, pueden ser utilizados asimismo. Adicionalmente, los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden ser suministrados utilizando sistemas de liberación mantenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han determinado varios materiales de liberación mantenida y son bien conocidos por los técnicos en la materia. Las cápsulas de liberación mantenida pueden liberar, dependiendo de su naturaleza química, los compuestos durante unas pocas semanas o llegando a más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente terapéutico, se pueden utilizar estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Dado que los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención pueden contener residuos cargados, estos pueden ser incluidos en cualquiera de las formulaciones anteriormente descritas como tales sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas libres.

Los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención o composiciones de los mismos, serán utilizados en general en una cantidad efectiva para conseguir el objetivo deseado. Se comprenderá que la cantidad utilizada dependerá de la aplicación específica.

Para administración tópica, se puede determinar la dosis terapéuticamente efectiva utilizando, por ejemplo, los ensayos in vitro facilitados en los ejemplos. Un aspecto ordinario de la materia será capaz de determinar cantidades terapéuticamente efectivas sin excesivas experimentaciones.

Para administración sistémica, la dosis efectiva terapéuticamente puede ser estimada inicialmente por ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración de peptidomimético de horquilla-beta circulante en un rango que comprende el IC_{50} , tal como se ha determinado en el cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de prueba que es letal para el 50% de un cultivo celular). Esta información puede ser utilizada para determinar más exactamente dosis útiles en humanos.

Las dosis útiles pueden ser determinadas a partir de datos in vivo, por ejemplo, modelos de animales, utilizando técnicas bien conocidas en este sector. Un técnico en la materia puede optimizar fácilmente la administración a los humanos, basándose en datos de animales.

Las cantidades de dosificación, se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma de los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Los niveles terapéuticamente efectivos en suero se pueden conseguir administrando dosis múltiples cada día.

En casos de administración local o de toma selectiva, la concentración local efectiva de los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención no se pueden relacionar tal concentración en el plasma. Un técnico en la materia con habilidad ordinaria, será capaz de optimizar terapéuticamente dosificaciones locales efectivas sin experimentación indebida.

La cantidad de peptidomiméticos de horquilla-beta administrados dependerá, desde luego, del paciente tratado, de su peso, de la gravedad de la alteración, de la forma de administración y del criterio del médico que efectúa la prescripción.

Normalmente, una dosis terapéuticamente efectiva de los peptidomiméticos de horquilla-beta que se describen proporcionará beneficios terapéuticos sin provocar toxicidad sustancial.

La toxicidad de los peptidomiméticos de horquilla-beta de la invención puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo determinando el LD_{50} (dosis letal para 50% de la población) o el LD_{100} (dosis letal para 100% de la población). La proporción de dosis entre efecto tóxico y efecto terapéutico es el índice terapéutico. Los compuestos que muestran elevados índices terapéuticos son preferentes. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación, que no es tóxico para su utilización en humanos. La dosificación de peptidomiméticos de horquilla-beta, según la invención se encuentran preferentemente dentro de un rango de concentraciones de circulación que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de un rango que depende de la forma de dosificación utilizada y de la ruta de administración empleada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosis se pueden escoger por cada médico individual teniendo en cuenta el estado del paciente (ver, por ejemplo, Finngl y otros 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1).

Los siguientes Ejemplos explican la presente invención.

