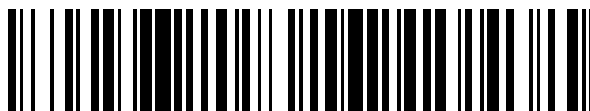


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 143**

51 Int. Cl.:

A61K 38/11 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/02 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
C07K 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2007 E 07804708 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1984012**

54 Título: **Uso de agonistas peptídicos de receptor de vasopresina**

30 Prioridad:

13.02.2006 US 772528 P

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

11.04.2016

73 Titular/es:

**FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue, 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

**LAPORTE, REGENT y
RIVIÈRE, PIERRE J.-M.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 566 143 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

Uso de agonistas peptídicos del receptor de la vasopresina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de compuestos novedosos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, entre otros, de afecciones asociadas a los cuidados intensivos, así como a un procedimiento de tratamiento de dichas afecciones en el que se administran dichos compuestos.

Antecedentes

10 Los agonistas peptídicos del receptor de vasopresina V1a, tales como terlipresina, han recibido últimamente una atención aumentada (véase, p.ej., O'Brian et al., Lancet 359 (9313): 1209-10, 4 de junio de 2002) para uso clínico en el tratamiento de enfermedades y afecciones de cuidados intensivos, incluyendo choque de origen hipovolémico (p.ej., hemorrágico) o vasodilatador (p.ej., séptico), varices esofágicas sangrantes (VES), síndrome hepatorenal (SHR), reanimación cardiopulmonar e hipotensión inducida por anestesia. Se ha mostrado también que tienen uso clínico en el tratamiento de hipotensión ortostática, disfunción circulatoria inducida por paracentesis, pérdida de sangre intraoperativa y pérdida de sangre asociada al desbridamiento de quemaduras y epistaxia.

15 En el tratamiento de afecciones de cuidados intensivos, es altamente deseable controlar la presión sanguínea arterial, y el fármaco usado se administra típicamente por vía intravenosa. La infusión intravenosa continua a velocidades crecientes o decrecientes es un medio práctico de proporcionar el grado de control deseado. El logro de las denominadas concentraciones plasmáticas del fármaco "de estado estacionario" depende de la semivida de eliminación del fármaco infundido. Se reconoce generalmente que se consigue la concentración plasmática de estado estacionario después de un periodo de tiempo equivalente a 3 veces la semivida de eliminación del fármaco. Para que sea práctico en un entorno clínico, debería alcanzarse la presión sanguínea arterial deseada en estado estacionario en aproximadamente 2 horas, preferiblemente en 1 hora o menos. Por lo tanto, los agonistas de V1a con una semivida de eliminación mayor de 1 hora habitualmente no son considerados útiles para el tratamiento de cuidados intensivos.

25 Es una desventaja de la terlipresina en muchas situaciones de cuidados intensivos su larga duración de acción, lo que hace difícil titular su efecto a medida que cambia el estado patológico. Los metabolitos de terlipresina tienen actividad agonista en el receptor V1a humano (hV1a).

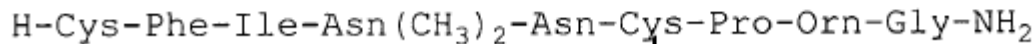
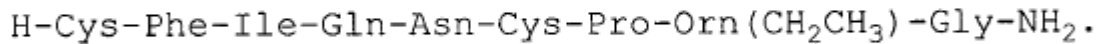
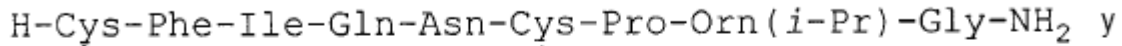
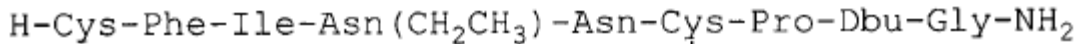
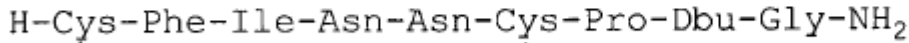
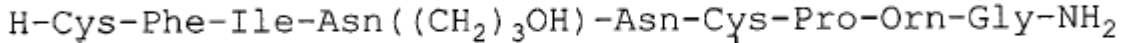
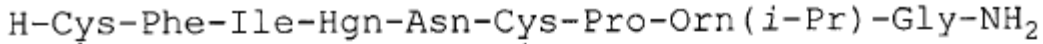
30 También el compuesto conocido como F180 (véase el ejemplo 3 de la patente de EE.UU. nº 5.459.236) tiene una duración de acción inconvenientemente larga para ser considerado para el tratamiento de la mayoría de las afecciones de cuidados intensivos.

35 La actividad agonista de receptor no específica es la desventaja principal de otros compuestos existentes, p.ej. [Phe²,Orn⁸]OT (véase el Ejemplo 1f de la patente de EE.UU. nº 3.352.843) y la arginina-vasopresina (AVP). La actividad en receptores relacionados tales como V1b, V2 y receptores de oxitocina (OT) puede generar potencialmente efectos secundarios indeseables y problemas de seguridad. Como ejemplo, la activación del receptor V2 puede inducir antidiuresis (véase la desmopresina) y liberación de factores de coagulación/trombólisis e inducir vasodilatación/hipotensión con taquicardia refleja. Este último efecto secundario puede inducirse también por la actividad agonista del receptor de OT.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar el uso de compuestos especialmente en el tratamiento de afecciones asociadas a cuidados intensivos, así como proporcionar usos adicionales de dichos compuestos.

