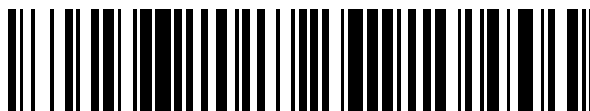


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 308**

51 Int. Cl.:

C07K 14/665 (2006.01)

A61K 38/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2006 E 06708285 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1851241**

54 Título: **Agonistas y antagonistas completos y parciales altamente potentes del receptor de nociceptina/orfanina FQ**

30 Prioridad:

15.02.2005 IT FE20050003

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

17.07.2015

73 Titular/es:

**UFPEPTIDES S.R.L. (100.0%)
Via Saragat 1 Blocco B
44100 Ferrara, IT**

72 Inventor/es:

**GUERRINI, REMO;
SALVADORI, SEVERO;
CALO', GIROLAMO y
REGOLI, DOMENICO**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 541 308 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

Agonistas y antagonistas completos y parciales altamente potentes del receptor de nociceptina/orfanina FQ.

5 **Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a análogos de péptido nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) capaces de modular la actividad del receptor de péptido N/OFQ (receptor NOP), composiciones farmacéuticas que comprenden los análogos de péptido y su uso para el tratamiento de disfunciones, condiciones patológicas o estados patológicos que involucran el receptor.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** En 1994, un nuevo receptor llamado ORL1, que es estructuralmente similar a los receptores opioides, fue clonado; de acuerdo con las recientes recomendaciones de IUPHAR, el nombre más apropiado para este receptor es NOP. Su ligando endógeno (N/OFQ), identificado a finales de 1995, es un heptadecapéptido similar a algunos péptidos opioides (por ejemplo dinorfina A), la cual sin embargo, no enlaza los receptores opioides clásicos de tipos mu (MOP), delta (DOP) o kappa (KOP). Los efectos celulares mediados por el receptor NOP son similares a aquellos mencionados por receptores opioides clásicos. Desde un punto de vista estructural, y desde el punto de vista de transducción de señales, el sistema de péptido/receptor N/OFQ-NOP pertenece a la familia de opioides, aunque representa una ramificación farmacológicamente distinta. Varios estudios, realizados entre 1996 y 1998, mostraron que N/OFQ puede modular varias funciones tanto en el sistema nervioso central (dolor, ansiedad, aprendizaje, memoria, abuso de fármacos, apetito) como al nivel periférico (funciones de la presión sanguínea, ritmo cardíaco, riñón, gastrointestinales, genitourinarias y respiratorias) (para detalles adicionales véase Massi et al., Peptides 21, 2000).

20 **[0003]** Partiendo de 1996, los presentes inventores realizaron estudios en el sistema N/OFQ-NOP, que conducen a la identificación de ligandos del receptor NOP particular, tal como i) N/OFQ(1-13)-NH₂, el cual representa el fragmento funcional mínimo con la misma actividad del ligando natural de N/OFQ (Calo et al., Eur J Pharmacol 311, R3-5, 1996), ii) N/OFQ-NH₂ el cual produce, especialmente in vivo, efectos más intensos y prolongados comparados con N/OFQ (Rizzi et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 363, 161-165, 2001), iii) [Tyr¹]N/OFQ(1-13)-NH₂, un agonista mezclado el cual actúa sobre NOP y sobre los receptores opioides clásicos (Calo et al., Can J Physiol Pharmacol 75, 713-8, 1997; Varani et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 360, 270-7, 1999), iv) [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]N/OFQ(1-13)-NH₂, un ligando del receptor NOP selectivo el cual se comporta como antagonista puro, agonista parcial o incluso como agonista completo, dependiendo de la preparación/ensayo bajo estudio (Guerrini et al., Br J Pharmacol 123, 163-5, 1998; Okawa et al., Br J Pharmacol 127, 123-30, 1999) – basado en el análisis detallado de acción farmacológica de [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]N/OFQ(1-13)-NH₂ reportado por Calo et al. (Peptides 21, 935-47, 2000), resulta que este compuesto es verdaderamente un agonista NOP parcial, v) [Nphe¹]N/OFQ (1-13)-NH₂, el primer antagonista competitivo puro del receptor NOP (Calo et al., Br J Pharmacol 129, 1183-93, 2000; Guerrini et al., J Med Chem 15, 2805-13, 2000). La acción de estos ligandos se ha caracterizado en varios ensayos in vitro e in vivo (ver Calo et al., Br J Pharmacol 129, 1261-83, 2000). Más recientemente, el residuo Phe⁴ se reemplazó con (pF)Phe o (pNO₂)Phe, por lo cual se obtienen agonistas NOP selectivos potentes (Guerrini et al., J Med Chem 44, 3956-64, 2001). Otro compuesto interesante, [Arg¹⁴, Lys¹⁵]N/OFQ, se identificó como un agonista altamente potente (17 veces más potente que N/OFQ), selectivo para receptores NOP recombinantes humanos expresados en células HEK293 (Okada et al., Biochem Biophys Res Commun 278, 493-8, 2000). Las acciones de este ligando se caracterizaron adicionalmente in vitro, usando tejidos aislados sensibles a N/OFQ, e in vivo en el ratón (Rizzi et al., J Pharmacol Exp Ther 300, 57-63, 2002). Además, Zhang et al., (Zhang et al., J Med Chem, 45, 5280-5286, 2002) describe análogos de N/OFQ, caracterizados por un residuo de ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib) en la posición 7 y/u 11, reemplazando los residuos Ala y produciendo un incremento de afinidad y potencia del ligando. Los análogos de N/OFQ se describen en WO 99/07212, WO 97/07208, WO 99/03491, WO 99/03880, y EP 1422240. La utilidad de este ligando se ha reportado en el tratamiento/prevenición de enfermedades relacionadas con hiperalgesia, funciones neuroendocrinas, tensión, actividad locomotriz y ansiedad.

25 **[0004]** Posteriormente, la secuencia de referencia del péptido N/OFQ es la siguiente: H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH

Descripción de las figuras

30 **[0005]**

35 **Figura 1:** Efecto de administración intracerebroventricular (i.c.v., como se observa en los paneles superiores) o intratecal (i.t., como se observa en los paneles inferiores) de N/OFQ (10 nmol/ratón) y de UFP-112 (0.1 nmol/ratón) en el ensayo de retiro de la cola (ref. Calò et al. Br J Pharmacol. 125, 375-378, 1998). Los animales de control recibieron una inyección i.c.v. de solución salina (2 µl/ratón). Cada punto representa el promedio ± s.e.m. de al menos 4 experimentos.

40 **Figura 2:** Duración de los efectos de N/OFQ (10 nmol/ratón) y UFP-112 (0.1 nmol/ratón), administrados de

forma intracerebroventricular (i.c.v.), en actividad locomotriz espontánea en ratones (ref. Rizzi et al., Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 363, 161-165, 2001). Los animales de control recibieron una inyección i.c.v. de solución salina (2 µl/ratón). Cada punto representa el promedio \pm s.e.m. de al menos 4 experimentos.

Figura 3: Cinéticas de acción y reversibilidad de los efectos de concentraciones equi-efectivas de N/OFQ y UFP-112 en el *vas deferens* del ratón después de la estimulación eléctrica. La contracción de *Vas deferens*, inducida por estimulación eléctrica, se inhibe en la presencia de UFP-112 o N/OFQ.