Ejemplos

1. Síntesis de péptido

5 *Acoplamiento del primer residuo de aminoácido protegido a la resina*

1 g (1,4 mMol) de resina de 2-clorotritilcloruro (1,4 mMol/g; Barlos y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) se cargó en un matraz seco. La resina fue suspendida en CH₂Cl₂ (5 ml) y se dejó hinchar a temperatura ambiente con la citación constante durante 30 minutos. Se añadió una solución de 0,98 mMol (0,7 eq) del primer residuo de aminoácido adecuadamente protegido (ver más adelante) en CH₂Cl₂ (5 ml) completada por 960 µl (4 eq) de diisopropiletialamina (DIEA). Después de agitar la mezcla de reacción durante 4 horas a 25°C la resina fue filtrada y lavada sucesivamente con CH₂Cl₂ (1x), DMF (1x) y CH₂Cl₂ (1x). Se añadió a la resina una solución de CH₂Cl₂/MeOH/DIEA (17/2/1, 10 ml) y la suspensión fue agitada durante 30 minutos. Después de filtrado la resina fue lavada en el siguiente orden con CH₂Cl₂ (1x), DMF (1x), CH₂Cl₂ (1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (2x), Et₂O (2x) y fue secada en vacío durante 6 horas.

La carga era típicamente de 0,6-0,7 mMol/g.

Se prepararon las siguientes resinas precargadas: resina Fmoc-ProO-clorotritilo, resina de Fmoc-4Hyp2(tBu)O-clorotritilo, resina de Fmoc-OicO-clorotritilo, y resina Fmoc-4Mp1(Trt)O-cloro-tritilo.

La síntesis fue llevada a cabo utilizando un sintetizador de péptidos Syro (MultiSynTech) utilizando un recipiente de reacción 24-96. Se colocó en cada recipiente 0,04 mmoles de la resina anterior y la resina se hinchó en CH₂Cl₂ y DMF durante 15 minutos, respectivamente. Se programaron y se llevaron a cabo los siguientes ciclos de reacción:

25

Etapas	Reactivo	Tiempo
1	DMF, lavado e hinchado	2 x 1 min
2	20% piperidina/DMF	1 x 5 min, 1 x 15 min
3	DMF, lavado	5 x 1 min
4a	5 eq Fmoc aminoácido/DMF + 5 eq HCTU/DMF, 10 eq DIEA	1 x 60 min
5	DMF, lavado	3 x 1 min

La etapa 4 fue repetida una vez.

Si no se indica de otro modo, el acoplamiento final de un aminoácido es seguido de una desprotección de Fmoc aplicando las etapas 1-3 del ciclo de reacción antes descrito.

El siguiente derivado de aminoácido protegido Fmoc tuvo que ser sintetizado antes de su utilización en la síntesis del péptido lineal descrito anteriormente.

35 *Síntesis de L-6-clorotriptofano N-Fmoc-protégido*

(procedimiento modificado de acuerdo con E. Atherton, R. Sheppard, Solid phase peptide synthesis. A practical approach, IRL Press, Oxford, 1989, página 49)

40 **Ciclación y elaboración de péptidos ciclizados en su almacén**

Segmentación del fragmento de péptido completamente protegido

Después de completar la síntesis, se suspendió la resina (0,04 mMol) en 1 ml (0,13 mMol, 3,4 eq) de 1% TFA en CH₂Cl₂ (v/v) durante 3 minutos, se filtró y el filtrado fue neutralizado con 1 ml (0,58 mMol, 14,5 eq) de 10% DIEA en CH₂Cl₂ (v/v). Este procedimiento fue repetido tres veces para asegurar la terminación de la segmentación. El filtrado fue evaporado hasta estado seco y se desprotegió de manera completa una muestra del producto utilizando una mezcla de segmentación conteniendo 95 % de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5 % de agua y 2,5 % de triisopropilsilano (TIS) a analizar por HPLC de fase inversa (columna C₁₈) y ESI-MS para controlar la eficiencia de la síntesis del péptido lineal.

50

Ciclización del péptido lineal

El péptido lineal completamente protegido (0,04 mMol) fue disuelto en DMF (4 µMol/ml). Entonces, se añadieron 30,4 mg (0,08 mMol, 2 eq) de HATU, 10,9 mg (0,08 mMol, 2 eq) de HOAt y 28 µl (0,16 mMol, 4 eq) DIEA, y la mezcla fue sometida a vortex a 25°C durante 16 horas y que concentrada subsiguientemente a vacío elevado. El residuo fue dividido entre CH₂Cl₂ y H₂O/CH₃CN (90/10 v/v). La fase CH₂Cl₂ fue evaporada para facilitar el péptido cíclico completamente protegido.