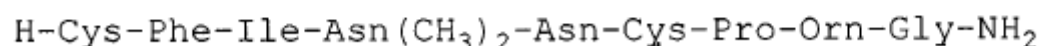
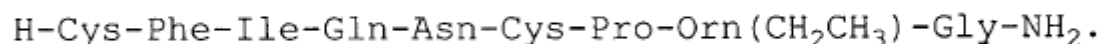
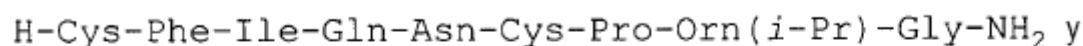
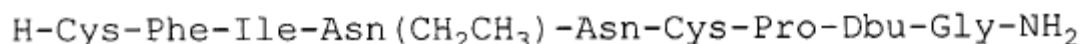
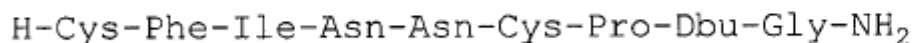
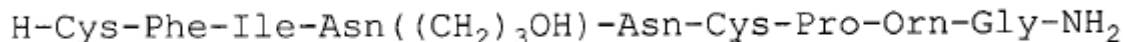
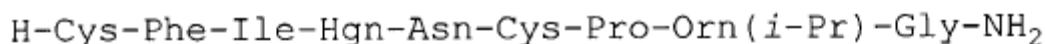
40 Divulgación de la invención

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



5 para uso en el tratamiento de hemorragia por gastropatía hipertensiva, sepsis, sepsis grave, choque séptico, hipotensión prolongada y grave, hipotensión intradialítica, parada cardíaca, pérdida de sangre relacionada con un traumatismo, choque vasodilatador inducido por derivación cardiopulmonar, choque vasodilatador inducido por milrinona en insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome hepatorenal de tipo I, choque anafiláctico, inestabilidad cardiovascular inducida por muerte cerebral, para el tratamiento de hipotensión en sepsis grave, síndrome de dificultades respiratorias agudas o lesión pulmonar aguda, o para el tratamiento de una oxigenación de tejido inadecuada, choque inducido por intoxicación con metformina, enfermedad mitocondrial o envenenamiento con cianuro, síndrome de fuga vascular inducido por interleucina 2 u otras citocinas, denileucina difitox u otras
 10 inmunotoxinas, o síndrome de hiperestimulación ovárica, hipertensión inducida por enfermedad renal en etapa terminal, quemaduras graves, lesión térmica, lesión por reperfusión, ascitis, síncope vasodepresor incluyendo síncope vasovagal, hipotensión postural con síncope o síncope neurocardiogénico, síndrome del choque tóxico o síndrome de fuga capilar sistémica idiopática (enfermedad de Clarkson).

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



para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hemorragia por gastropatía hipertensiva, sepsis, sepsis grave, choque séptico, hipotensión prolongada y grave, hipotensión intradialítica, parada cardíaca, pérdida de sangre relacionada con un traumatismo, choque vasodilatador inducido por derivación cardiopulmonar, choque vasodilatador inducido por milrinona en insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome hepatorenal de tipo I, choque anafiláctico, inestabilidad cardiovascular inducida por muerte cerebral, para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hipotensión en sepsis grave, síndrome de dificultades respiratorias agudas o lesión pulmonar aguda, o para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una oxigenación de tejido inadecuada, choque inducido por intoxicación con metformina, enfermedad mitocondrial o envenenamiento con cianuro, síndrome de fuga vascular inducido por interleucina 2 u otras citocinas, denileucina diftotox u otras inmunotoxinas, o síndrome de hiperestimulación ovárica, hipertensión inducida por enfermedad renal en etapa terminal, quemaduras graves, lesión térmica, lesión por reperfusión, ascitis, síncope vasodepresor incluyendo síncope vasovagal, hipotensión postural con síncope o síncope neurocardiogénico, síndrome del choque tóxico o síndrome de fuga capilar sistémica idiopática (enfermedad de Clarkson).

Para más detalles sobre las indicaciones y afecciones anteriores, véanse p.ej. las referencias Bruha, R. *et al.* Hepatogastroenterology 49: 1161-1166, 2002; Landry, D.W. *et al.* Circulation 95: 1122-1125, 1997; Argenziano, M. *et al.* Circulation 96: II-286-II-290, 1997; Landry, D.W. *et al.* solicitud de patente de EE.UU. publicada con el nº 2004-229798; Wenzel, V. *et al.* N. Engl. J. Med. 350: 105-113, 2004; Okin, C.R. *et al.* Obstet. Gynecol. 97: 867-872, 2001; Gold, J. *et al.* Am. J. Cardiol. 85: 506-508, 2000; Sharma, R.M. y Setlur, R. Anest. Analg. 101: 833-834, 2005; Solanik, P. *et al.* J. Gastroenterol. Hepatol. 18: 152-156, 2000; Yoshioka, T. *et al.* Neurosurgery 18: 565-567, 1986; Kill, C. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol. 134: 260-261, 2004; Westphal, M. *et al.* "Annual Congress of the Society of Critical Care Medicine", resumen nº 196470, 2006; Landry, D.W. y Oliver, J.A. N. Engl. J. Med. 345(8): 588-595, 2001; Baluna, R. y Vitetta, E.S. Immunopharm. 37: 117-132, 1997; Delbaere, A. *et al.* Endocrine. 26: 285-290, 2005; Agarwal, R. Cardiol. Clin. 23: 237-248, 2005; Demling, R.H. J. Burn Care Rehabil. 26: 207-227, 2005; Bonder, C.S. y Kubes, P. Am. J. Physiol. 284: 729-733, 2003; Seal, J.B. y Gewertz, B.L. Ann. Vasc. Surg. 19: 572-584, 2005; Zaban, P., Cerny, M. Physiol. Res. 52: 507-516, 2003; Bermejo, J.F. y Muñoz-Fernández, M.A. Viral Immunol. 17: 535-544, 2004; Arroyo, V. Ann. Hepatol. 1: 72-79, 2002; Hainsworth, R. Clin. Auton. Res. 14 Supl 1: 18-24, 2004; Chuang, Y.Y. *et al.* Paediatr. Drugs. 7: 11-25, 2005; Cau, C. Minerva Med. 90: 391-396, 1999.

Con los fines de la presente invención, se usa la siguiente terminología.

Los sistemas de anillo carbocíclico aromático incluyen fenilo y naftilo.