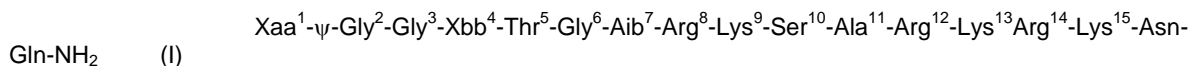
Descripción detallada de la invención

[0006] Los términos usados en esta patente tienen un significado conocido en la técnica, como por ejemplo en el IUPHAR en la Nomenclatura del Receptor y Clasificación del Fármaco, Pharm. Rev. (2003) Vol. 55, No. 4, p. 597, como se reporta en la presente:

Eficacia - un concepto que expresa el grado al cual diferentes agonistas producen respuestas variadas, aún cuando ocupan la misma proporción de receptores.

Potencia - una expresión de la actividad de un compuesto, definida en términos de la concentración o cantidad necesaria para producir un efecto definido. La potencia se mide como pEC₅₀ para agonistas y como pA₂ para antagonistas.

Los objetos de la presente invención son análogos de péptido N/OFQ, de la fórmula general (I)



en donde

cuando Xaa¹ es Phe, ψ representa el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácido y se elige entre CO-NH, Xbb⁴ es pFPhe donde "p" indica la posición para en el anillo fenilo de Phe;

o

cuando Xaa¹ es Phe, ψ es CH₂-NH, Xbb⁴ es pFPhe;

o

cuando Xaa¹ es N-bencil-glicina (Nphe), ψ es CO-NH, y Xbb⁴ es Phe.

[0007] Además, la invención incluye sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos (I), particularmente sales de ácido orgánico y mineral tales como, clorhidrato, bromhidrato, fosfatos, sulfatos, acetatos, succinatos, ascorbato, tartratos, gluconatos, benzoatos, maleatos, fumaratos y estearatos.

[0008] Los compuestos de acuerdo con la invención, los cuales caen bajo la fórmula I, tienen una actividad farmacológica probada, incluso 100 veces mayor que los ligandos de péptido conocidos en la técnica. Por lo tanto es posible hacer una hipótesis de un efecto sinérgico de las permutaciones de acuerdo con la fórmula I: para posiciones 1, 4, 7, 11, 14 y 15 y el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácidos. Una actividad superior de los compuestos de la fórmula I y particularmente de los compuestos preferidos, preferiblemente agonistas y más preferiblemente [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ se demuestra con respecto a la afinidad, potencia, resistencia a la proteasa, cinéticas de acción *in vitro* y, sobre todo, la duración de su acción *in vivo*.

[0009] Los compuestos preferidos son los análogos de péptido que tienen la fórmula (I) en la cual los residuos variables tienen el significado reportado en la siguiente tabla:

	Xaa ¹	ψ	Xbb ⁴
1	Nphe	CO-NH	Phe
2	Phe	CO-NH	(pF)Phe
3	Phe	CH ₂ -NH	(pF)Phe

[0010] Los compuestos están representados por las siguientes fórmulas:

a) H-Nphe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Aib-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

b) H-Phe-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Aib-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

c) H-Phe- ψ (CH₂-NH)-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Aib-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

[0011] Los análogos de péptido de acuerdo con la invención se pueden sintetizar por técnicas diferentes conocidas en la literatura, por ejemplo Schroeder et al. "The Peptides" vol. 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al. "Peptide Synthesis" Interscience Publisher, 1966; Barany & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2, Academic Press, 1980; E. Atherton e R.C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis" IRL Press at Oxford University Press 1989; J. Jones, "The Chemical Synthesis of Peptides". Clarendon Press, Oxford 1994. Estas técnicas incluyen síntesis de péptido de fase sólida o síntesis de péptido de fase solución, métodos sintéticos de química orgánica, o cualquier combinación de los anteriores. La elección del esquema de síntesis dependerá obviamente de la composición de un péptido dado. Preferiblemente, se emplean métodos sintéticos que se basan en combinaciones apropiadas de técnicas de fase sólida y métodos de fase de solución clásicos, que involucran bajos costos de

producción, particularmente en una escala industrial. En detalle, los métodos comprenden:

i) Síntesis en solución de fragmentos de cadena de péptido a través de acoplamiento secuencial de aminoácidos N-protectados, convenientemente activados, a un aminoácido o una cadena de péptido C-protectado, con aislamiento de los intermediarios, desprotección selectiva subsiguiente de N y extremos de C-terminal de los fragmentos, y su acoplamiento repetido hasta que el péptido deseado es obtenido. Donde sea necesario, las cadenas son desprotegidas.

ii) Síntesis de fase sólida de la cadena de péptido del extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal en un soporte polimérico insoluble. El péptido se remueve a partir de la resina por hidrólisis con ácido fluorhídrico anhidro o ácido trifluoroacético, con desprotección simultánea de las cadenas laterales.

[0012] Al final de la síntesis, los péptidos se pueden purificar y aislar por tratamiento con solventes adecuados y por técnicas cromatográficas, tales como HPLC.

[0013] Los análogos de péptido de acuerdo con la invención actúan en el receptor NOP como i) agonistas completos, cuando los mismos presentan la estructura $[\text{Phe}^1\psi(\text{CO-NH})\text{Gly}^2]$, ii) agonistas parciales, cuando los mismos presentan la estructura $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-NH})\text{Gly}^2]$ o $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-O})\text{Gly}^2]$, y como antagonistas puros, cuando los mismos presentan la estructura $[\text{Nphe}^1\psi(\text{CO-NH})\text{Gly}^2]$.

[0014] Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen los análogos de péptido descritos en la presente, posiblemente en combinación con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de la invención se pueden administrar a través de la vía oral o parenteral, o a través de la vía respiratoria, rectal, espinal, intratecal, intravesical o tópica, como preparación inyectable, cápsula, tableta, granulada, solución, suspensión, jarabe, supositorio, pulverización nasal, crema, ungüento, gel, preparación de liberación controlada u otra. Los principios y los métodos para la preparación de la composición farmacéutica son bien conocidos para los expertos en el campo y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 1990. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención contendrán una cantidad efectiva de péptidos (o de sus derivados) generalmente que varían entre 0.001 y 100 mg, preferiblemente entre 0.01 y 10 mg. La dosis diaria variará dependiendo del tipo de patología/disfunción, edad, sexo y peso corporal del paciente, el estado de salud general y otras variables las cuales necesitan ser evaluadas en una base caso por caso.