55

Desprotección completa del péptido cíclico

El péptido cíclico obtenido fue disuelto en 3 ml de la mezcla de segmentación conteniendo 82,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de agua, 5% de tianisol, 5% de fenol y 2,5% de etanditiol (EDT). La mezcla se dejó permanecer a 25°C durante 2,5 horas y después se concentró en vacío. Después de precipitación del péptido cíclico completamente desprotegido en dietiléter (Et₂O) a 0°C el sólido fue lavado dos veces con Et₂O y secado. Se purificaron péptidos cíclicos sin enlaces de hebra-beta designados por HPLC de fase inversa, siendo procesados los péptidos cíclicos dispuestos para enlaces de hebra-beta adicionales, tal como se describe más adelante.

Formación de un enlace de bisulfuro de hebra-β y purificación

Después de desprotección, el péptido en bruto fue disuelto en 9 ml de 5% AcOH (tamponado con NaHCO₃ a pH 5-6). Se añadieron 0,5 ml de DMSO y la solución fue agitada durante una noche. Después de la evaporación el residuo fue purificado por HPLC de fase inversa preparativa.

Procedimiento analítico 1a:

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm con los siguientes disolventes A (H₂O/CH₃CN, 95/5 [v/v], + 0,1 % TFA) y B (CH₃CN+0,09% TFA) el gradiente: 0 min: 99% A, 1 % B; 0,2 min: 99% A, 1% B; 4 min: 5% A, 95% B; 4,2 min: 5% A, 95% B; 4,25 min: 99% A, 1% B; 5,0 min: 99% A, 1 % B.

Método analítico 1b:

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna de Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm con los siguientes disolventes A (H₂O + 0,1% TFA) y B (CH₃CN + 0,09 % TFA) y el gradiente: 0 min: 95% A, 5% B; 0,2 MIN: 95% A, 5% B; 4 min: 5% A, 95% B; 4,2 min: 5% A, 95% B; 4,25 min: 95% A, 5% B; 5,0 min: 95% A, 5% B.

Método analítico 2:

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna de Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm con los siguientes disolventes A (H₂O/CH₃CN, 95/5 [v/v], + 0,1 % TFA) y B (CH₃CN + 0,09 % TFA) y el gradiente: 0 min: 99% A, 1% B; 0,2 min: 99% A, 1% B; 4 min: 35% A, 65% B; 4,05 min: 5 % A, 95% B; 4,20 min: 95% B, 4,25 min: 99 % A; 1 % B; 4,5 min: 99% A, 1% B.

Procedimiento analítico 3:

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna zorbaxEclipsedXDBC18 con los siguientes disolventes A (H₂O + 0,1 % TFA) y B (CH₃CN + 0,1 % TFA) y el gradiente: 0 min: 60% A, 40 % B; 21 min: 10 % A, 90 % B; 27 min: 100 % B.

Procedimiento analítico 4

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando un aparato Laubscher Labs Interchrom 218QTP54 C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm, 300 A con los siguientes disolventes A (H₂O + 0,1 % TFA) y B (CH₃CN + 0,1 % TFA) y el gradiente: 0 min: 70 % A, 30 % B; 16,7 min: 100 % B.

El Ejemplo 28 se muestra en la *Tabla 1*. El péptido fue sintetizado empezando con el aminoácido Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina Fmoc-ProO-clorotritil, que fue preparada tal como se ha descrito anteriormente. El péptido lineal fue sintetizado sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en las siguientes secuencias: Resina-Pro-^DSer-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Siguiendo una desprotección final de Fmoc tal como se ha descrito anteriormente, el péptido fue segmentado de la resina, ciclizado, desprotegido y después de la formación del enlace de bisulfuro de hebra-beta fue purificado, tal como se ha indicado anteriormente. El tiempo de retención de HPLC (minutos) fue determinado utilizando el procedimiento de gradiente 2, tal como se ha descrito anteriormente.