Un sistema de anillo heteroaromático de 5 miembros es un sistema de anillo aromático monocíclico que tiene 5 átomos de anillo, en el que 1, 2 o 3 átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Dichos sistemas de anillo preferidos se seleccionan del grupo que consiste en tienilo, furilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

- 5 Un sistema de anillo heteroaromático de 6 miembros es un sistema de anillo aromático monocíclico que tiene 6 átomos, en el que 1, 2 o 3 átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, triazinilo y piridazinilo.

- 10 Un sistema de anillo heteroaromático bicíclico es un sistema de anillo que tiene dos anillos heteroaromáticos de 5 o 6 miembros, o un fenilo y un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros, o un fenilo y un anillo heterociclilo, o un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros y un anillo heterociclilo; conectados por una fusión de anillo, comprendiendo dicho sistema de anillo heteroaromático bicíclico de 8 a 12 átomos de anillo, en el que 1, 2 o 3 de los átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en indol, quinolina, tetrahydroquinolina, isoquinolina, tetrahydroisoquinolina, 1,4-benzodioxano, cumarina, benzofurano, 1,2-benzoisoxazol, benzotiofeno, benzoxazol, benzotiazol, bencimidazol, benzotriazol, pirlizidina y quinolizidina.

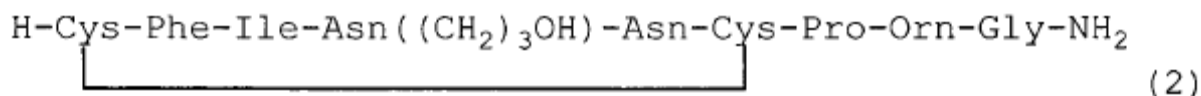
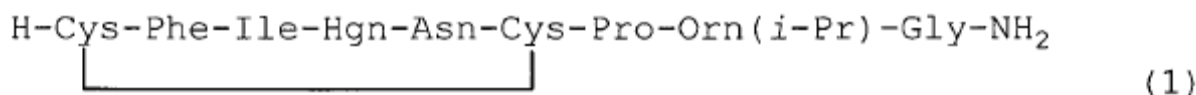
- 15 Un resto heterociclilo o heterocíclico es un sistema de anillo saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 7 átomos de anillo, en el que 1, 2 o 3 átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Los restos heterociclilo se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en aziridina, oxirano, tiirano, azetidina, oxetano, tietano, pirrolidina, pirrolina, imidazolidina, pirazolidina, dioxolano, tetrahydrofuranilo, piperidina, piperazina, morfolina, tetrahidropiraniilo, 1,4-dioxanilo, homopiperidinilo, homopiperazinilo y óxido de hexametileno.

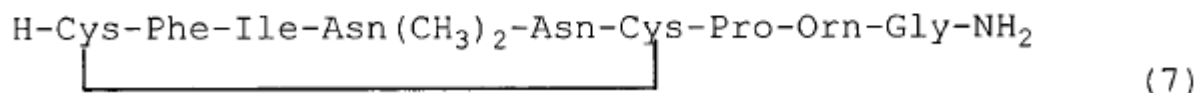
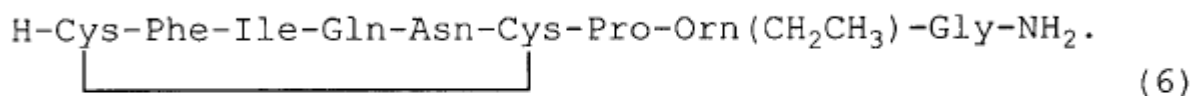
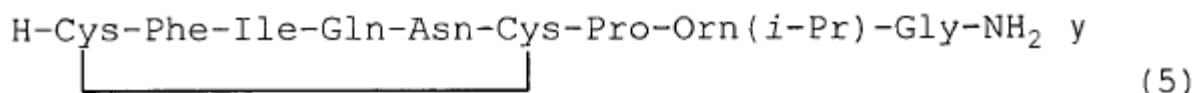
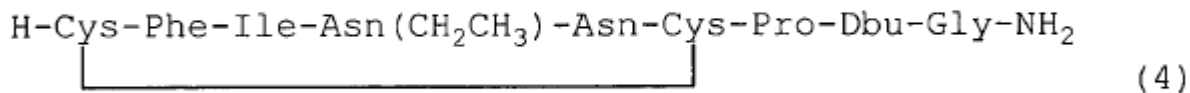
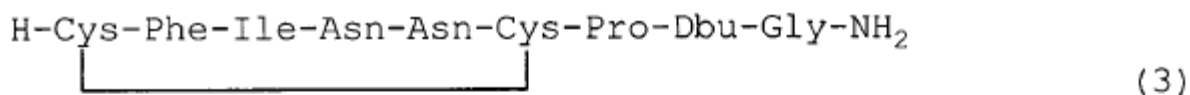
- 20 Cabe señalar que, p.ej., también los grupos isopropilo y 2-n-butilo están englobados por la expresión alquilo C₁₋₆ de cadena lineal, ya que dicha expresión no está relacionada con el sitio de unión de la cadena lineal en cuestión.

C₁₋₆ designa que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, incluyendo cualquier número entre ellos, y se usa esta nomenclatura análogamente en la presente memoria.

- 25 Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables comprenden sales de adición de ácido, p.ej., una sal formada mediante reacción con ácidos hidrohlogenados tales como ácido clorhídrico, y ácidos minerales tales como ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico, así como ácidos sulfónicos o carboxílicos alifáticos, alicíclicos, aromáticos o heterocíclicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido embónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido halogenobencenosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

El compuesto de la invención se selecciona del grupo que consiste en:





El número entre paréntesis designa el compuesto como se referencia a continuación.

5 La composición farmacéutica usada cuando se practica la presente invención puede adaptarse para administración oral, intravenosa, tópica, intraperitoneal, nasal, bucal, sublingual o subcutánea o para administración por el tracto respiratorio, p.ej., en forma de un aerosol o un polvo fino suspendido en el aire. La composición puede estar por tanto por ejemplo en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, micropartículas, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones, parches transdérmicos o supositorios.