[0015] Considerando el perfil de actividad mostrado por los péptidos de la invención en pruebas biológicas, las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos se pueden usar para el tratamiento de disfunciones, condiciones o estados patológicos, que comprenden disfunciones neurológicas y neurosensoriales. Es deseable obtener una activación de receptor NOP potente y prolongada para el tratamiento de ansiedad, anorexia, hipertensión, taquicardia, trastornos de retención de agua, hipoonatremia, falla congestiva cardíaca, disfunción motriz del músculo liso en tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (especialmente incontinencia urinaria seguida de vejiga neurogénica), estados inflamatorios, o analgesia periférica o espinal, particularmente para el tratamiento de dolor crónico, o, aún más, en control de la tos. Además, será posible usar los antagonistas para el tratamiento de la memoria, estado de ánimo, actividad locomotriz (por ejemplo enfermedad de Parkinson), trastornos de la ingesta de alimentos (por ejemplo bulimia), o más generalmente, para el tratamiento de pacientes obesos. El peso molecular elevado de estos compuestos, y la presencia dentro de ellos de residuos que pueden ser cargados de manera positiva a pH fisiológico los hacen poco probables que puedan cruzar la barrera hematoencefálica. Los compuestos pueden ejercer efectos centrales después de la administración local, incluso aunque los mismos muestren de manera predominante una distribución periférica. Por ejemplo, los compuestos agonistas pueden inducir a analgesia al nivel del sistema nervioso central, seguido de la administración intratecal o espinal.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Síntesis de Péptido

1.1 Esquema de Síntesis General

[0016] Los péptidos de la invención se prepararon por síntesis de fase sólida usando una resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometilfenoxiacetamido-norleucil-resina (resina Rink-Amida MBHA). Los aminoácidos Fmoc (fluorenilmetoxycarbonil) se han condensado usando $[\text{O}-(7\text{-azabenzotriazol-1-il})-1,1,3,3\text{-tetrametiluroniohexafluorofosfato}](\text{HATU})$ como reactivo para la activación de la función carboxílica. Los grupos Fmoc se han removido por el uso de 20% de piperidina en DMF (dimetilformamida) y la resina enlazada al péptido protegido ha sido tratada con el reactivo K para obtener el péptido primario. Los compuestos que contienen un enlace de péptido modificado entre los dos primeros residuos de aminoácido $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-NH})\text{Gly}^2]$ o $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-O})\text{Gly}^2]$ se han obtenido por condensación de Boc-Phe-CHO en el péptido (2-17) o (2-16) o (2-15) protegido enlazado a la resina durante la última etapa de síntesis, reduciendo así in situ el derivado "imino" del intermediario con NaBH_3CN , o condensar el fragmento Boc- $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-O})\text{Gly}^2]\text{-OH}$ (que se obtuvo siguiendo los métodos reportados en la literatura: Balboni et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans I, **1998**, páginas 1645-1651) en el péptido (3-17) o (3-16) o (3-15) protegido unido a la resina durante la última etapa de síntesis, usando HATU como agente de condensación.

[0017] El control analítico de tanto productos primarios como finales se da por HPLC analítica en el Beckmann System Gold 168, usando una columna Alltech C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m). Los compuestos se analizaron usando un sistema de elución binario compuesto de solvente A: 35 mM de NaH₂PO₄ (pH 2.1) y solvente B: 59 mM de NaH₂PO₄ (pH 2.1)-acetonitrilo (60:40 v/v), programando el gradiente de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos a ser analizados, a una velocidad de flujo de 1 mL/min y a una longitud de onda de 220 nm. El péptido primario se ha purificado por el uso del sistema HPLC preparativa Acuosa Delta Prep 4000, usando una columna de empaque radial Acuosa Delta-LC 40 mm (30 x 40 cm, C18, 300 A, 15 μ m) que se eluyó con la misma fase móvil usada para HPLC analítica y con un gradiente programado de acuerdo con el perfil analítico de los productos de reacción primarios. El peso molecular del compuesto final se obtuvo por espectrometría de masa por electropulverización usando el Instrumento micromass ZMD2000.

[0018] Para los intermediarios de algunos péptidos, un análisis 1HRMN espectroscópico se realizó usando un instrumento Bruker 200MHz.

1.2 Procedimiento

[0019] Los análogos de péptido b) c) y d) descritos anteriormente se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente posteriormente.

[0020] La resina Rink-Amida MBHA (0.65 mmol/g, 0.2 g) se trató con piperidina (20%) en DMF y se condensó con Fmoc-Gln(Trt)-OH, activando la función carboxílica con HATU. Los siguientes aminoácidos Fmoc se acoplaron consecutivamente a la cadena de péptido de alargamiento: Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-(pF)Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH. Todos los aminoácidos Fmoc (4 equivalentes) se acoplaron a la cadena de péptido de alargamiento usando HATU (4 equivalentes) y diisopropiletilamina (4 equivalentes) en DMF; la reacción de acoplamiento se realizó por una hora. Para optimizar el rendimiento de síntesis, y hacer la purificación de los compuestos más fácil, fue necesario el acoplamiento doble con tiempo de acilación de una hora para el residuo Aib. La piperidina (20%) en DMF se utilizó para remover los grupos Fmoc en cada etapa. Seguido de la desprotección del último grupo N^o-Fmoc, la resina de péptido se lavó con metanol y se secó bajo vacío para producir la resina protegida [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ(1-17)-Rink-Amida MBHA. Esta resina de péptido protegida se trató con el reactivo K (TFA/H₂O/fenol/etanditiol/tioanisól 82.5:5:5:2.5:5; v/v; 10 ml/0.2 g de resina) por 1h a temperatura ambiente. Después de la filtración de la resina agotada, el solvente se concentró bajo vacío y el residuo se trituró en éter. El péptido primario se purificó por HPLC de fase inversa preparativa y un polvo blanco se obtuvo siguiendo liofilización.

[0021] La síntesis de [Phe¹ Ψ (CH₂-NH)Gly²,(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ-NH₂ (péptido c) se hizo partiendo del intermediario [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ-(2-17)-resina sintetizada como se describió anteriormente. Este intermediario (0.2 g, 0.65 mmol/g, 0.13 mmol) se volvió a suspender y se hinchó en metanol que contiene 1% de ácido acético (V/V) (2 ml). Después de 20 minutos, se adicionó una solución que contiene Boc-Phe-CHO (0.065 g, 0.26 mmol) y NaBH₃CN (0.033 g, 0.52 mmol) solubilizado en metanol (0.8 ml), y la mezcla de reacción se agitó por 1.5h. La resina se trató entonces con metanol y se trató con reactivo K como se describió anteriormente. La síntesis de [Phe¹ Ψ (CH₂-O)Gly²,(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ-NH₂ (péptido d) se hizo partiendo del intermediario [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ(3-17)-resina sintetizada como se describió anteriormente. Este intermediario (0.2 g, 0.65 mmol/g, 0.13 mmol) se aciló en la última etapa con Boc-Phe[Ψ (CH₂-O)]Gly-OH (4 equivalentes, 0.16 g, 0.52 mmol) activando la función carboxílica con HATU bajo las mismas condiciones descritas para las etapas de acilación normal. Subsiguientemente, la resina se lavó con metanol y se trató con reactivo K como se describió anteriormente.

2. Pruebas Farmacológicas.

2.1 Materiales y métodos

[0022] Los compuestos se probaron in vitro en membranas oocitos de hámster que expresan el receptor NOP recombinante humano (CHO_{hNOP}) (experimentos que enlazan receptores y experimentos de estimulación de enlace GTPyS) y en los *vas deferens* del ratón después de la estimulación eléctrica. Las condiciones de uso para estudiar los efectos de los compuestos en experimentos de bioensayo (*vas deferens* del ratón) se describen en Bigoni et al. (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **359**, 160-7, 1999), aunque las condiciones usadas para estudiar los efectos de células CHO_{Nop} se describe en Mc Donald et al. (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **367**, 183-187, 2003). En cada serie de experimentos, la actividad de nuevos compuestos se comparó a aquella del péptido N/OFQ natural.