El Ejemplo 29 se muestra en la *Tabla 1*. El péptido fue sintetizado empezando con el aminoácido Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina de Fmoc-ProO-clorotritil, que fue preparada tal como se ha descrito anteriormente. El péptido lineal fue sintetizado sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la siguiente secuencia: Resina-Pro-^DHyp-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Después de una desprotección final de Fmoc, tal como se ha descrito anteriormente, el péptido fue segmentado de la resina ciclizado, desprotegido y después de la formación del enlace de bisulfuro de hebra-beta purificado, tal como se ha indicado anteriormente. Se determinó el tiempo de retención de HPLC (minutos) utilizando el procedimiento de gradiente 2 que se ha descrito anteriormente.

El Ejemplo 30 se muestra en la *Tabla 1*. El péptido fue sintetizado empezando con el aminoácido Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina de Fmoc-ProO-clorotritilo, que fue preparada tal como se ha descrito anteriormente. El péptido lineal fue sintetizado sobre soporte sólido, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la secuencia siguiente: Resina-Pro-^DGlu-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Después de una descripción final de Fmoc, tal como se ha descrito anteriormente, el péptido fue segmentado de la resina, ciclizado, desprotegido y después de formación del enlace de bisulfuro de hebra-beta fue purificado, tal como se ha indicado anteriormente. Se determinó el tiempo de retención de HPLC (minutos) utilizando el procedimiento de gradiente 2, tal como se ha descrito anteriormente.

Los Ejemplos 31-35 se muestran en la *Tabla 1*. Los péptidos fueron sintetizados empezando con el aminoácido Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina de Fmoc-ProO-clorotritilo, que fue preparada, tal como se ha descrito anteriormente. Los péptidos lineales fueron sintetizados sobre soporte sólido, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la secuencia siguiente: Resina-Pro-^DPro-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Después de una desprotección final de Fmoc, tal como se ha descrito anteriormente, los péptidos fueron segmentados de la resina, ciclizados, desprotegidos y después de la formación del enlace de bisulfuro de hebra-beta purificados, tal como se ha indicado anteriormente.

Los tiempos de retención de HPLC (minutos) fueron determinados utilizando el procedimiento de gradiente 2 que se ha descrito anteriormente.

Tabla 1: Ejemplos (Ej.)

Ej.	Seq ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Plantilla	Pureza% ^{a)}	[M+ H]	RT
28	SEQ ID NO:28	Asp	Cys	Phe	Trp	Lys	Tyr	Cys	Leu	^D Ser ^L Pro	95	1243,0	3,12
29	SEQ ID NO:29	Asp	Cys	Phe	Trp	Lys	Tyr	Cys	Leu	^D 4Hyp ² Pro	95	1267,8	3,05
30	SEQ ID NO:30	Asp	Cys	Phe	Trp	Lys	Tyr	Cys	Leu	^D Glu ^L Pro	90	1283,5	3,10
31	SEQ ID NO:31	Asp	Cys	Phe	Trp	Lys	Tyr	Cys	Val	^D Pro ^L Pro	90	1237,3	3,11
32	SEQ ID NO:32	Asp	Cys	Phe	^D Trp	Orn	Tyr	Cys	Val	^D Pro ^L Pro	90	1223,4	3,06
33	SEQ ID NO:33	Asp	Cys	Tyr	Trp	Lys	Tyr	Cys	Leu	^D Pro ^L Pro	90	1267,5	2,95
34	SEQ ID NO:34	Asp	Cys	Phe	^D Trp	Lys	Tyr	Cys	Val	^D Pro ^L Pro	85	1237,5	3,07
35	SEQ ID NO:35	Asp	Cys	Phe	Trp	Lys	Tyr	Cys	Cha	^D Pro ^L Pro	90	1292,8	3,60

Cys en posición 2 y 7 en los Ejemplos 28-35 forma un puente de bisulfuro,

a) % de pureza de compuestos después de HPLC preparativa

2. Procedimientos biológicos

2.1. Preparación de los péptidos

Se pesaron péptidos liofilizados en una microbalanza (Mettler MT5) y se disolvieron en agua esteril hasta una concentración final de 1 mM si no se indica de otro modo. Se mantuvieron las soluciones a +4°C, con protección contra la luz.