10 La composición farmacéutica usada puede comprender opcionalmente, p.ej., al menos un aditivo adicional seleccionado de un agente disgregante, aglutinante, lubricante, agente aromatizante, conservante, colorante y cualquier mezcla de los mismos. Se encuentran ejemplos de dichos y otros aditivos en "Handbook of Pharmaceutical Excipients"; Ed. A.H. Kibbe, 3ª Ed., American Pharmaceutical Association, EE.UU. y Pharmaceutical Press, RU, 2000.

15 La composición farmacéutica usada se adapta lo más preferiblemente para administración parenteral. Puede comprender una preparación acuosa estéril de los compuestos de la invención, preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse según procedimientos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La formulación acuosa inyectable Remestyp® (terlipresina) es ejemplar de un tipo de formulación farmacéutica adecuada. La preparación puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o disolvente, por ejemplo como en solución de 1,3-butandiol. Agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio son diluyentes ejemplares aceptables. Pueden emplearse aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Pueden usarse también aceites no volátiles insípidos, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos tales como ácido oleico.

25 La dosificación típica de los compuestos usados según la presente invención varía dentro de un amplio intervalo y dependerá de diversos factores tales como las necesidades individuales de cada paciente y la vía de administración. La dosificación administrada por infusión está generalmente dentro del intervalo de 0,01-200 µg/kg de peso corporal por hora. Un médico especialista en la técnica será capaz de optimizar la dosificación a la situación en cuestión.

Las abreviaturas usadas son:

Abu	ácido 2-aminobutírico
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitrisdimetilaminofosfonio
30 Dbu	ácido 2,4-diaminobutírico
DCC	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCHA	diclohexilamida

	DCM	diclorometano
	DIAD	diazodicarboxilato de diisopropilo
	DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
	DIEA	<i>N,N</i> -diisopropil- <i>N</i> -etilamina
5	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
	Fm	9-fluorenilmetilo
	Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
	Hgn	homoglutamina
	Hmp	ácido 2-hidroxi-3-mercaptopropiónico
10	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
	<i>i</i>	iso
	Mmt	4-metoxitritilo
	Mob	p-metoxibencilo
15	MS	espectrometría de masas
	Orn	ornitina
	Ph	fenilo
	Pr	propilo
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitrispirrolidinofosfonio
20	o-NBS-Cl	cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo
	OT	oxitocina
	Tr	tiempo de retención
	TFA	ácido trifluoroacético
	TIS	triisopropilsilano
25	TMOF	ortoformiato de trimetilo
	TPP	trifenilfosfina
	Trt	tritilo
	VT	vasotocina, [Ile ³] vasopresina

30 A menos que se especifique otra cosa, se usaron L-aminoácidos y se cumplió la terminología aminoacídica convencional.

Parte experimental (síntesis)

35 Se adquirieron los derivados aminoacídicos y resinas en suministradores comerciales (Novabiochem, Bachem Peptide International y PepTech Corporation). Se sintetizó Fmoc-Hgn-OH según la bibliografía (Wisniewski, K., Kolodziejczyk, A.S. Org. Prep.-Proced. Int. 1997, 29, 338-341). Se proporcionaron otros productos químicos y disolventes por Sigma-Aldrich, Fisher Scientific y VWR.

40 Se sintetizaron los compuestos de la presente memoria mediante procedimientos estándares por química de péptidos en fase sólida, utilizando tanto la metodología de Fmoc como de Boc. A menos que se proporcione otra cosa, se efectuaron todas las reacciones a temperatura ambiente. Además, de las referencias citadas anteriormente, la siguiente bibliografía de referencia estándar proporciona orientación adicional sobre la configuración experimental general, así como sobre la disponibilidad de los materiales de partida y reactivos requeridos:

Kates, S.A., Albericio, F., Eds., "Solid Phase Synthesis. A Practical Guide", Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 2000;

Stewart, J.M., Young, J.D. "Solid Phase Synthesis", Pierce Chemical Company, 1984;

Bisello, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 22498-22505; y

5 Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149-2154.

La pureza del péptido sintetizado puede determinarse mediante HPLC analítica en fase inversa. La integridad estructural de los péptidos puede confirmarse usando análisis aminoacídico y espectrometría de masas por electropulverización.

10 Se escindieron los péptidos sintetizados mediante la metodología de Fmoc con una solución de TFA/TIS/H₂O 96/2/2 (v/v/v), y se logró la escisión con la metodología de Boc con una solución de 90 % de HF/10 % de anisol (v/v). Se consiguió la formación de puentes disulfuro (anillo) mediante la oxidación de péptidos lineales disueltos en TFA al 10 % (ac.) con yodo. Se purificaron los péptidos por HPLC preparativa en tampones de fosfato de trietilamonio (ac.). Se convirtieron finalmente los compuestos en las sales acetato usando metodología de HPLC convencional. Se combinaron las fracciones con una pureza superior al 97 % y se liofilizaron.

15 Síntesis de péptidos con cadena lateral alquilada en posición nº 8:

20 Se ensamblaron los péptidos con la metodología de Fmoc. Se introdujo el residuo diaminoacídico en la posición nº 8 con un grupo protector de ácido lábil (concretamente, retirable con una solución que contiene TFA al 1-2 %), tal como metoxitritilo (Mmt; véanse Barlos, K. *et al.* en *Peptides* 1992, Schneider, C.H., Eberle, A.N., Eds., ESCOM Science Publishers B.V., 1993, pág. 283-284). Se trató el péptido unido a resina con una solución de DCM/TIS/TFA 93/5/2 (v/v/v) para la retirada del grupo Mmt. La alquilación reductiva con acetona/NaBH(OAc)₃ proporcionó el *N*-isopropilpéptido.