2.2 Resultados

[0023] En los experimentos de enlace del receptor, todos los compuestos probados comprueban ser capaces de desplazar completamente el N/OFQ tritiado del receptor NOP recombinado humano. Los compuestos exhiben afinidades de receptor muy diferentes (pK_i) dependiendo de las diversas modificaciones químicas. En general, los compuestos con estructura [Phe¹ Ψ (CO-NH)Gly²] muestran mayor afinidad que aquella que tiene la estructura

[Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²] y extremadamente mayor afinidad que aquella que tiene la estructura [Nphe¹Ψ(CO-NH)Gly²]. Además los compuestos que tienen las modificaciones combinadas [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵] muestran mayor afinidad que aquellas que tienen las modificaciones únicas.

5 **[0024]** En las pruebas funcionales que tienen estimulación de enlace de GTPγS y en las pruebas que involucran inhibición de la contracción nerviosa inducida por estimulación eléctrica de los *vas deferens* del ratón, los compuestos que tienen la estructura [Phe¹Ψ(CO-NH)Gly²] imitan los efectos de N/OFQ, y en particular inducen efectos máximos similares, por lo tanto actúan como agonistas completos, mientras que los compuestos que tienen la estructura [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²] actúan como agonistas parciales puesto que sus efectos máximos fueron inferiores que con N/OFQ. Al último, los compuestos que tienen la estructura [Nphe¹Ψ(CO-NH)Gly²] no producen cualquier efecto per se pero actúan como antagonistas competitivos de N/OFQ.

10 **[0025]** Para simplificar, la Tabla 1 reporta los resultados obtenidos con los compuestos [(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-112), [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²,(pF)Phe⁴,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-113), [Nphe¹,Aib⁷,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-111), y con el péptido de referencia N/OFQ.

Tabla 1

Actividad biológica de [(pF)Phe ⁴ ,Aib ⁷ ,Arg ¹⁴ ,Lys ¹⁵]N/OFQ-NH ₂ (UFP-112), [Phe ¹ Ψ(CH ₂ -NH)Gly ² ,(pF)Phe ⁴ ,Aib ⁷ ,Arg ¹⁴ ,Lys ¹⁵]N/OFQ-NH ₂ (UFP-113), [Nphe ¹ ,Aib ⁷ ,Arg ¹⁴ ,Lys ¹⁵]N/OFQ-NH ₂ (UFP-111), y el péptido de referencia N/OFQ.							
	Membrana de células CHO _{hNOP}				vas deferens de Ratón		
	Enlace de receptor	Estimulación sobre enlace GTPγS			Inhibición de la contracción nerviosa inducida por estimulación eléctrica		
		Agonista		Antagonista	Agonista		Antagonista
	PK _i	pEC ₅₀	E _{max}	pA ₂	pEC ₅₀	E _{max}	pA ₂
N/OFQ	9.50	9.04	100±9%	ND	7.39	-84±3%	ND
UFP-112	10.55	10.55	118±9%	ND	9.48	-85±2%	ND
UFP-113	10.26	9.72	79±3%	ND	Efectos agonistas variables		9.28
UFP-111	9.75	Inactivo		8.68	Inactivo		7.46

Los resultados son el promedio (media) de 4-6 determinaciones. ND: no determinable porque el compuesto presenta efectos agonistas.

20 **[0026]** Como se ha destacado en la Tabla 1, el compuesto UFP-113 se comporta como agonista del receptor NOP parcial, que provoca efectos máximos que son más inferiores que N/OFQ, tanto en el ensayo de GTPγS y en el ensayo de inhibición de contracción inducida por estimulación eléctrica de *vas deferens* del ratón. El UFP-111 prueba ser un antagonista puro y potente selectivo para el receptor NOP. El análisis por Schild (realizado en ambos experimentos de GTPγS y con el sistema *vas deferens* del ratón) indica que el compuesto se comporta como antagonista competitivo del receptor NOP con valores de potencia (expresados como pA₂) de 8.68 y 7.46, respectivamente (ver la Tabla 1).

2.3. Selectividad del compuesto UFP-112.

30 **[0027]** Los efectos de UFP-112 son mediados por la activación del receptor NOP, como se muestra por el hecho que la acción de este péptido en las *vas deferens* del ratón no se modificó en presencia de naloxona (un antagonista no selectivo de receptores opioides clásicos, pero no del receptor NOP) pero resulta ser efectivamente antagonizado por UFP-101 el cual es un antagonista receptor de NOP selectivo ([Nphe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂, Calò et al., Br J Pharmacol 136, 303-311, 2002). El UFP-101 usado en competición con UFP-112 muestra un valor de potencia (pA₂ 6.81) similar a aquel obtenido cuando se usa en competición con el agonista endógeno N/OFQ (pA₂ 6.91). Esto demuestra que las tres moléculas (N/OFQ, UFP-112 e UFP-101) interactúan con el mismo receptor: el receptor NOP. Esto se muestra además por los resultados obtenidos con tejidos de ratón agénico (Ref. Nishi, M. et al., Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. Embo J 16 (8): 1858-64, 1997) para el gen receptor de NOP (NOP^{-/-}) (ver la Tabla 2).

Tabla 2 – efectos del agonista N/OFQ y UFP112 y del agonista DOP, D-Pen²,D-Pen⁵encefalina (DPDPE), en los *vas deferens* de tipo silvestre (NOP^{+/+}) y ratones agénicos para el receptor NOP (NOP^{-/-}).

Compuesto	NOP ^{+/+}		NOP ^{-/-}	
	pEC ₅₀	E _{max}	pEC ₅₀	E _{max}
N/OFQ	7.47	84±4%	<6	-
UFP-112	8.94	93±3%	<6	-
DPDPE	8.40	93±3%	8.20	91±5%

45 **[0028]** El efecto inhibitor en la contracción inducida por estimulación eléctrica, provocado por UFP-112 (similar a aquel que se encuentra con N/OFQ) desaparecido en los *vas deferens* aislado de ratones NOP^{-/-}, confirmando que

las acciones biológicas de UFP-112 son solamente debido a la interacción con el receptor NOP.

[0029] El compuesto [D-Pen²,D-Pen⁵]-Encefalina, DPDPE (ref. Life Sci. 1983;33 Suppl 1:447-50), un agonista DOP selectivo, se utilizó como el control positivo. Este control muestra que son los tejidos derivados de ratones agénicos de receptor NOP los que responden normalmente a estímulos inhibidores que no usa el receptor NOP.

2.4 Pruebas farmacológicas en selectividad de los compuestos de acuerdo con la invención.

[0030] Los compuestos se han probado in vitro en membranas de oocitos de hámster (CHO) que expresan el receptor NOP recombinante humano (CHO_{hNOP}), como en el párrafo 2.1, de acuerdo con Mc Donald et al (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**, 183-187, 2003).