2.2. Cultivo de células

Se cultivaron células pre-B de ratón en RPMI1640 más 5% de FBS, antibiótico/antimicótico, aminoácido no esencial, 50 µM beta-mercaptoetanol y piruvato sódico 1mM. Las células HELA fueron mantenidas en RPMI 1640 más 10% FBS, pen/strept y 2 mM L-glutamina. Las células Cos-7 fueron cultivadas en medio DMEM con 4500 mg/mL de glucosa suplementada con 10% FCS, pen/strept y 2 mM L-glutamina. Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C a 5% CO₂. Los medios celulares, suplementos de medios tampón PBS, HEPES, antibiótico/antimicótico, pen/strept, aminoácido no esencial, L-glutamina, beta-mercaptoetanol y sueros fueron comprados de Gibco (Pailsey, UK). Todos los componentes de química fina fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

2.3. Ensayo Ca²⁺: Actividad agonista y antagonista de los péptidos con receptor UTR2

La línea celular pre-B de ratón 300-19 fue transfectada de manera estable con ADNc que codifica el receptor humano UTR2 (GenBank Acc# NM_018949), y la expresión fue confirmada con una señal positiva de calcio como respuesta a urotensina humana (Sigma Aldrich). Los incrementos de calcio intracelular fueron monitorizados utilizando una Flexstation 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las células fueron cargadas en lotes con un kit de ensayo Calcium 4 (Molecular Devices) en un tampón de ensayo (solución salina equilibrada de Hanks, HBSS, 20 mM HEPES, pH 7,4, 0,1% BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente y células etiquetadas fueron dispensadas en placas negras de 96 pocillos o placas de ensayo de 384 pocillos (Greiner). La movilización de calcio inducida por urotensina o compuestos de prueba fue medida en la Flexstation 384 (excitación, 485 nm; emisión 525 nm) durante 70 segundos. La actividad agonista fue determinada por adición directa de ligando o péptidos, mientras que los antagonistas fueron identificados salpicando las células con compuestos de prueba antes de la adición de una tensina. Se determinó una curva de respuesta a la dosis (concentración de compuesto contra % de respuesta máxima para urotensina) para cada agonista y antagonista activo y fue acoplada a una ecuación logística de cuatro

parámetros utilizando SoftmaxPro 4.8 (Molecular Devices), de la que se calcularon los valores de EC50% y IC50%.

Después de la normalización los datos fueron acoplados con IGORpro software® (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) a una ecuación sigmoide para determinar valores de IC₅₀. Los valores K_i fueron calculados a partir de valores IC₅₀ de acuerdo con el método descrito por Nikolovska-Coleska y otros Anal. Biochem., 2004, 332, 261.

2.4. Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad de los péptidos a células HELA (Acc57) y células COS-7 (CRL-1651) utilizando el ensayo de reducción MTT. En pocas palabras, el procedimiento fue el siguiente: se sembraron 7000 células HELA/pocillo y 4500 células COS-7/pocillo y se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C a 5% de CO₂. Después de ello se determinó el tiempo cero (Tz) por reducción de MTT (ver más adelante). El sobrenadante de los pocillos restantes fue descartado, y se pipeteó a los pocillos medio fresco y compuestos en diluciones en serie (12,5, 25 y 50 µM, triplicados). Después de incubación de las células durante 48 horas a 37°C con 5% CO₂ el sobrenadante fue descartado nuevamente y se añadieron 100 µL MTT de reactivo (0,5 mg/mL en RPMI1640 y DMEM, respectivamente)/pocillo. Después de incubación a 37°C durante 2 horas los medios fueron aspirados y las células fueron salpicadas (100 µL isopropanol/pocillo). La absorbancia de formazán solubilizado fue medida a 595 nm (OD₅₉₅péptido). Para cada concentración se calcularon promedios a partir de triplicados. Se calculó el porcentaje de crecimiento del modo siguiente: (OD₅₉₅péptido- OD₅₉₅Tz- OD₅₉₅ pocillo vacío)/ (OD₅₉₅Tz- OD₅₉₅ pocillo vacío) x 100%. Se calcularon las concentraciones GI₅₀ (Inhibición de Crecimiento) para cada péptido utilizando una función de línea de tendencia para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0 µM), los correspondientes porcentajes y el valor 50, (=TREND (C₅₀:C₀, %₅₀:%₀, 50).