25 Para evitar una *N,N*-dialquilación indeseable en la alquilación reductiva del procedimiento anterior, que puede aparecer cuando se usan alquilaldehídos de cadena lineal, se desarrolló una alternativa en la que, después de la retirada de Mmt, se derivatizaba primero el grupo amino con cloruro de 2-nitrobenenosulfonilo (*o*-NBS-Cl; véase Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 6373-6374). Se alquiló entonces la sulfonamida resultante con un alcohol apropiado en condiciones de reacción de Mitsunobu convencionales, típicamente utilizando TPP/DIAD en 1,2-dimetoxietano (Mitsunobu, O. *Synthesis* 1981, 1-28). Se retiró posteriormente el grupo *o*-NBS-Cl con tiofenolato de potasio al 5 % en DMF, después de lo cual se escindió el péptido de la resina.

Síntesis de péptidos con cadena lateral *N*-alquilada en posición nº 4:

30 Se ensamblaron los péptidos con la metodología de Boc. Se introdujo el residuo en la posición nº 4 en la secuencia como Boc-Asp(O_Fm)-OH. Después del ensamblado completo del péptido, se retiró la protección de la cadena lateral con piperidina al 30 % en DMF. Se convirtió el grupo carboxílico libre resultante en la amida deseada por acoplamiento con una amida apropiada mediado por PyBOP o BOP/DIEA. Se retiró entonces el grupo Boc *N*-terminal, seguido de escisión con HF, ciclación y purificación por HPLC.

35 La Tabla 1 enumera los compuestos preparados mediante el procedimiento anterior. R₁ es H para todos los compuestos excepto el nº 7, en que R₁ es CH₃. Un asterisco "*" señala los compuestos de la invención.

Tabla 1. Compuestos preparados con la fórmula (I)

Ar	Sustituyente					Designado
	m	n	R ₂	p	R ₃	
Ph	2	0	H	2	H	8
Ph	3	0	H	3	H	9
Ph	2	0	OCH ₃	3	H	10
Ph	3	0	H	2	H	11
4-piridilo	2	0	H	2	H	12
4-tiazolilo	2	0	H	2	H	13
2-tienilo	2	0	H	2	H	14
3-tienilo	2	0	H	2	H	15

ES 2 566 143 T3

Ar	Sustituyente					Designado
	m	n	R ₂	p	R ₃	
Ph	2	0	OH	3	H	16
2-piridilo	2	0	H	2	H	17
3-piridilo	2	0	H	2	H	18
Ph	2	0	CH ₃	3	H	19
Ph	2	1	CH ₃	3	H	20
Ph	2	1	CH(CH ₃) ₂	3	H	21
Ph	3	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	1*
Ph	3	0	H	2	CH(CH ₃) ₂	22
Ph	1	2	OH	3	H	23
Ph	1	0	OH	3	H	24
2-furilo	2	0	H	3	H	25
Ph	1	3	OH	3	H	2*
2-furilo	2	0	H	2	H	26
Ph	1	0	CH(CH ₂ OH) ₂	3	H	27
Ph	1	1	CH(OH)CH ₃	3	H	28
Ph	1	2	OCH ₂ CH ₂ OH	3	H	29
Ph	1	0	H	3	H	30
Ph	1	0	H	2	H	3*
Ph	1	0	CH ₃	2	H	31
Ph	1	1	CH ₃	2	H	4*
2-furilo	2	0	H	3	H	32
2-tienilo	1	0	H	3	H	33
Ph	2	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	5*
2-tienilo	2	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	34
3-tienilo	1	0	H	3	H	35
2-tienilo	1	0	H	2	H	36
3-tienilo	1	0	H	2	H	37
2-furilo	1	0	H	3	H	38
Ph	2	0	H	3	CH ₃	39
Ph	2	0	H	3	CH ₂ CH ₂ CH ₃	40
Ph	1	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	41
2-furilo	1	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	42
2-tienilo	1	0	H	3	CH(CH ₃) ₂	43

Ar	Sustituyente					Designado
	m	n	R ₂	p	R ₃	
2-furilo	1	0	H	2	H	44
Ph	2	0	H	3	CH ₂ CH ₃	6*
Ph	2	0	H	3	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	45
Ph	1	0	H	3	CH ₃	46
Ph	1	0	H	3	CH ₂ CH ₃	47
Ph	1	0	CH ₃	3	H	7*
Ph	1	1	CH ₃	3	H	48
Ph	1	0	CH ₃	3	H	49
Ph	1	0	H	3	CH ₂ CH ₂ CH ₃	50

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

Compuesto 1; [Phe²,Hgn⁴,Orn(i-Pr)⁸]VT:

5 Los derivados aminoacídicos usados fueron Boc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Hgn-OH, Fmoc-Asn(Trt)OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Orn(Mmt)-OH y Fmoc-Gly-OH. Se sintetizó Fmoc-Hgn-OH como se menciona anteriormente. Se efectuó la HPLC analítica en un cromatógrafo líquido Waters 600 usando una columna Vydac C18, de 5 µm, 4,6 x 250 mm a un caudal de 2 ml/min. Se efectuó la HPLC preparativa en un cromatógrafo líquido Waters 2000 usando un cartucho Prepak de 47 x 300 mm a un caudal de 100 ml/min. Se efectuó el análisis del compuesto final en un cromatógrafo líquido 1100 Agilent usando una columna Vydac C18, de 5 µm, 2,1 x 250 mm a un caudal de 0,3 ml/min. Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro Finnigan MAT.