[0031] Los estudios sobre la selectividad de estos compuestos para el receptor NOP se realizaron por estudios de enlace de receptor en membranas de células CHO transfectadas con receptores opioides recombinantes humanos de tipo mu (MOP), delta (DOP) y kappa (KOP), usando el mismo método para CHO_{hNOP}. Los estudios de selectividad se realizaron por experimentos de competición de acuerdo con los métodos descritos en Mc Donald et al. (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**, 183-187, 2003). Para medir el pK_i para N/OFQ, el N/OFQ tritiado se utilizó como radioligando, mientras que [³H]-Diprenorfina se utilizó para los receptores opioides clásicos. La actividad de los nuevos compuestos se comparó con aquel del péptido natural N/OFQ.

[0032] En experimentos de enlace del receptor, realizado en membranas de células CHO transfectadas, UFP-111, UFP-112 y UFP-113 muestran una alta selectividad (>100 veces) para el receptor NOP que los receptores MOP, KOP y DOP (ver la Tabla 3).

Tabla 3 Afinidad (pK_i) de UFP-112, UFP-113 y UFP-111 para los receptores NOP, MOP, DOP y KOP transfectados en células CHO (Ref. Mc Donald et al. (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**, 183-187, 2003).

Receptores (ligandos estándar usados por receptor)	pK _i			
	NOP (N/OFQ) ¹	MOP (DAMGO) ^{2,3}	DOP (Naltrindol) ³	KOP (Nor-BNI) ³
Ligandos estándar	9.50	8.43	9.97	9.90
UFP-112	10.55	7.13	6.37	8.36
UFP-113	10.26	6.45	5.69	7.55
UFP-111	7.75	<5.0	<5.0	6.17

Los datos son el promedio de 4 experimentos.

- Nota 1 – El ligando tritiado usado es [³H]N/OFQ
- Nota 2 – DAMGO significa [D-Ala(2),N-MePhe(4),Gly-ol(5)]encefalina
- Nota 3 – El ligando tritiado usado es [³H]-Diprenorfina

3. Estudios in vivo sobre la eficacia del compuesto agonista completo UFP-112

[0033] El compuesto UFP-112; que es un agonista completo, se probó in vivo en ratones, en ensayos diferentes:

1) ensayo de retiro de la cola, de acuerdo con los protocolos experimentales descritos por Calò et al., (Br J Pharmacol 125, 373-378, 1998) y Rizzi et al. (Clin Pharmacol 18, 56, 2004);

2) medición de absorción de alimentos en animales alimentados, como se describe por Rizzi et al. (National Congress of the Italian Society of Neuroscience and joint Italian-Swedish (Neuroscience Meeting, Ischia (Napoli) 1-4 Octubre 2005);

3) ensayo para medición de actividad locomotora espontánea, como se describe por Rizzi et al., (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 363, 161-165, 2001).

[0034] En cada ensayo, las actividades de UFP-112 y N/OFQ se midieron como dosis equiefectivas. Cuando UFP-112 muestra potencia de aproximadamente 100 veces superior, el péptido UFP-112 se usa en dosis que comprenden entre 0.001 y 0.1 nmol y N/OFQ se utilizó a dosis que comprenden entre 0.1 y 10 nmol.

[0035] En la prueba de retiro de la cola analgesiométrica en ratones, UFP-112 a dosis equi-efectivas imita los efectos del ligando natural N/OFQ, aunque muestra su acción por un periodo más largo (>120 minutos).

[0036] El UFP-112, en el intervalo de dosis entre 0.001-0.1 nmol, induce a efectos pronociceptivos, si se inyecta por la vía intracerebroventricular (i.c.v.), mientras que provoca efectos antinociceptivos cuando se administra

intratecalmente (i.t.)(ver Figura 1). Los efectos similares (similar a los que se encuentra con N/OFQ) son mediados por la activación del receptor NOP porque los mismos están ausentes en ratones NOP^{-/-}.

5 [0037] El N/OFQ y UFP-112 a dosis equiefectivas se examinaron en la prueba de absorción de alimentos por ratones alimentados. Ambos compuestos inducen un incremento significativo de absorción de alimentos, y también en estos ensayos UFP-112 prueba ser 100 veces más potente que N/OFQ. En esta prueba, los efectos hiperfágicos de N/OFQ y UFP-112 son exclusivamente debido a la activación del receptor NOP porque tales efectos estuvieron presentes en ratones NOP^{+/+} pero ausentes en ratones NOP^{-/-}.

10 [0038] Para investigar la duración de UFP-112 activo in vivo, se realizaron experimentos en ratones que comparan la duración (de 5:30 p.m. a 7:30 a.m.) del efecto de dosis equiefectivas de N/OFQ (10 nmol) y UFP-112 (0.1 nmol), ambos se administran i.c.v., en la actividad locomotora espontánea. Ambos péptidos inhiben la actividad locomotora, pero el efecto de N/OFQ finaliza 60 minutos después de la inyección i.c.v. mientras que el efecto inducido por UFP-112 finaliza después de aproximadamente 6 h (ver Figura 2).

15 4. Estabilidad metabólica de N/OFQ y de los nuevos derivados UFP-111, UFP-112 y UFP-113 en tejidos homogeneizados de cerebro y en el plasma.

20 [0039] Las muestras de plasma y tejido de cerebro se obtuvieron a partir de ratones Suizos machos (Morini, Reggio Emilia, Italia, 25-30 g). El animal, sacrificado por anestesia con éter, se perfusionó con solución de heparina fisiológica inyectada a través de una aguja colocada en el ventrículo izquierdo. La sangre se sacó entonces y se centrifugó a 14000 xg por 2 minutos a temperatura ambiente. Después de la separación de la pelotilla, se tomó una alícuota del plasma y se almacenó a -80°C. Después del retiro de la sangre, el animal se perfusionó además con una solución fisiológica por 2 minutos antes de la remoción del cerebro. El tejido del cerebro se homogeneizó en 5 vol. (p/v) de Tris/HCl (50 mM, pH 7.4, 0°C) con un ultra-Turrax (Janke Kunkel, Staufen, FRG) 3 veces por 15 segundos cada uno. El sobrenadante obtenido por centrifugación (3000 xg por 15 minutos a 4°C) se decantó y almacenó a -80°C.

25 [0040] El contenido de proteína de las preparaciones, determinado por el método Bradford, como se describe en Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976, fue aproximadamente 8 µg/µl para el tejido homogeneizado de cerebro y 17 µg/µl para el plasma.

30 [0041] Una alícuota de 100 µl de solución de cada péptido (3 mg/500 µl de Tris) se incubó (a una concentración final de 6 µg/µl) con tejido homogeneizado de cerebro o plasma (450 µl) en un volumen total de 1 ml, conteniendo amortiguador Tris/HCl 50 mM pH 7.4. La incubación de las alícuotas se realizó a 37°C por varios periodos de hasta 240 minutos. En tiempos de incubación diferentes, una alícuota de la solución (100 µl) se removió y la degradación se bloqueó por adición de 4.5% de solución TFA (200 µl). Después de la centrifugación (3000 rpm por 15 minutos) una alícuota (100 µl) de sobrenadante se inyectó en RP-CLAR. El análisis de CLAR se realizó en una columna Kromasil 100-5C18 (4.6 x 250 mm) usando un sistema de cromatografía Beckman System Gold equipado con un detector de UV de longitud de onda variable.