2.5. Hemólisis

Los péptidos fueron comprobados en cuanto a su actividad hemolítica contra glóbulos rojos humanos (hRBC). Se lavaron hRBC frescos tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugó durante 10 min a 2000 x g. Los compuestos (100 µM) fueron incubados con 20% hRBC (v/v) durante 1 hora a 37°C. La concentración final de eritrocitos fue aproximadamente de 0,9 x 10⁹ células/mL. Se determina un valor de 0% y 100% de lisados de células por incubación de hRBC en presencia de PBS solo y 0,1% Triton X-100 en H₂O, respectivamente. Las muestras fueron centrifugadas, los sobrenadantes fueron diluidos 20 veces en tampón PBS y se midieron las densidades ópticas (OD) a 540 nm. El valor de lisados 100% (OD₅₄₀H₂O) proporcionó un OD₅₄₀ de aproximadamente 1,3-1,8. El porcentaje de hemólisis fue calculada del modo siguiente:

$$(OD_{540}péptido/OD_{540}H_2O) \times 100 \%$$

2.6. Estabilidad del plasma

La estabilidad de los péptidos en el plasma humano y en el ratón se determinó aplicando el siguiente procedimiento: un pocillo con una profundidad de/315 µl de plasma humano recién descongelado (Basler Blutspendedienst) y plasma de ratón (Harlan Sera-Lab, UK), respectivamente, fueron salpicados con 35 µl/pocillo de compuesto en PBS (100 µM, triplicado) y se incubó a 37°C. En t = 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos se transfirieron partes alícuotas de 50 µl a los pocillos de la placa de titulación conteniendo 150 µl/pocillo de acetonitrilo. Después de agitación durante 2 minutos las suspensiones fueron filtradas en vacío y finalmente se transfirieron 100 µl de cada filtrado a una placa de microtitulación de propileno y se analizó por LC/MS del modo siguiente: Columna: Waters, Xbridge C18, fases móviles: (A) Agua + 0,1 % ácido fórmico y (B) acetonitrilo/agua, 95/5 (v/v) + 0,1% de ácido fórmico, gradiente: 5%-100% (B) en 2 minutos, ionización por electropulverización, detección MRM (triple cuadrupolo). Las áreas pico fueron determinadas y se promediaron valores triplicados. La estabilidad fue expresada en porcentaje del valor inicial en t = 0. (t_x/t₀ x 100). Utilizando la función TREND de EXCEL (Microsoft Office 2003) se determinaron T_{1/2}.

Tabla 1

Ej.	EC50% [nM], Receptor urotensina II
28	<2
29	<2
30	<2
31	<2
33	<2
34	<2

Tabla 2

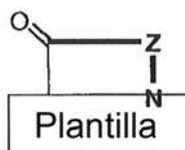
Ej.	IC50% [nM] ± SD, Receptor urotensina II
32	0,03 ± 0,01
35	0,2 ± 0,01

Tabla 3

Ej.	Citotoxicidad		Hemólisis a 100 μ M [%]	Estabilidad del plasma	
	Células Hela GL50 [μ m]	Células Cos-7 GL50 [μ m]		Plasma humano T1/2 [min]	Plasma ratón T1/2 [min]
28	> 50	> 50	0	240	240
29	> 50	> 50	0	240	240
30	> 50	> 50	0	240	240
31	> 50	> 50	0	240	240
32	> 50	> 50	0	240	240
33	> 50	> 50	0	240	240
34	> 50	> 50	0	240	240
35	> 50	> 50	0	240	240

REIVINDICACIONES

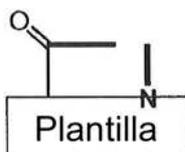
1. Compuestos de fórmula general



5

(I)

en la que



10

es ^DPro-^LPro, ^DSer-^Lpro o ^DGlu-^Lpro y

15

Z es una cadena de 8 residuos de alfa-aminoácidos, siendo contadas las posiciones de dichos residuos de aminoácidos en dicha cadena empezando del aminoácido en el terminal-N, de manera que estos residuos de aminoácidos son, dependiendo de su posición en la cadena,

20

- P1: Asp;
 - P2: Cys;
 - P3: Phe, Tyr;
 - P4: Trp, ^DTrp;
 - P5: Lys, Orn;
 - P6: Tyr;
 - P7: Cys,
 - P8: Cha, Leu, Val; y
- Cys a P2 y P7 pueden formar un puente de bisulfuro,

25

y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

30

2. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en la que la plantilla es ^DPro-^LPro y los residuos de aminoácidos en posición 1-8 son:

35

- P1: Asp;
- P2: Cys;
- P3: Phe;
- P4: Trp;
- P5: Lys;
- P6: Tyr;
- P7: Cys; y
- P8: Val;

40

formando Cys en P2 y P7 un puente de bisulfuro.

45

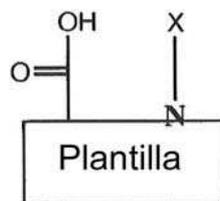
3. Un compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en la que la plantilla es ^DPro-^LPro y los residuos de aminoácidos en posición 1-8 son:

50

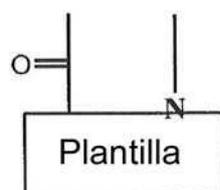
- P1: Asp;
- P2: Cys;
- P3: Phe;
- P4: ^DTrp;
- P5: Orn;
- P6: Tyr;
- P7: Cys; y
- P8: Val;

Formando Cys en P2 y P7 un puente de bisulfuro.

- 5
4. Enantiómeros de los compuestos de fórmula I, según la reivindicación 1.
5. Compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, a utilizar como sustancias terapéuticamente activas.
6. Compuestos, según la reivindicación 5, que tienen actividad agonista o antagonista contra urotensina II siendo útiles para tratar enfermedades renales, diabetes, disfunción cardiovascular, inflamación y también enfermedades de las vías respiratorias, tales como rinitis alérgica y asma.
- 10
7. Composición farmacéutica que contiene un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente inerte.
- 15
8. Composiciones, según la reivindicación 7 en forma adecuada para administración oral, tópica, transdérmica, inyección, bucal, transmucosal, pulmonar o inhalación.
9. Composiciones, según la reivindicación 7 u 8 en forma de tabletas, grageas, cápsulas, soluciones, líquidos, geles, emplastos, cremas, ungüentos, jarabes, emulsiones, suspensiones, pulverizaciones, nebulizaciones o supositorios.
- 20
10. Utilización de los compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento a utilizar como agonista o antagonista de urotensina II.
11. Utilización, según la reivindicación 10, en la que dicho medicamento agonista de urotensina II está destinado a su utilización en los casos en los que la enfermedad renal es mediada o resultado de la actividad de urotensina II, o en los que la diabetes es mediada o resultado de la actividad de urotensina II, o en los que la disfunción cardiovascular es mediada o resultado de la actividad de urotensina II, o en los que la información es mediada o resultado de la actividad de urotensina II.
- 25
12. Procedimiento para la fabricación de compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo procedimiento comprende
- 30
- (a) acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-protégido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posiciones 3, 4, ó 5, protegiéndose igualmente de manera apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protégido;
- 35
- (b) retirando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;
- (c) acoplando el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protégido de dicho aminoácido, que en el producto final deseado se encuentra más próximo en una posición al residuo de aminoácido N-terminal, siendo igualmente protegido de manera apropiada, cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protégido;
- 40
- (d) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que se ha introducido el residuo de aminoácido N-terminal;
- 45
- (f) acoplar el producto obtenido de este modo con un compuesto de fórmula general