15 Se sintetizó la resina peptídica totalmente protegida en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 9050 partiendo de 2 g (0,5 mmol) de resina Tentagel-S-RAM (Peptides International). Se efectuaron acoplamientos individuales mediados por DIC/HOBt con un exceso de 4 veces de los derivados aminoacídicos. Se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20 % en DMF. Tras la terminación de la síntesis automatizada, se transfirió la resina a un recipiente de síntesis manual y se trató con solución de DCM/TIS/TFA 93/5/2 (v/v/v) (30 ml) durante 2 x 1,5 horas para la retirada del grupo MMT. Se lavó concienzudamente la resina con DCM y se suspendió posteriormente en 15 ml de 1,2-dicloroetano/TMOF1:1 (v/v). Se añadieron entonces 0,2 ml de acetona seguido de 0,6 g de NaBH(OAc)₃. Se agitó la suspensión durante una noche, se lavó la resina con metanol, DMF y DCM y se secó a vacío. Se trató entonces la resina con 30 ml de solución de TFA/TIS/H₂O 96/2/2 (v/v/v) durante 1,5 horas y se filtró. Se evaporó el filtrado y se precipitó el péptido lineal bruto con dietiléter. Se disolvió inmediatamente el precipitado en 500 ml de TFA al 10 % (ac.) y se oxidó el péptido añadiendo I₂ 0,1 M en metanol a la solución agitada magnéticamente hasta que persistió un color amarillo. Se redujo el exceso de yodo con ácido ascórbico. Se enfrió entonces la mezcla de reacción con hielo triturado y se ajustó el pH a aproximadamente 5 añadiendo amoniaco concentrado (ac.). Se cargó la mezcla en una columna de HPLC y se purificó usando tampón de fosfato de trietilamonio a pH 5,2. Se eluyó el compuesto con un gradiente de acetonitrilo. Se combinaron las fracciones con una pureza superior al 97 % y se diluyó la solución resultante con 2 volúmenes de agua. Se recargó la solución en la columna, que se lavó entonces con 2 l de acetato de amonio 0,1 M (ac.) y se equilibró con ácido acético al 2 % (ac.). Se eluyó el compuesto con un gradiente rápido de acetonitrilo (3 %/min). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y se liofilizaron. Se obtuvieron 168 mg (~30 % de rendimiento) de polvo blanco amorfo. HPLC: Tr= 8,5 min, gradiente: 20→40 % de B durante 20 min, t= 40 °C, disolvente A TFA al 0,01 % (ac.), disolvente B 70 % de CH₃CN, 0,01 % de TFA (ac); pureza: 98,8 %; EM (M+H⁺): 1048,5 esperada, 1048,5 observada.

30 Compuesto 4; [Phe²,Asn(Et)⁴,Dbu⁸]VT :

35 Los derivados aminoacídicos usados fueron Boc-Cys(Mob)OH, Boc-Phe-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OFm)-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Pro-OH, sal de DCHA de Boc-Obu(benciloxicarbonil)-OH y Boc-Gly-OH, todos adquiridos en Novabiochem y Bachem. Se efectuaron las operaciones de HPLC y EM como en la síntesis del compuesto 1.

Se sintetizó manualmente la resina peptídica totalmente protegida partiendo de 0,6 g (0,4 mmol) de resina de 4-metilbenzidrilamina (Novabiochem). Se emplearon acoplamientos individuales mediados por DCC, PyBOP o DIC/HOBt con un exceso de 2,5 veces de derivados aminoacídicos. Se retiró el grupo Boc con TFA al 50 % en DCM

que contiene 1 % de m-cresol. Tras la terminación de la síntesis, se retiró el éster de 9-fluorenilmetilo del grupo β -carboxílico del ácido aspártico mediante tratamiento con piperidina al 30 % en DMF durante 2 x 30 min. Se lavó la resina con solución HOBt 1 M en DMF durante 30 min y entonces dos veces con solo DMF. Se amidó el grupo carboxílico libre mediante tratamiento durante una noche con 2 mmol de etilamina/PyBOP/DIEA en DMF. Se lavó la resina acabada con metanol, DMF y DCM y se secó a vacío. Se escindió el péptido de la resina usando 30 ml de HF anhidro que contiene 3 ml de anisol a 0 °C durante 90 minutos. Se evaporó el HF y se lavó el péptido lineal bruto con dietiléter. Se disolvió inmediatamente el péptido en 200 ml de acetonitrilo al 25 %/TFA al 10 % (ac.) y se oxidó como se describe anteriormente. Se cargó directamente la mezcla resultante en una columna de HPLC y se purificó usando tampón de fosfato de trietilamonio a pH 2,3. Las etapas de purificación posteriores fueron idénticas al procedimiento del compuesto 1. Se obtuvieron 41 mg (~10 % de rendimiento) de polvo blanco amorfo. HPLC: Tr= 10,0 min, gradiente: 20→40 % de B durante 20 min, t= 40 °C, disolvente A TFA al 0,01 % (ac.), disolvente B CH₃CN al 70 % con 0,01 % de TFA (ac.); pureza: 100 %; EM (M+H⁺): 992,5 esperada, 992,2 observada.

Se prepararon los demás compuestos mediante variación análoga de estos procedimientos sintéticos.

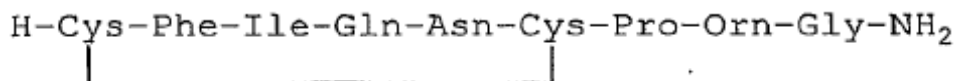
Parte experimental (ensayo biológico)

15 Ensayos de receptor *in vitro*:

Se determinó la actividad agonista de los compuestos sobre el receptor hV1a en un ensayo indicador transcripcional mediante la transfección transitoria de un ADN de expresión del receptor hV1a en células HEK-293 junto con un ADN indicador que contiene elementos promotores sensibles al calcio intracelular que regulan la expresión de luciferasa de luciérnaga. Véase Boss, V., Talpade, D.J., Murphy, T.J. J. Biol. Chem. 3 de mayo de 1996; 271(18), 10429-10432 para orientación adicional sobre este ensayo. Se expusieron las células a diluciones en serie de los compuestos diluidos 10 veces por dosis durante 5 horas, seguido de lisis de las células, determinación de la actividad de luciferasa y determinación de las eficacias y valores de CE₅₀ del compuesto mediante regresión no lineal. Se usó arginina-vasopresina (AVP) como control interno en cada experimento, y se ensayaron los compuestos en al menos tres experimentos independientes. Para determinar la selectividad, se ensayaron los compuestos en ensayos indicadores transcripcionales basados en luciferasa que expresan el receptor de oxitocina humana (hOT). Se realizaron también ensayos para otros receptores (hV2, hV1b, V1a de rata y V2 de rata).

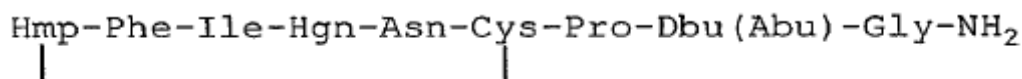
Con fines comparativos adicionales, otros compuestos de referencia usados fueron [Phe²,Orn⁸]OT, terlipresina y F180.

La estructura de [Phe²,Orn⁸]OT es:



30

La estructura de F180 es:



Se representan los resultados de los ensayos *in vitro* en la Tabla 2 a continuación. El valor de CE₅₀ dado es la media geométrica expresada en nanomol/l (nM). Los valores de selectividad se dan como relaciones de CE₅₀.

35 Ensayos farmacológicos *in vivo*:

Se ensayó en los compuestos *in vivo* la duración de la acción respecto a una dosis estándar de AVP. Se llevaron a cabo pruebas de la presión sanguínea en ratas Sprague-Dawley macho anestesiadas (de 270-300 g de peso) con la vena yugular y la arteria carótida cateterizadas. Se usó la arteria carótida cateterizada para monitorizar continuamente la presión sanguínea y se usó la vena yugular para la administración de los compuestos ensayados. Las ratas recibieron inyecciones intravenosas de dibenamina antes de la dosificación para potenciar su sensibilidad a los agonistas de receptor V1a (véase Dekanski, J., Br. J. Pharmacol. 1952, 7, 567-572). El procedimiento de dosificación consistía en una inyección intravenosa de solución salina fisiológica seguida de dos inyecciones consecutivas de una dosis estándar de AVP (0,1 nmol/kg, ≈ DE₇₀), y se seleccionaron de 3 a 5 dosis crecientes de un compuesto dado para dar al menos una respuesta comparable a la dosis estándar de AVP. Los intervalos de dosificación se fijaron como el tiempo para que la presión sanguínea se redujera hasta un valor de referencia estable.

Se basó la determinación de la duración de la acción en la velocidad de declive del aumento transitorio de la presión sanguínea arterial diastólica. Específicamente, para un declive exponencial de la concentración plasmática, puede mostrarse que, si la respuesta se mide más allá de la fase de distribución, la velocidad de declive cerca de la CE₅₀

ES 2 566 143 T3

es lineal e inversamente proporcional a la semivida de eliminación (Rowland, M. y Tozer, T. en "Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Applications", 3ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 1995).

5 Para medir la velocidad de declive de la respuesta para un compuesto dado, se seleccionó una dosis que diera una amplitud de respuesta lo más similar posible a la amplitud de respuesta de la segunda inyección de dosis estándar de AVP. Para normalizar la variación interindividual en la sensibilidad de V1a, se expresó la duración de la acción como la velocidad de declive para esta respuesta de AVP de referencia frente a la velocidad de declive para la dosis equieficaz del compuesto para cada rata ensayada. Los resultados obtenidos para los compuestos ensayados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del ensayo biológico

Compuesto ensayado	CE ₅₀ del receptor hV1a (nM)	Duración <i>in vivo</i> respecto a AVP	Selectividad de hOT/hV1a
8	0,50	-	11
9	0,68	1,5	+
10	1,15	2,3	11
11	2,96	1,9	+
12	24,96	-	+
13	18,77	-	+
14	0,54	-	75
15	0,61	2,2	43
16	11,88	-	+
17	30,29	-	+
18	29,85	-	+
19	5,99	1,6	+
20	39,28	-	+
21	20,66	-	+
1*	2,02	1,7	+
22	18,13	-	+
23	7,97	-	+
24	4,09	-	+
25	1,40	2,0	23
2*	1,18	1,7	+
26	2,24	2,0	28
27	16,21	-	+
28	5,17	-	+
29	4,77	-	+
30	1,45	1,7	+
3*	1,47	1,7	+
31	3,91	-	+

ES 2 566 143 T3

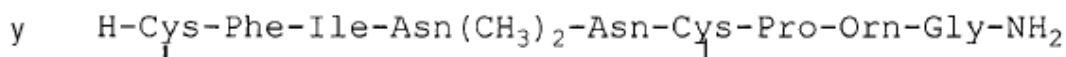
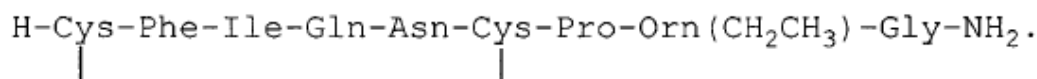
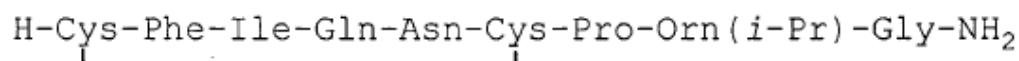
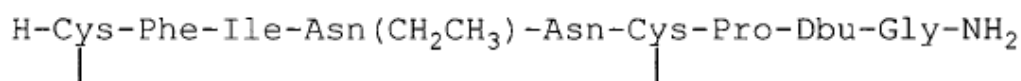
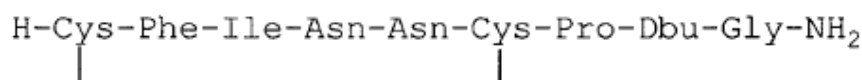
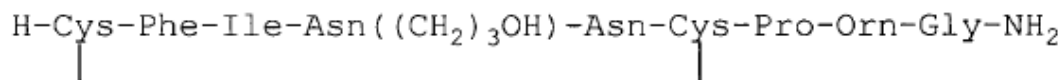
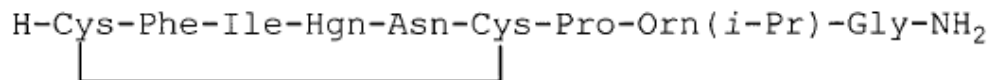
Compuesto ensayado	CE ₅₀ del receptor hV1a (nM)	Duración <i>in vivo</i> respecto a AVP	Selectividad de hOT/hV1a
4*	2,36	1,8	+
32	2,64	2,1	35
33	14,61	-	+
5*	0,25	1,9	117
34	0,73	2,0	72
35	7,30	-	+
36	11,54	-	+
37	7,45	-	+
38	10,11	-	+
39	0,21	1,9	178
40	0,27	2,0	88
41	0,98	2,6	53
42	6,25	-	+
43	6,25	-	+
44	14,48	-	+
6*	0,29	1,9	86
45	1,65	-	18
46	2,41	2,1	+
47	0,99	1,6	+
7*	2,84	-	+
48	5,70	-	+
49	3,58	-	+
50	1,52	2,4	43
[Phe2,Om8]OT	0,15	1,9	60
Terlipresina	82,08	9,1	+
AVP	0,21	0,9	108
F180	0,56	3,8	+

-= no ensayado

+ = agonista selectivo del receptor hV1a; relación de CE₅₀ de hOT/hV1a no determinada debido a la muy baja eficacia agonista (< 30 % en comparación con AVP) en el receptor de hOT.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

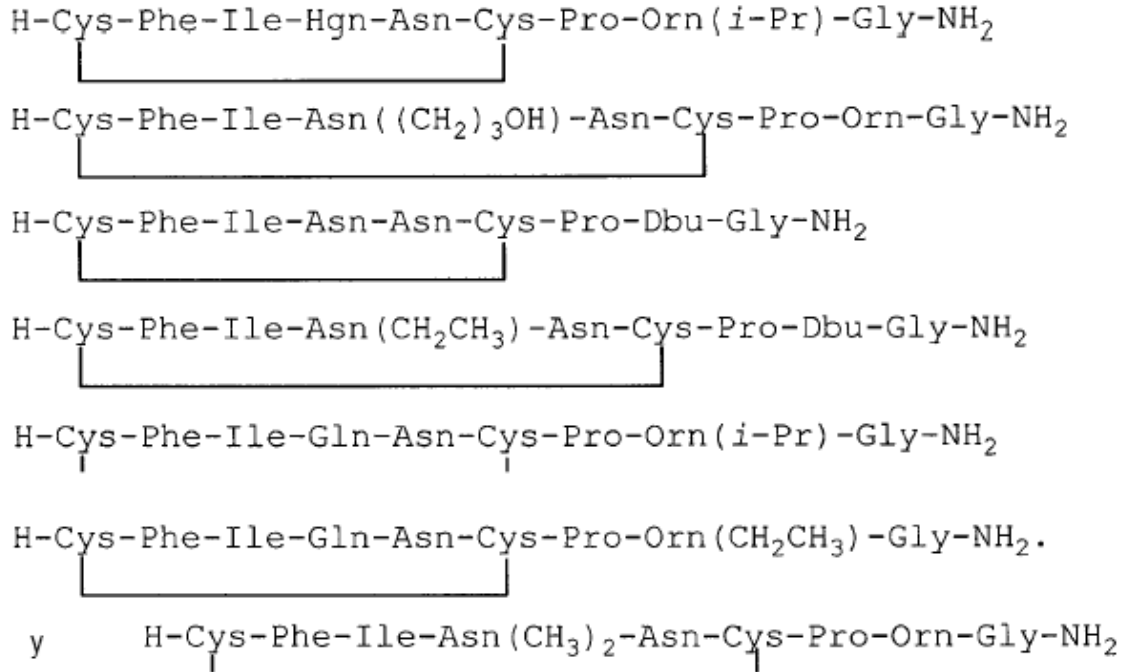


5 para uso en el tratamiento de hemorragia por gastropatía hipertensiva, sepsis, sepsis grave, choque séptico, hipotensión prolongada y grave, hipotensión intradialítica, parada cardíaca, pérdida de sangre relacionada con un traumatismo, choque vasodilatador inducido por derivación cardiopulmonar, choque vasodilatador inducido por milrinona en insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome hepatorenal de tipo I, choque anafiláctico, inestabilidad cardiovascular inducida por muerte cerebral,

10 para uso en el tratamiento de hipotensión en sepsis grave, síndrome de dificultades respiratorias agudas o lesión pulmonar aguda, o

para uso en el tratamiento de una oxigenación de tejido inadecuada, choque inducido por intoxicación con metformina, enfermedad mitocondrial o envenenamiento con cianuro, síndrome de fuga vascular inducido por interleucina 2 u otras, citocinas, denileucina diftotox u otras inmunotoxinas, o síndrome de hiperestimulación ovárica, hipertensión inducida por enfermedad renal en etapa terminal, quemaduras graves, lesión térmica, lesión por reperfusión, ascitis, síncope vasodepresor, incluyendo síncope vasovagal, hipotensión postural con síncope o síncope neurocardiogénico, síndrome del choque tóxico o síndrome de fuga capilar sistémica idiopática (enfermedad de Clarkson).

2. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



5 para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hemorragia por gastropatía hipertensiva, sepsis, sepsis grave, choque séptico, hipotensión prolongada y grave, hipotensión intradialítica, parada cardíaca, pérdida de sangre relacionada con un traumatismo, choque vasodilatador inducido por derivación cardiopulmonar,

 10 choque vasodilatador inducido por milrinona en insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome hepatorenal de tipo I, choque anafiláctico, inestabilidad cardiovascular inducida por muerte cerebral, para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hipotensión en sepsis grave, síndrome de dificultades respiratorias agudas o lesión pulmonar aguda, o para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una oxigenación de tejido inadecuada, choque inducido por intoxicación con metformina, enfermedad mitocondrial o envenenamiento con cianuro, síndrome de fuga vascular inducido por interleucina 2 u otras citocinas, denileucina difitox u otras inmunotoxinas, o síndrome de hiperestimulación ovárica, hipertensión inducida por enfermedad renal en etapa terminal, quemaduras graves, lesión térmica, lesión por reperfusión, ascitis, síncope vasodepresor incluyendo síncope vasovagal, hipotensión postural con síncope o síncope neurocardiogénico, síndrome del choque tóxico o síndrome de fuga capilar sistémica idiopática (enfermedad de Clarkson).