35 [0042] Las condiciones experimentales para elución incluyen un análisis de gradiente con agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), ambos contienen 0.1% de TFA, a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min. El protocolo siguiente se utilizó para análisis de gradiente, seleccionado de la base de las características fisico-químicas del analito: gradiente lineal de 5% a 40% B en 20 minutos; gradiente lineal desde 40% a 60% B en 5 minutos; gradiente lineal de 60% a 5% B en 5 minutos. El eluido se observó a 220 nm. El promedio de vida (T_{1/2}) se obtuvo por regresión lineal con el método de mínimos cuadrados, que diagraman las áreas pico de cada derivado como una función de los periodos de incubación, usando al menos cinco puntos para cada análisis.

40 [0043] Los datos se muestran en la Tabla 3 como promedio±desviación estándar, y se obtienen de al menos 3 experimentos separados.

Tabla 3. T_{1/2} (min) de N/OFQ y derivados en el plasma de ratón y tejido de cerebro

	Plasma	Cerebro
N/OFQ	64 ± 1	3.2 ± 1.8
UFP-111	137 ± 4	11.0 ± 1.9
UFP-112	167 ± 9	11.3 ± 1.4
UFP-113	110 ± 10	12.3 ± 0.8

45 [0044] N/OFQ muestra promedios de vida en el plasma de aproximadamente 1 h, los cuales son muy diferentes comparados con aquellos obtenidos con el tejido homogeneizado de cerebro, el cual fue aproximadamente 3 minutos. Todos los péptidos estudiados de acuerdo con la invención exhiben promedios de vida significativamente más largos comparados con el péptido natural. En particular, el T_{1/2} del plasma de UFP-111 y UFP-113 es aproximadamente dos veces mientras que N/OFQ, aunque el T_{1/2} de UFP-112 es casi tres veces más largo que

N/OFQ.

[0045] Los promedios de vida más largos exhibidos por los derivados, cuando se compara con N/OFQ, fueron más pronunciados en tejido homogeneizado de cerebro que en plasma. En efecto, el T_{1/2} de todos los derivados fue de 3 veces más largo que el valor exhibido por N/OFQ (3 minutos) en el tejido de cerebro.

[0046] Los datos muestran que las modificaciones químicas de secuencias de UFP-111, 112 y 113 incrementan su potencia como agonistas o antagonistas, comparado con N/OFQ: tales modificaciones modulan su eficacia en el receptor NOP y determinan una reducción importante de susceptibilidad a degradación por peptidasas presentes tanto en el plasma como en tejido de cerebro. Esta característica importante es ciertamente crucial para prolongar la acción de estas moléculas in vivo, como se documenta bien para UFP-112 en las series de experimentos resumidos en la sección 3 (en estudios in vivo).

5. Cinéticas de los efectos inhibidores de UFP-112 en *vas deferens* de ratón.

[0047] En los *vas deferens* de ratón eléctricamente estimulados, tanto la cinética de acción de UFP-112 como la reversibilidad de los efectos después del lavado fueron mucho más inferiores que con N/OFQ (ver figura 3). Esto se mostró por el efecto inhibitor en contracción de *vas deferens* inducida por estimulación eléctrica. Conjuntamente con los datos de estabilidad metabólica, esto pudo explicar la acción in vivo más larga de UFP-112 comparado con el ligando endógeno N/OFQ.

6. Actividad biológica de algunos compuestos de la fórmula I en los *vas deferens* de ratón después de la estimulación eléctrica.

[0048] La Tabla 4 resume los resultados obtenidos en los *vas deferens* de ratón después de la estimulación eléctrica, en presencia de una serie de compuestos de la fórmula I, realizando diferentes modificaciones químicas en la posición 7 y 11 del modelo agonista N/OFQ-NH₂. Estos datos muestran que diferentes reemplazos de aminoácido no cambian la eficacia de los compuestos los cuales actúan todos como agonistas completos pero en algunos casos (por ejemplo [Ac₅C¹¹]N/OFQ-NH₂ y [D/L-Iva¹¹]N/OFQ-NH₂) incrementan la potencia comparada con la secuencia de referencia. Se debe señalar que el incremento en potencia, obtenido como resultado de estas modificaciones individuales (2 veces comparado con la secuencia de referencia), es más bajo que el incremento en potencia obtenido como resultado de la modificación combinada en diferentes posiciones, como en el compuesto UFP-112 (tabla 1), cuya potencia se incrementa más de 100 veces.

Tabla 4: Potencia, como se mide en *vas deferens* de ratón, eléctricamente estimulado, de una serie de compuestos con fórmula general I obtenida con varias modificaciones químicas en la posición 7 y 11.

Compuesto	pEC ₅₀ (CL 95%)	E _{max}
N/OFQ-NH ₂	7.80 (7.74-7.86)	93 ± 2%
[Ac ₃ C ⁷]N/OFQ-NH ₂	7.08 (6.82-7.34)	98 ± 1%
[Ac ₅ C ⁷]N/OFQ-NH ₂	7.60 (7.40-7.80)	98 ± 1%
[Ac ₆ C ⁷]N/OFQ-NH ₂	7.20 (6.86-7.54)	87 ± 1%
[(αMe)D/L-Val ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 1)	7.26 (7.00-7.52)	88 ± 1%
[(αMe)D/L-Val ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 2)	7.56 (7.34-7.78)	95 ± 1%
[(αMe)D/L-Leu ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 1)	7.33 (7.04-7.62)	84 ± 1%
[(αMe)D/L-Leu ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 2)	7.12 (7.02-7.22)	95 ± 2%
[Iva ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 1)	7.83 (7.74-7.92)	91 ± 4%
[Iva ⁷]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 2)	7.62 (7.32-7.92)	88 ± 3%
[Deg ⁷]N/OFQ-NH ₂	7.91 (7.53-8.27)	89 ± 2%
[Dpg ⁷]N/OFQ-NH ₂	7.90 (7.71-8.11)	91 ± 4%
[Ac ₅ C ¹¹]N/OFQ-NH ₂	7.78 (7.62-7.94)	91 ± 4%
[Ac ₅ C ¹¹]N/OFQ-NH ₂	8.08 (7.93-8.23)	89 ± 4%
[Ac ₅ C ¹¹]N/OFQ-NH ₂	7.79 (7.53-8.05)	89 ± 4%
[(αMe)D/L-Val ¹¹]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 1)	7.71 (7.37-8.05)	93 ± 2%
[(αMe)D/L-Val ¹¹]N/OFQ-NH ₂ (diastereómero 2)	7.83 (7.67-7.99)	86 ± 4%
[(αMe)D/L-Leu ¹¹]N/OFQ-NH ₂	7.87 (7.67-8.07)	91 ± 4%
[D/L-Iva ¹¹]N/OFQ-NH ₂	8.12 (7.78-8.46)	90 ± 4%
[Deg ¹¹]N/OFQ-NH ₂	7.75 (7.43-7.89)	87 ± 4%
[Dpg ¹¹]N/OFQ-NH ₂	7.53 (7.17-8.04)	86 ± 3%

LISTA DE SECUENCIAS

[0049]