en la que



es el definido en la reivindicación 1 y X es un grupo N-protector o, alternativamente,

(fa) acoplar el producto obtenido en la etapa (e) con un derivado apropiadamente N- protegido de un amino ácido de fórmula general

5 HOOC-B-H III

o

10 HOOC-A-H- IV

en las que B y A son los definidos en la reivindicación 1, siendo igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(fb) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo; y

15 (fc) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de un aminoácido de la anterior fórmula general IV o fórmula

HOOC-B3-H V

20 en la que B3 es tal como se ha definido en la reivindicación 1

y, respectivamente, fórmula III, protegiendo igualmente de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(g) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) o (fc);

25 (h) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 8, siendo adecuadamente protegido asimismo cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(i) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

30 (j) acoplado el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido, que en el producto final se encuentra una posición más lejos de la posición 8, siendo asimismo adecuadamente protegido cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;

(k) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

35 (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que se han introducido todos los residuos de aminoácido;

(m) en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente los grupos reactivos liberados de este modo;

(n) en caso deseado, formar un enlace entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácido apropiados en las posiciones 2 y 7;

40 (o) desacoplar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;

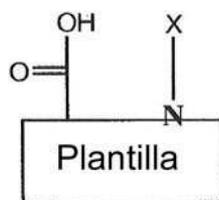
(p) ciclizar el producto separado del soporte sólido;

(q) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en el caso deseado, cualesquiera grupos protectores que puedan encontrarse presentes en la molécula; y

45 (r) en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal distinta farmacéuticamente aceptable.

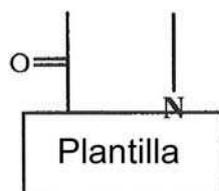
13. Procedimiento para la fabricación de compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende

50 (a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general



II

55 en el que



es el que se define en la reivindicación 1 y X es un grupo N-protector o, alternativamente,

5 (a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido de un aminoácido de fórmula general



10 o



15 en la que B y A son los definidos en la reivindicación 1, habiendo sido igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(a'b) eliminar el grupo N-prottegido del producto obtenido de este modo; y

(a'c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de un aminoácido de la anterior fórmula general IV o

20



en la que B3 es el definido en la reivindicación 1

25 y, respectivamente, fórmula III, habiendo sido adecuadamente protegido también cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(b') eliminando el grupo N-prottegido del producto obtenido en la etapa (a') o (a'c)

30 (c') acoplar el producto obtenido de esta manera con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 8, cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido siendo igualmente protegido de manera apropiada;

(d') eliminar el grupo N-prottegido del producto obtenido de este modo;

35 (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más allá de la posición 8, siendo adecuadamente protegido también cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(f) eliminar el grupo N-prottegido del producto obtenido de este modo;

(g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que se han introducido todos los residuos de aminoácidos;

40 (h') en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;

(i') formar en caso deseado un enlace entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas 2 y 7;

(j') desacoplar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;

45 (k') ciclizar el producto separado del soporte sólido;

(l') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en el caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que pueden encontrarse adicionalmente presentes en la molécula; y

50 (m') en caso deseado, convertir el producto obtenido de esta manera en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre de fórmula I o en una sal diferente farmacéuticamente aceptable.

14. Procedimiento, según la reivindicación 12 ó 13, para la fabricación de compuestos, según la reivindicación 4, modificado en el hecho de que se utilizan enantiómeros de todos los materiales iniciales.