1. PheGlyGlyPheThrGlyAlaArgLysSerAlaArgLysLeuAlaAsnGln(OH)

2. **Xaa-Ψ-Gly-Gly-Xbb-Thr-Gly-Xcc-Arg-Lys-Ser-Xdd-Arg-Lys-Xee-Xff-R**

Xaa se elige entre Phe o N-bencil-glicina (Nphe);

Ψ representa el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácido y se elige entre CO-NH y CH₂-NH y CH₂-O;

5 **Xbb** pXPhe donde "X" se elige entre H, Cl, Br, I, F, NO₂ y CN y "p" indica la posición para en el anillo fenilo de Phe;

Xcc y **Xdd** se eligen entre Ala; ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib); ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva); ácido 2-amino-2-etil-butírico (Deg); ácido 2-amino-2-propil-pentanoico (Dpg); (CaCH₃)Leu; (CaCH₃)Val; ácido 1-amino-ciclopropan-carboxílico (Ac_{3c}); ácido 1-amino-ciclopentan-carboxílico (Ac_{5c}) y ácido 1-amino-ciclohexan-carboxílico (Ac_{6c});

10 **Xee** y **Xff** se eligen entre Arg; Lys; Orn; omoArg; ácido diaminobutírico; ácido diaminopropiónico y Trp;
R representa el dipéptido Asn-Gln-NH₂ o Asn-Gln-OH o el aminoácido Asn con ya sea una amida (-NH₂) o un grupo carboxílico (-OH) terminal o un amino (-NH₂) o un grupo hidroxilo (-OH) terminal.

3. **Xaa-Ψ-Gly-Gly-Xbb-Thr-Gly-Xcc-Arg-Lys-Ser-Xdd-Arg-Lys-Xee-Xff-R Xaa** se elige entre Phe o N-bencil-glicina (Nphe);

Ψ representa el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácido y se elige entre CO-NH y CH₂-NH y CH₂-O;

Xbb es pXPhe donde "X" se elige entre H, Cl, Br, I, F, NO₂ y CN y "p" indica la posición para en el anillo fenilo de Phe;

20 **Xcc** se elige entre ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib); ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva); ácido 2-amino-2-etil-butírico (Deg); ácido 2-amino-2-propil-pentanoico (Dpg); (CaCH₃)Leu; (CaCH₃)Val; ácido 1-amino-ciclopropan-carboxílico (Ac_{3c}); ácido 1-amino-ciclopentan-carboxílico (Ac_{5c}) y ácido 1-amino-ciclohexan-carboxílico (Ac_{6c});

25 **Xdd** se elige entre Ala; ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib); ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva); ácido 2-amino-2-etil-butírico (Deg); ácido 2-amino-2-propil-pentanoico (Dpg); (CaCH₃)Leu; (CaCH₃)Val; ácido 1-amino-ciclopropan-carboxílico (Ac_{3c}); ácido 1-amino-ciclopentan-carboxílico (Ac_{5c}) y ácido 1-amino-ciclohexan-carboxílico (Ac_{6c});

Xee y **Xff** se eligen entre Arg; Lys; Orn; omoArg; ácido diaminobutírico; ácido diaminopropiónico y Trp;

30 **R** representa el dipéptido Asn-Gln-NH₂ o Asn-Gln-OH o el aminoácido Asn con ya sea una amida (-NH₂) o un grupo carboxílico (-OH) terminal o un amino (-NH₂) o un grupo hidroxilo (-OH) terminal

4. **Phe-Ψ-Gly-Gly-Xbb-Thr-Gly-Xcc-Arg-Lys-Ser-Xdd-Arg-Lys-Arg-Lys-R**

Ψ representa el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácido y se elige entre CO-NH y CH₂-NH y CH₂-O;

Xbb es pXPhe donde "X" se elige entre H, F y NO₂ y "p" indica la posición para en el anillo fenilo de Phe;

35 **Xcc** se elige entre ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib); ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva) y ácido 1-amino-ciclopentan-carboxílico (Ac_{5c});

Xdd se elige entre Ala; ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib); ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva) y ácido 1-amino-ciclopentan-carboxílico (Ac_{5c});

R representa el dipéptido Asn-Gln-NH₂ al aminoácido Asn con un grupo amida (-NH₂) terminal o un grupo amino (-NH₂) terminal.

5. **NPhe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Xcc-Arg-Lys-Ser-Xdd-Arg-Lys-Arg-Lys-R**

Xcc se elige entre ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib) o ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva);

Xdd se elige entre Ala, ácido 2-amino-2-metil-propiónico (Aib) o ácido 2-amino-2-metil-butírico (Iva);

R representa el dipéptido Asn-Gln-NH₂ o un grupo amino (-NH₂) terminal.

45 6. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

7. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

8. Phe(Ψ CH₂NH)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

9. Phe(Ψ CH₂-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

10. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys

50 11. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys

12. Phe(Ψ CH₂-NH)GlyGly(pF)PFPhThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys

13. Phe(Ψ CH₂-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys

14. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln

15. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln

55 16. Phe(Ψ CH₂-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln

17. Phe(Ψ CH₂-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln

18. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys

19. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys

20. Phe(Ψ CH₂-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys

60 21. Phe(Ψ CH₂-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys

22. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

23. PheGlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

24. Phe(Ψ CH₂-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

25. Phe(Ψ CH₂-O)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln

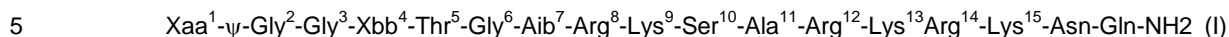
65 26. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys

27. PheGlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys

28. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 29. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 30. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 5 31. PheGlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 32. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 33. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 34. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 35. PheGlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 10 36. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 37. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pF)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 38. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 39. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 40. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 41. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 15 42. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 43. PheGlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 44. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 45. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pF)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 20 46. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 47. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 48. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 49. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 50. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys
 25 51. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys
 52. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys
 53. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAlaArgLysArgLys
 54. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 55. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 30 56. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 57. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 58. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys
 59. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys
 60. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys
 35 61. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerAibArgLysArgLys
 62. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 63. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 64. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 65. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLysAsnGln
 40 66. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 67. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 68. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 69. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAlaArgLysArgLys
 70. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 45 71. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 72. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 73. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLysAsnGln
 74. NpheGlyGlyPheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 75. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 50 76. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 77. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyIvaArgLysSerAibArgLysArgLys
 78. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 79. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 80. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 81. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLysAsnGln
 55 82. NpheGlyGlyPheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 83. PheGlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 84. Phe(Ψ CH2-NH)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 85. Phe(Ψ CH2-O)GlyGly(pNO2)PheThrGlyAibArgLysSerIvaArgLysArgLys
 60

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de péptido N/OFQ que tiene la fórmula general (I)



donde:

10 cuando Xaa¹ es Phe, ψ representa el enlace entre los primeros dos residuos de aminoácido y es CO-NH, Xbb⁴ es pFPhe donde "p" indica la posición para en el anillo fenilo de Phe;

o
cuando Xaa¹ es Phe, ψ es CH₂-NH, Xbb⁴ es pFPhe;

15 o
cuando Xaa¹ es N-bencil-glicina (Nphe), ψ es CO-NH y Xbb⁴ es Phe.

2. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Xaa¹ es Phe, ψ es CO-NH y Xbb⁴ es pFPhe.

20 3. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Xaa¹ es Phe, ψ es CH₂-NH y Xbb⁴ es pFPhe.

4. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que dicho análogo de péptido N/OFQ actúa como un agonista del receptor NOP.

25 5. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Xaa¹ es N-bencil-glicina (Nphe), ψ es CO-NH y Xbb⁴ es Phe.

6. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho análogo de péptido N/OFQ actúa como un antagonista del receptor NOP.

30 7. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso médico.

8. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de disfunciones neurológicas y neurosensoriales.

35 9. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de disfunciones neurológicas y neurosensoriales en el que dichas disfunciones neurológicas y neurosensoriales son disfunciones de la motilidad del músculo liso de los tractos gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.

40 10. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dichas disfunciones de la motilidad del músculo liso del tracto genitourinario se eligen entre el grupo constituido por incontinencia de vejiga urinaria neurogénica e hiperactividad de vejiga urinaria.

45 11. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para uso en el tratamiento o la prevención de disfunciones neurológicas y neurosensoriales en el que dichas disfunciones neurológicas y neurosensoriales son disfunciones de memoria y de estado de ánimo, disfunciones de actividad locomotriz o trastornos de la ingesta de alimentos.

50 12. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 11, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de hipertensión, taquicardia, trastornos de retención de agua, hiponatremia, falla cardíaca, disfunción de la motilidad del músculo liso en los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, estados inflamatorios, analgesia periférica o espinal, tratamiento de dolor crónico y para la atenuación de la tos.

55 13. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 11, para uso en el tratamiento de hipertensión, taquicardia, trastornos de retención de agua, hiponatremia, falla cardíaca, disfunción de la motilidad del músculo liso en los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, estados inflamatorios, analgesia periférica o espinal, tratamiento de dolor crónico y para la atenuación de la tos.

60 14. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de incontinencia de vejiga urinaria neurogénica, hiperactividad de vejiga urinaria, disfunción respiratoria y tratamiento de dolor crónico.

65 15. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de disfunciones de memoria y de estado de ánimo, disfunción de actividad locomotriz o trastornos de la ingesta de alimentos.

16. El análogo de péptido N/OFQ de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de disfunciones de memoria y de estado de ánimo, disfunción de actividad locomotriz o trastornos de la ingesta de alimentos.

Figura 1:

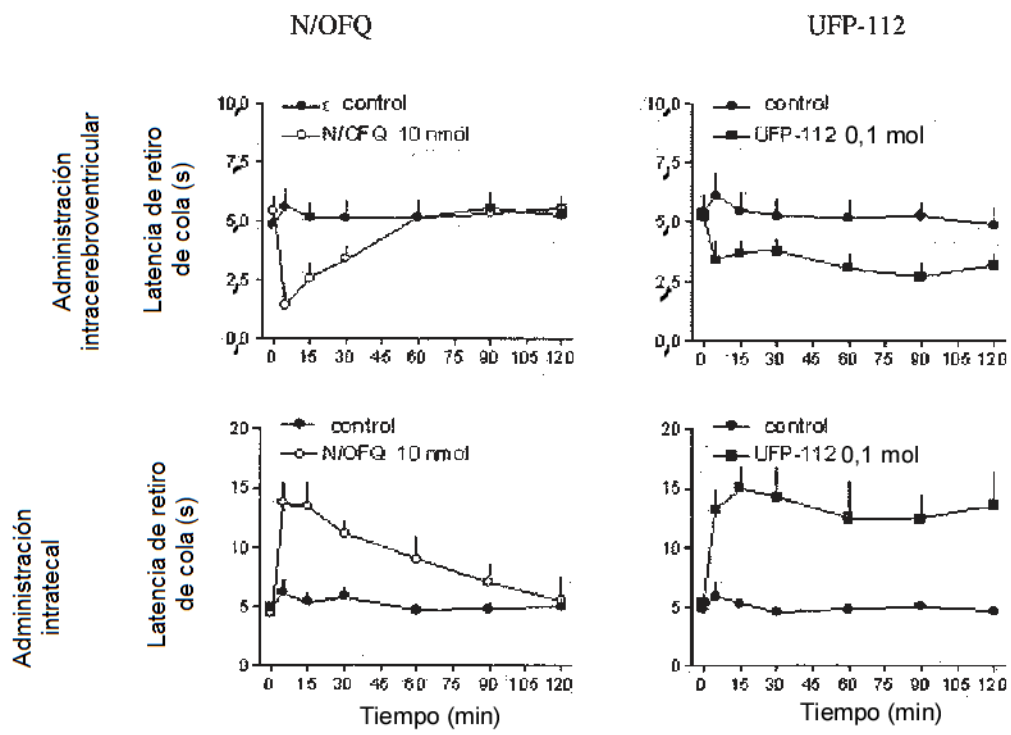


Figura 2:

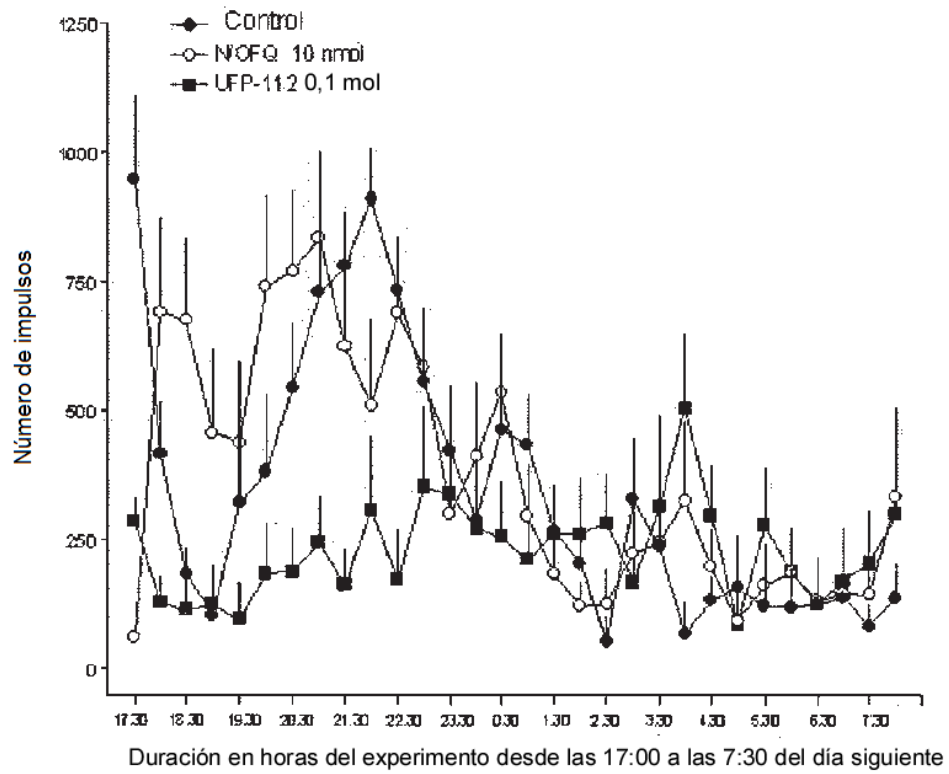


Figura 3:

