(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 568 063**

(51) Int. CI.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2012 E 12783566 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2773376**

(54) Título: **Profármaco de adrenomedulina basado en polietilenglicol y uso del mismo**

(30) Prioridad:

03.11.2011 EP 11187735

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2016

(73) Titular/es:

BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (50.0%)
Müller Strasse 178
13353 Berlin, DE y
BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH (50.0%)

(72) Inventor/es:

FLAMME, INGO;
KÖBBERLING, JOHANNES;
LERCHEN, HANS-GEORG;
GRIEBENOW, NILS;
SCHOHE-LOOP, RUDOLF;
WITTROCK, SVEN;
KÖLLNBERGER, MARIA;
WUNDER, FRANK;
REDLICH, GORDEN;
KNORR, ANDREAS;
MARLEY, JULY y
PRITCHARD, IAIN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Profármaco de adrenomedulina basado en polietilenglicol y uso del mismo

La invención se refiere a un nuevo profármaco de adrenomedulina basado en polietilenglicol (PEG), a procedimientos de preparación del mismo, al uso del mismo para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, y al uso del mismo para producir medicamentos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

La hormona peptídica de 52 aminoácidos, adrenomedulina (ADM), es producida en la glándula adrenal, el pulmón, los riñones, el músculo del corazón y en otros órganos. Los niveles plasmáticos de ADM se ubican en el intervalo picomolar inferior. La ADM es un miembro de la familia de los péptidos relacionados con el gen de calcitonina (CGRP) y, como tal, se une con un receptor heterodimérico acoplado a la proteína G que consiste en CRLR y RAMP 2 o 3 (*Calcitonin-receptor-like receptor* y *receptor activity modifying protein 2 o 3*). La activación del receptor de la ADM lleva a la elevación intracelular de la adenosina monofosfato 3',5'-cíciclo (cAMP) en las células que portan el receptor. Los receptores de ADM se presentan en diferentes tipos de células en casi todos los órganos, incluyendo células endoteliales. Se cree que la ADM es metabolizada por medio de la endopeptidasa neutral y es eliminada predominantemente en los pulmones en donde se produce una elevada expresión de receptores de la ADM [para consultas, véase Gibbons C., Dackor R., Dunworth W., Fritz-Six K., Caron K.M., *Mol Endocrinol* **21**(4),783–796 (2007)].

De datos experimentales en la literatura se desprende que la ADM interviene en una variedad de actividades funcionales que incluyen, entre otras, la regulación de la presión arterial, la broncodilatación, función renal, secreción hormonal, el crecimiento celular, la diferenciación, la neurotransmisión y la modulación de la respuesta inmune. Además, la ADM desempeña una función crucial como factor autocrino durante la proliferación y regeneración de células endoteliales [para consultas, véase García M.A., Martín-Santamaría S., de Pascual-Teresa B., Ramos A., Julián M., Martínez A., *Expert Opin Ther Targets,* **10**(2), 303-317 (2006)]

Existe una gran cantidad de evidencia en la literatura que muestra que la ADM es indispensable para una función intacta de barrera endotelial y que la administración de ADM en niveles supra-fisiológicos produce fuertes efectos anti-edematosos y anti-inflamatorios en una diversidad de afecciones inflamatorias en experimentos con animales incluyendo sepsis, lesión pulmonar aguda e inflamación intestinal [para consultas, véase Temmesfeld-Wollbrück B., Hocke A.C., Suttorp N., Hippenstiel S., *Thromb Haemost*; **98**, 944–951 (2007)]

Los ensayos clínicos con ADM hasta ahora se realizaron en trastornos cardiovasculares con un criterio de valoración hemodinámico medible tal como hipertensión pulmonar, hipertensión, falla cardíaca e infarto del miocardio agudo. La ADM mostró efectos hemodinámicos en varios estudios realizados en pacientes que padecían de las afecciones antes mencionadas. De todos modos, los efectos solamente se notaron durante períodos breves y cesaron después de finalizada la administración. Estos resultados se correspondían perfectamente con el perfil farmacocinético conocido de la ADM. Los efectos farmacodinámicos comprendieron entre otros el descenso de la presión arterial sistémica y pulmonar y el aumento de la actividad cardíaca [Troughton R.W., Lewis L.K., Yandle T.G., Richards A.M., Nicholls M.G., *Hipertensión,* **36**(4), 588-93 (2000); Nagaya N., Kangawa K., *Peptides*,. **25**(11), 2013-8 (2004); Kataoka Y., Miyazaki S., Yasuda S., Nagaya N., Noguchi T., Yamada N., Morii I., Kawamura A., Doi K., Miyatake K., Tomoike H., Kangawa K., *J Cardiovasc Pharmacol*, **56**(4), 413-9 (2010)]

En síntesis, sobre la base de la evidencia de una abundancia de datos experimentales en animales y primeros ensayos clínicos en humanos, la elevación de la ADM a niveles suprafisiológicos puede ser considerado como un mecanismo diana para el tratamiento de una variedad de afecciones en humanos y animales. Sin embargo, las principales limitaciones del uso de la ADM como agente terapéutico son la inconveniente aplicabilidad de una terapia de infusión continua que excluye su uso en la mayoría de las indicaciones potenciales y los márgenes de seguridad potencialmente limitados respecto de la hipotensión que pueden resultar de la administración de ADM mediante bolo.

El objeto de la presente invención es proveer nuevos compuestos que pueden emplearse para los tratamientos de enfermedades, en particular trastornos cardiovasculares, edematosos e inflamatorios.

Muchas proteínas y péptidos de acción terapéutica presentan una elevada excreción *in vivo*. Existen diferentes enfoques para formar un depósito inyectable de tales fármacos que incluyen el uso de macromoléculas.

Las matrices poliméricas que contienen una molécula de fármaco en un estado de unión no covalente son bien conocidas. Estas también pueden ser inyectables como hidrogeles, micropartículas o micelas. La cinética de la liberación de tales productos farmacológicos puede ser bastante poco confiable con una gran diferencia entre un paciente y otro. La producción de tales polímeros puede dañar la sustancia sensible del fármaco o éste puede experimentar reacciones secundarias con el polímero durante su degradación (D.H. Lee y col., J. Contr. Rel., 2003, 92, 291-299).

La PEGilación permanente de péptidos o proteínas para aumentar su solubilidad, reducir la inmunogenicidad y aumentar la semivida mediante la reducción de la excreción renal es un concepto perfectamente conocido desde el

comienzo de la década de 1980 (Caliceti P.Veronese F.M., Adv. Drug Deliv. Rev, 2003, 55, 1261-1277). Para varios fármacos esto fue aplicado con éxito, pero en muchos ejemplos la PEGilación reduce la eficacia de la sustancia del fármaco a un punto tal que este concepto ya deja de ser adecuado (T. Peleg-Shulman y col., J. Med. Chem., 2004, 47, 4897-4904).

Una alternativa adecuada son los profármacos basados en polímeros. Las definiciones actuales para profármacos en la IUPAC establecen los siguientes términos (International Union of Pure y Applied Chemistry y International Union of Biochemistry: GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY (Recommendations 1998); en: Pure & Appl. Chem. Vol 70, n. º 5, 1998, págs. 1129-1143):

Profármaco: un profármaco es cualquier compuesto que está sujeto a biotransformación antes de exhibir sus efectos farmacológicos. Por lo tanto, los profármacos pueden considerarse como principios activos que contienen grupos de protección especializados no tóxicos usados de manera transitoria para alterar o eliminar propiedades no deseadas de la molécula madre.

Profármaco enlazado con un vehículo (profármaco vehículo): Un profármaco enlazado con un vehículo es un profármaco que contiene un enlace temporario de una sustancia activa dada con un grupo vehículo transitorio que produce mejoradas propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas y puede ser fácilmente eliminado *in vivo*, usualmente mediante una escisión hidrolítica.

Profármaco en cascada: Un profármaco en cascada es un profármaco en el cual la escisión del grupo vehículo solo se vuelve efectivo después de desenmascarar un grupo de activación.

Existen varios ejemplos de profármacos vehículo a base de PEG, donde la mayoría de ellos requieren de la activación enzimática del engarzador entre el fármaco activo y el vehículo, en su mayoría iniciado por hidrolisis enzimática. Debido a que los ésteres son escindidos de manera muy rápida e impredecible in vivo, los engarzadores directos de ésteres para profármacos con vehículo presentan limitaciones en su aplicabilidad (J. Rautio y col., Nature Reviews Drug discovery, 2008, 7 255-270).

Los enfoques alternativos usados habitualmente son engarzadores en cascada unidos con una funcionalidad amina en el péptido o proteína. En los engarzadores en cascada debe eliminarse un grupo de enmascaramiento como paso limitante de velocidad de cascada. Esto activa al engarzador para descomponerse en una segunda posición para liberar el péptido o la proteína. Por lo general el grupo de enmascaramiento puede ser eliminado por medio de un mecanismo enzimático (R.B.Greenwald y col. en el documento WO2002/089789, Greenwald, y col., J. Med. Chem. 1999, 42, 3657-3667, F.M.H. DeGroot y col., en los documentos WO2002/083180 y WO2004/043493, y D. Shabat y col. en los documentos WO2004/019993).

Una alternativa que no se basa en la activación enzimática es el concepto de U. Hersel y col. en el documento WO2005/099768. En su enfoque el grupo de enmascaramiento en un fenol es eliminado por una vía que solamente depende del valor del pH por medio del ataque de un nucleófilo interno. Esto activa el engarzador para la ulterior descomposición.

Tal como fue mencionado por U. Hersel y col. en el documento WO2005/099768, “La desventaja en los sistemas de profármaco descritos por Greenwald, DeGroot y Shabat es la liberación de pequeñas moléculas de subproductos aromáticos potencialmente tóxicos como metidas de quinona, tras la escisión del engarzador temporario. Las entidades potencialmente tóxicas se liberan con el fármaco en una estequiometría 1:1 y pueden asumir altas concentraciones in vivo”. El mismo problema se produce también en el sistema de Hersel y col.

Existe una variedad de diferentes enfoques de profármacos en el caso de moléculas orgánicas pequeñas (J. Rautio y col., Nature Reviews Drug discovery, 2008, 7 255-270). El enfoque usado por U. Hersel y col. como mecanismo de escisión para su grupo de enmascaramiento se ha usado como un enfoque para profármacos para grupos fenólicos de moléculas pequeñas desde finales de la década de 1980. (W.S. Saari en el documento EP 0296 811 y W.S. Saari y col., J. Med. Chem. 1990, vol 33, n. º 1, págs. 97-101).

Un sistema alternativo de profármaco basado en aminas se basa en la hidrolisis lenta de bis-hidroxietilo glicina como un profármaco en cascada. Los grupos hidroxi de la bis-hidroxietilo glicina están enmascaramientos por ésteres que son propensos a la hidrolisis mediante esterasas (R. Greenwald y col., J. Med. Chem. 2004, 47, 726–734 y D. Vetter y col. en el documento WO 2006/136586).

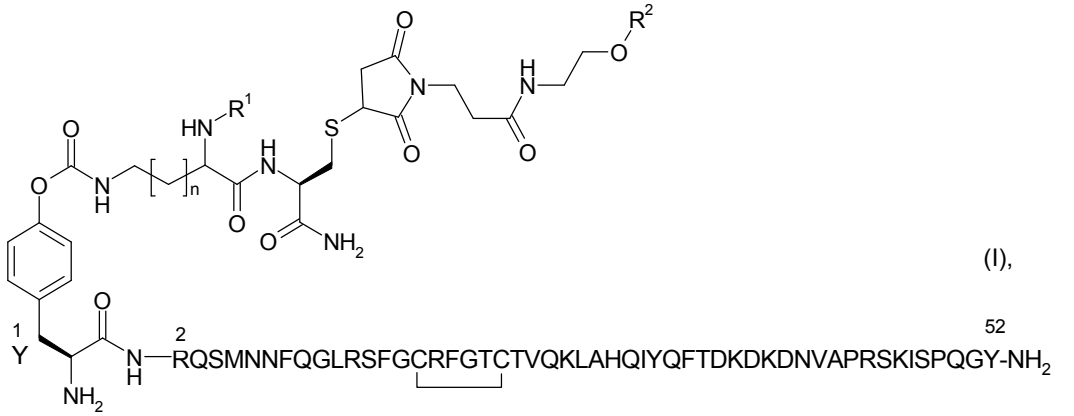
Se conocen los derivados de adrenomedulina etiquetados para su uso como agentes terapéuticos y también en el diagnóstico por imagen (J. Depuis y col. en CA 2567478 y WO 2008/138141). En estos derivados de la ADM, una celda complejizante tal como una estructura molecular capaz de enlazar isótopos radioactivos, se unió directamente al extremo N terminal de la ADM o mediante una unidad espaciadora que potencialmente también incluye espaciadores PEG cortos. El valor diagnóstico o terapéutico de estos fármacos surge de la liberación dirigida de la molécula radioactiva.

Contrariamente a los enfoques de profármacos mencionados antes, que se basan todos en el enmascaramiento de funcionalidades amina, la presente invención se basa en enmascarar el grupo fenólico de una tirosina en la ADM. Se

usa un profármaco enlazado con un vehículo, basado en la escisión interna de un carbamato en este grupo fenólico, mediante la ayuda de un nucleófilo. La ventaja clave de otras clases de profármacos antes mencionados es la inocuidad toxicológica del producto de descomposición del engarzador, una urea cíclica unida en forma permanente al vehículo. Además, la descomposición del profármaco no depende de los mecanismos enzimáticos que pueden causar una mayor variación de la cinética de escisión de un paciente a otro. El mecanismo de escisión solamente depende del valor de pH, en tanto una amina interna que es protonizada con un pH ácido se activa a un valor de pH más alto (neutro) para actuar como un nucleófilo que ataca el carbamato fenólico basado en la tirosina.

En el marco de la presente invención, ahora se describen los compuestos que actúan como profármacos de ADM de liberación lenta con acción farmacológica de larga duración en comparación con la ADM y los que sobre la base de su mecanismo de acción específico –después de la administración parenteral- desarrollan *in vivo* efectos antiinflamatorios y hemodinámicos sostenidos tal como la estabilización de la función de barrera endotelial y la reducción de la presión arterial, respectivamente.

La presente invención provee compuestos de la fórmula



,

en la que

n representa el número 0, 1, 2 o 3,

R^1 representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo o isopropilo,

R^2 representa PEG lineal o ramificado de 20 kDa a 80 kDa con un grupo metoxi de protección terminal,

y sales de los mismos, solvatos de los mismos y los solvatos de las sales de los mismos.

Son compuestos de acuerdo con la invención los compuestos de fórmula (I) y sus sales, solvatos y solvatos de las sales, los compuestos de las fórmulas indicadas a continuación comprendidos en la fórmula (I) y sus sales, solvatos y solvatos de las sales así como los compuestos indicados a continuación como ejemplos de realización comprendidos en la fórmula (I) y sus sales, solvatos y solvatos de las sales, salvo que los compuestos indicados a continuación comprendidos en la fórmula (I) no sean ya las sales, solvatos y solvatos de las sales.

Los compuestos de acuerdo con la invención dependiendo de su estructura pueden existir en formas estereoisómeras (enantiómeros, diaestereómeros). La presente invención por lo tanto comprende los enantiómeros o diaestereómeros y sus respectivas mezclas. Los constituyentes estereoisoméricamente homogéneos pueden aislarse de manera conocida de tales mezclas de enantiómeros y/o diaestereómeros.

En tanto los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentarse en formas tautoméricas, comprende la presente invención todas las formas tautoméricas.

Como sales son preferidas en el marco de la presente invención las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención. También están comprendidas las sales, que no son aptas como tales para los usos farmacéuticos, pero pueden usarse por ejemplo para el aislamiento o la purificación de los compuestos de acuerdo con la invención.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención comprenden sales de adición de ácidos de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, p. ej., sales del ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido toluensulfónico, ácido bencensulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención comprenden también las

sales de bases usuales, como a modo de ejemplo y preferentemente sales de metales alcalinos (p. ej., sales de sodio y de potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sales de calcio y de magnesio) y sales de amonio, derivadas de amoníaco o de aminas orgánicas con 1 a 16 átomos C, como a modo de ejemplo y preferentemente etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, diciclohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y *N*-metilpiperidina.

Como solvatos se denominan en el marco de la invención aquellas formas de los compuestos de acuerdo con la invención que en estado líquido o sólido mediante la coordinación con moléculas de disolventes forman un complejo. Los hidratos son una forma especial de solvatos en los que la coordinación se lleva a cabo con agua. Como solvatos son preferidos en el marco de la presente invención los hidratos.

En el contexto de la invención, la protección terminal con un grupo metoxi mencionado en R^2 significa que el polietilengilicol (PEG) está sustituido con un grupo metoxi en el extremo que no está unido al oxígeno, es decir, -PEG-OMe de 40 kDa.

Son preferentes los compuestos de fórmula (I) en la que

n representa el número 1 o 2,

R^1 representa hidrógeno o metilo,

R^2 representa PEG lineal de 40 kDa con un grupo metoxi de protección terminal.

También son preferentes los compuestos de la fórmula (I) en la que

n representa el número 1 o 2,

R^1 representa hidrógeno,

R^2 representa PEG lineal de 40 kDa con un grupo metoxi de protección terminal.

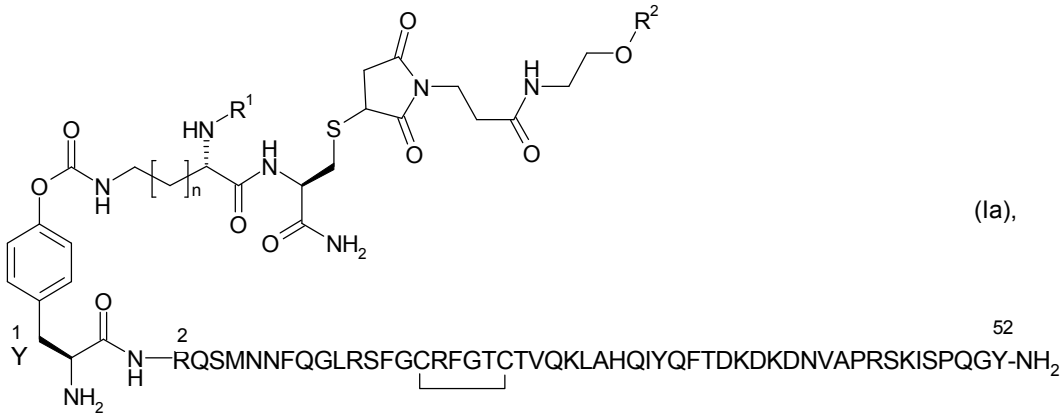
También son preferentes los compuestos de fórmula (I) en la que n representa el número 1.

También son preferentes los compuestos de fórmula (I) en la que R^1 representa hidrógeno.

También son preferentes los compuestos de la fórmula (I) en la que el átomo de carbono al que está unido el sustituyente $-NHR^1$ presenta la configuración S.

También son preferentes los compuestos de la fórmula (I) en la que R^2 representa PEG 40 kDa lineal con un grupo metoxi terminal.

También son preferentes los compuestos de la fórmula (I) que tienen la estructura de fórmula (Ia)



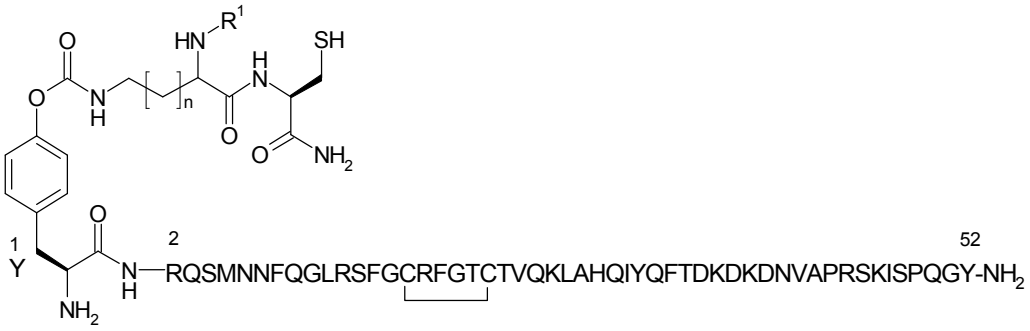
(Ia),

en la que
n, R^1 y R^2 son cada uno como se definió antes,
y sales de los mismos, solvatos de los mismos y los solvatos de las sales de los mismos.

Las definiciones específicas de radicales indicadas en las combinaciones particulares o bien en las combinaciones preferidas de radicales, también se reemplazan por cualquier a de las definiciones de radicales de otras combinaciones, independientemente de las combinaciones particulares de los radicales indicados.

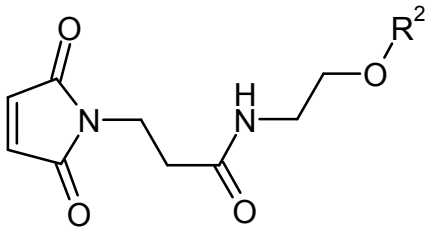
Especialmente preferidas son combinaciones de dos o más de las gamas preferidas antes indicadas.

La invención además provee además un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula (I), o sales de los mismos, solvatos de los mismos o los solvatos de sales de los mismos, en el que los compuestos de fórmula (II)



(II),

en la que
n y R^1 son cada uno como se definió antes,
se hacen reaccionar con los compuestos de fórmula (III)



(III),

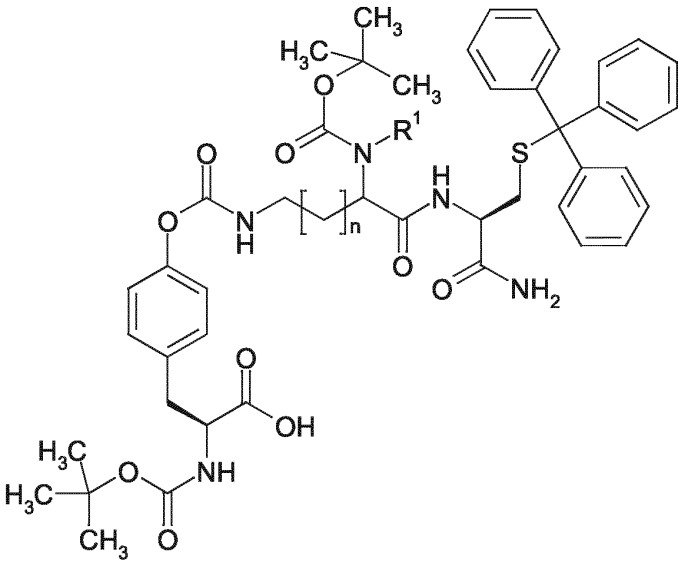
en la que
R^2 es como se definió antes.

La reacción por lo general se lleva a cabo en disolventes inertes, preferentemente en un intervalo de temperatura de 0 ºC a 50 ºC a presión estándar.

Son disolventes inertes son, por ejemplo, tampones de citrato, tampones de clorhidrato de glicina, tampones de ftalato o tampones de acetato de un valor de pH 3 a 5, siendo preferente un tampón de citrato de un valor de pH 4.

El compuesto de fórmula (III) es conocido o puede ser sintetizado mediante procedimientos conocidos a partir de los compuestos de partida apropiados.

Los compuestos de fórmula (II) son conocidos o pueden ser preparados mediante la reacción de compuestos de fórmula (IV).



(IV),

en la que

n y R^1 son cada uno como se definió antes,
en la primera etapa con el compuesto de fórmula (V)

(V),

y en la segunda etapa con un ácido.

La reacción en la primera etapa por lo general se realiza en disolventes inertes, en presencia de un reactivo de deshidratación, opcionalmente en presencia de una base, preferentemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 70 ºC a presión estándar.

Son disolventes inertes, por ejemplo, hidrocarburos halogenados como diclorometano, triclorometano, o 1,2-dicloroetano, éteres tal como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes como acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, 2-butanona o acetonitrilo. También es posible utilizar mezclas de los disolventes. Preferentemente se utiliza dimetilformamida.

Son reactivos de deshidratación adecuados en este marco, por ejemplo, las carbodiimidas como *N,N'*-dietil-, *N,N'*-dipropil-, *N,N'*-diisopropil-, *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminoisopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-ciclohexilcarbodiimida-*N'*-propiloximetilpoliestireno (PS-carbodiimida), o compuestos carbonilo tal como carbonildiimidazoles, o compuestos 1,2-oxazolio tal como 3-sulfato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio o perclorato de 2-terc-butil-5-metilisoxazolio, o compuestos acilamino tal como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, o anhídrido propanfosfónico, o cloroformato de isobutilo, o cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosforilo o benzotriazoliloxitri(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato, u *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), benzotriazol-1-il-N-tetrametil-uronio tetrafluoroborato (TBTU), 2-(2-oxo-1-(2H)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TPTU) u *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), o 1-hidroxibenztriazol (HOBt), o benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato (BOP), o benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio hexafluorofosfato (PYBOP), o *N*-hidroxisuccinimida, o mezclas de estos con bases.

Son bases, por ejemplo, carbonatos de metal alcalino, por ejemplo carbonato de sodio o carbonato de potasio, o hidrocarbonato de sodio o hidrocarbonato de potasio, o bases orgánicas tal como trialquilaminas, por ejemplo trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, 4-dimetilaminopiridina o N,N-diisopropiletilamina, siendo preferente N,N-diisopropiletilamina.

Preferentemente, la condensación se lleva a cabo con TBTU en presencia de N,N-diisopropiletilamina.

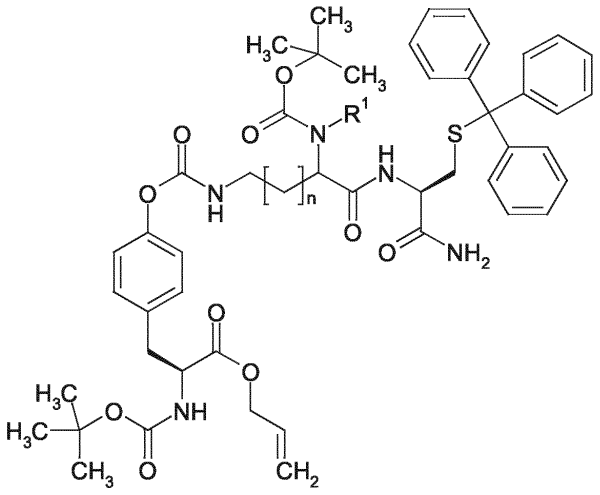
La reacción de la segunda etapa se realiza opcionalmente en disolventes inertes, preferentemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 60 ºC a presión estándar.

Son disolventes inertes, por ejemplo, halohidrocarburos tal como diclorometano, triclorometano, tetracloruro de carbono o 1,2-dicloroetano, o éteres tal como tetrahidrofurano o dioxano, siendo preferente diclorometano.

Son ácidos, por ejemplo, ácido trifluoroacético o cloruro de hidrógeno en dioxano, siendo preferente ácido trifluoroacético concentrado. Puede usarse ácido trifluoroacético concentrado con la adición de aceptores como agua, fenol, tioanisol y 1,2-etanodiol. Se prefiere usar 1 a 5 % de cada uno de estos aceptores.

El compuesto de fórmula (V) es conocido o puede ser sintetizado mediante procedimientos conocidos a partir de los compuestos de partida apropiados (ejemplo 14A).

Los compuestos de fórmula (IV) son conocidos o pueden ser preparados mediante la reacción de compuestos de fórmula (VI)



(VI),

en la que
n y R^1 son cada uno como se definió antes,
con una fuente de paladio(0) y un agente reductor.

La reacción por lo general se lleva a cabo en disolventes inertes, opcionalmente en presencia de una base suave, preferentemente en un intervalo de temperatura de 0 ºC a 50 ºC a presión estándar.

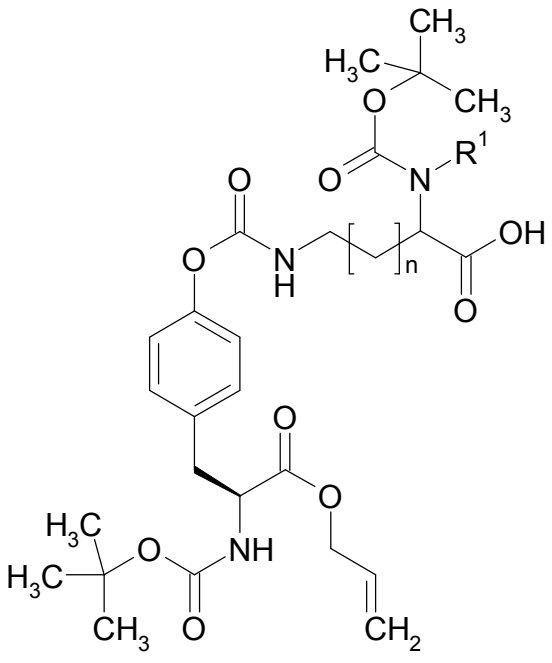
Son disolventes inertes, por ejemplo, halohidrocarburos tal como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, éteres tal como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes tal como acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, 2-butanona o acetonitrilo. También es posible usar mezclas de los disolventes. Se prefiere usar tetrahidrofurano.

Son fuentes de paladio(0), por ejemplo, tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0), tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) o fuentes de paladio(II) que son sometidas a reducción *in situ* a paladio(0) durante la reacción, siendo preferente tetraquis(trifenilfosfin)-paladio(0).

Son agentes reductores, por ejemplo, ácido fórmico o trietilsilano, siendo preferente ácido fórmico.

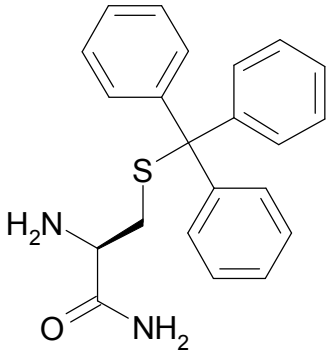
Son bases, por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina o solución de fosfato de potasio, siendo preferente trietilamina.

Los compuestos de fórmula (VI) son conocidos o pueden ser preparados mediante la reacción de compuestos de fórmula (VII)



(VII),

en la que
n y R^1 son cada uno como se definió antes,
con el compuesto de fórmula (VIII)



(VIII).

La reacción por lo general se lleva a cabo en disolventes inertes, en presencia de un reactivo de deshidratación, opcionalmente en presencia de una base, preferentemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 70 ºC a presión estándar.

Son disolventes inertes, por ejemplo, halohidrocarburos tal como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, éteres tal como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes tal como acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, 2-butanona o acetonitrilo. También es posible usar mezclas de los disolventes. Se prefiere usar diclorometano.

Son reactivos de deshidratación adecuados en este marco, por ejemplo, carbodiimidas, por ejemplo *N,N'*-dietil-, *N,N'*-dipropil-, *N,N'*-diisopropil-, *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminoisopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-ciclohexilcarbodiimida-*N'*-propiloximetilpoliestireno (PS-carbodiimida), o compuestos carbonilo tal como carbonildiimidazoles, o compuestos 1,2-oxazolio tal como 3-sulfato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio o perclorato de 2-terc-butil-5-metilisoxazolio, o compuestos acilamino tal como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, o anhídrido propanofosfónico, o cloroformato de isobutilo, o cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosforilo o benzotriazoliloxitri(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato, u *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), benzotriazol-1-il-N-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), 2-(2-oxo-1-(2H)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TPTU) u O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), o benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato (BOP), o benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio hexafluorofosfato (PYBOP), o *N*-hidroxisuccinimida, o mezclas de estos con bases.

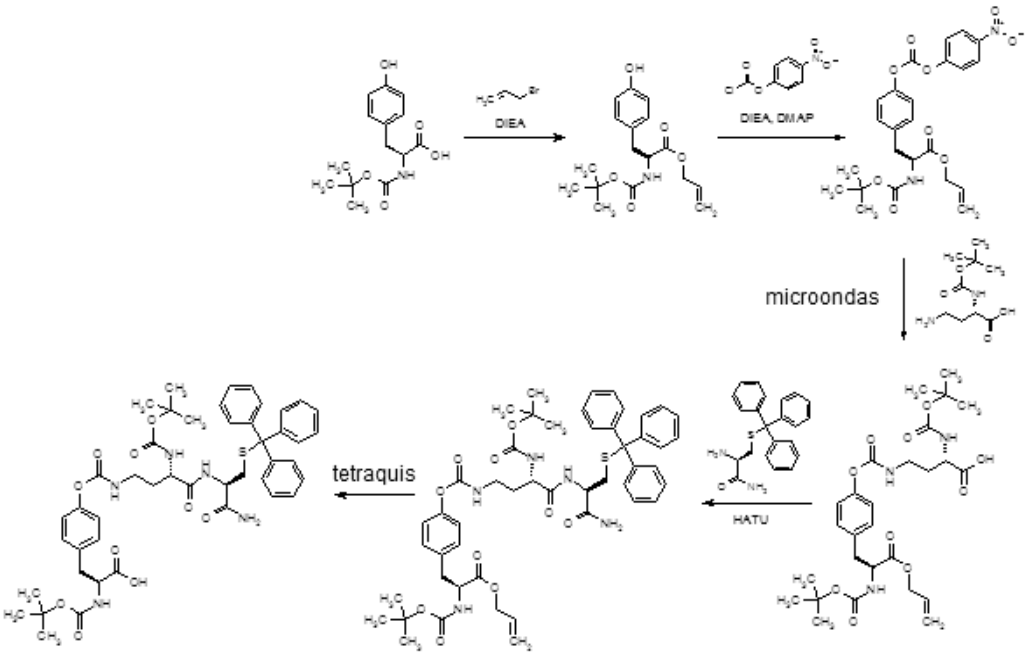
Son bases, por ejemplo, carbonatos de metal alcalino, por ejemplo carbonato de sodio o carbonato de potasio, o hidrocarbonato de sodio o hidrocarbonato de potasio, o bases orgánicas tal como trialquilaminas, por ejemplo trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, 4-dimetilaminopiridina o N,N-diisopropiletilamina, siendo preferente N,N-diisopropiletilamina.

Preferentemente, la condensación se lleva a cabo con HATU en presencia de N,N-diisopropiletilamina.

Los compuestos de fórmula (VII) y (VIII) son conocidos o pueden ser sintetizados mediante procedimientos conocidos a partir de los compuestos de partida apropiados.

La preparación de los compuestos de acuerdo con la invención puede ilustrarse mediante el siguiente esquema de síntesis:

Esquema 1



Los compuestos de acuerdo con la invención presentan un espectro de actividad farmacológica de utilidad imprevisible.

De modo concordante son adecuados para su uso como medicamentos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades en seres humanos y animales.

Los compuestos de acuerdo con la invención se distinguen como profármacos específicos de liberación de adrenomedulina (ADM).

La presente invención además provee el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, especialmente de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

En el sentido de la presente invención el término "tratamiento" o "tratar" significa inhibir, retrasar, aliviar, mitigar, frenar, reducir o causar la regresión de una enfermedad, un trastorno, una afección o patología, el desarrollo y/o el avance de los mismos y/o de los síntomas de los mismos. El término “prevención“ o “prevenir” incluye la reducción del resto de tener, contraer o experimentar una enfermedad, trastorno, afección o patología, el desarrollo y/o avance de la misma, y/o de los síntomas de la misma.

El término prevención incluye la profilaxis. El tratamiento o la prevención de una enfermedad, un trastorno, una afección o patología pueden realizarse en forma parcial o total.

Sobre la base de sus propiedades farmacológicas, los compuestos de acuerdo con la invención pueden emplearse para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardiovasculares, en particular falla cardíaca, especialmente falla cardíaca crónica y aguda, falla cardíaca diastólica y sistólica (congestiva), falla cardíaca descompensada aguda, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, *angina pectoris*, infarto del miocardio, lesión isquémica por reperfusión, apoplejía isquémica y hemorrágica, arterioesclerosis, ateroesclerosis, hipertensión, especialmente hipertensión esencial, hipertensión esencial maligna, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular como consecuencia de trastornos renales y endocrinos, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad real hipertensiva, hipertensión pulmonar, especialmente hipertensión secundaria pulmonar, hipertensión pulmonar después de embolia pulmonar con y sin *cor pulmonale* agudo, hipertensión pulmonar primaria, y enfermedad arterial periférica oclusiva.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención del edema y la proteinuria gestacionales [inducidos por embarazo] con y sin hipertensión (pre-eclampsia).

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos pulmonares, tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y crónico, alveolitis alérgica y neumonitis debida a la inhalación de polvo orgánico y partículas de origen fúngico, actinomicético o de otro origen, bronquitis química aguda, edema pulmonar químico crónico y agudo (por ejemplo, después de la inhalación de fosgeno, óxido de nitrógeno), edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y

crónicas debido a radiación, trastornos intersticiales de pulmón crónicos y agudos (tal como pero sin restringirse a trastornos intersticiales de pulmón inducidos por fármacos, por ejemplo, secundario al tratamiento con bleomicina), lesión pulmonar aguda/síndrome agudo de distrés respiratorio (ALI/ARDS) en adultos o niños incluyendo los recién nacidos, ALI/ARDS como consecuencia de neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS como consecuencia de aspiración (tal como pero sin restringirse a neumonía por aspiración debido a contenido gástrico regurgitado), ALI/ARDS como consecuencia de inhalación de gas tóxico, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS o insuficiencia pulmonar aguda después de cirugías, traumatismos o quemaduras, lesión pulmonar inducida por la ventilación (VILI), lesión pulmonar después de aspiración de meconio, fibrosis pulmonar y mal de las alturas.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades renales crónicas (estadios 1-5), insuficiencia renal, nefropatía diabética, enfermedad renal crónica hipertensiva, glomerulonefritis, síndrome nefrítico crónico y de progresión rápida, síndrome nefrítico no específico, síndrome nefrótico, nefropatías hereditarias, nefritis túbulo-intersticial aguda y crónica, lesión renal aguda, falla renal aguda, falla renal postraumática, lesión real traumática y post-intervención, síndrome cardiorrenal, y protección y mejora funcional de trasplantes de riñón.

Además los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de diabetes mellitus y sus consecutivos síntomas, tal como por ejemplo, macro- y microangiopatía diabética, nefropatía y neuropatía diabéticas.

Los compuestos de acuerdo con la invención además pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de trastornos del sistema nervioso central y periférico tal como meningitis y encefalitis viral y bacteriana (por ejemplo, encefalitis por herpes Zoster), lesión cerebral, neoplasia maligna primaria o secundaria [metástasis] del cerebro y de la médula espinal, radiculitis y polirradiculitis, síndrome de Guillain-Barre [polineuritis aguda (post-)infección, síndrome de Miller Fisher], esclerosis amiotrófica lateral [atrofia progresiva del músculo espinal], enfermedad de Parkinson, polineuropatías agudas y crónicas, dolor, edema cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedades degenerativas del sistema nervioso y enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central, tal como pero sin restringirse a esclerosis múltiple.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de hipertensión portal y fibrosis hepática [cirrosis] y sus secuelas tal como várices esofágicas y ascitis, para el tratamiento y/o la prevención efusiones pleurales como consecuencia de tumores malignos o inflamaciones y para el tratamiento y/o la prevención de linfedemas y de edemas como consecuencia de varices.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos inflamatorios del tracto gastrointestinal tal como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y trastornos tóxicos y vasculares del intestino.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de sepsis, shock séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, shock hemorrágico, sepsis o SIRS con disfunción de órganos o falla multiorgánica (MOF), shock traumático, shock tóxico, shock anafiláctico, urticaria, picadura de insectos y alergias relacionadas con picaduras, edema angioneurótico [urticaria gigante, edema de Quincke], laringitis y traqueítis agudas y laringitis obstructiva aguda [anginas] y epiglotitis.

Los compuestos además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades de tipo reumático y otras formas de enfermedades que se consideran enfermedades autoinmunes tal como pero sin restringirse a poliartritis, lupus eritematoso, escleroderma, púrpura y vasculitis.

Los compuestos de acuerdo con la invención además son adecuados para el tratamiento de hipertensión ocular (glaucoma), retinopatía diabética y edema macular.

Los compuestos de acuerdo con la invención además pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de afecciones isquémicas relacionadas con intervenciones quirúrgicas y los síntomas consecutivos de las mismas, en particular en el caso de intervenciones cardíacas usando una máquina corazón pulmón artificial (por ejemplo, cirugías de *bypass*, implantes de válvula cardíaca), intervenciones de las arterias carótidas, intervenciones en la aorta e intervenciones con apertura o penetración instrumental de la bóveda craneal.

Los compuestos además son adecuados para el tratamiento general y/o prevención en intervenciones quirúrgicas con el fin de acelerar la curación de heridas y acortar del tiempo de reconvalescencia. Además son adecuados para promover la curación de heridas.

Los compuestos además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos de densidad y estructura ósea tal como pero sin restringirse a osteoporosis, osteomalacia y trastornos óseos relacionados con hiperparatiroidismo.

Los compuestos además son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de disfunciones sexuales, en

particular disfunción eréctil masculina.

Preferentemente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de falla cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, apoplejía isquémica y/o hemorrágica, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica oclusiva, pre-eclampsia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y/o crónico, alveolitis alérgica y/o neumonitis debido a la inhalación de polvo orgánico y partículas de origen fúngico, actinomicético o de otro origen, y/o bronquitis química aguda, edema pulmonar agudo y/o crónico químico, edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y/o crónicas debido a radiación, trastornos intersticiales de pulmón agudos y/o crónicos, lesión pulmonar aguda/síndrome agudo de distrés respiratorio (ALI/ARDS) en adultos o niños incluyendo los recién nacidos, ALI/ARDS como consecuencia de neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS como consecuencia de aspiración, ALI/ARDS como consecuencia de inhalación de gas tóxico, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda después de cirugías, traumatismos y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por la ventilación (VILI), lesión pulmonar después de aspiración de meconio, fibrosis pulmonar, mal de las alturas, enfermedades renales crónicas, glomerulonefritis, lesión renal aguda, síndrome cardiorrenal, linfedemas, enfermedad intestinal inflamatoria, sepsis, shock séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, shock anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria y/o urticaria.

Más preferentemente los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de falla cardíaca, hipertensión, hipertensión pulmonar, asma, edema pulmonar agudo y/o crónico químico, lesión pulmonar aguda/síndrome agudo de distrés respiratorio (ALI/ARDS) en adultos o niños incluyendo los recién nacidos, ALI/ARDS como consecuencia de neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS como consecuencia de aspiración, ALI/ARDS como consecuencia de inhalación de gas tóxico, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda después de cirugías, traumatismos y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por la ventilación (VILI), lesión pulmonar después de aspiración de meconio, sepsis, shock séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, shock anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria y/o urticaria.

La presente invención además provee el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, en particular los trastornos antes mencionados.

La presente invención además provee el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para preparar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, en particular los trastornos antes mencionados.

La presente invención además provee un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, en particular los trastornos antes mencionados, usando una cantidad activa de los compuestos de acuerdo con la invención.

La invención además provee medicamentos que comprenden un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más otros ingredientes activos, en particular para el tratamiento y/o la prevención de los trastornos antes mencionados. Las combinaciones de ingredientes activos preferidos y citados a modo de ejemplos son:

Inhibidores de ACE, antagonistas del receptor de angiotensina, agonistas del receptor beta-2, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas del receptor de glucocorticoides, diuréticos o enzima 2 recombinante conversora de angiotensina o ácido acetilsalicílico (aspirina).

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de ACE, tal como a modo de ejemplo y preferentemente, enalaprilo, quinaprilo, captoprilo, lisinoprilo, ramiprilo, delaprilo, fosinoprilo, perindoprilo, cilazaprilo, imidaprilo, benazeprilo, moexiprilo, spiraprilo o trandoprilo.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista del receptor de angiotensina, tal como a modo de ejemplo y preferentemente, losartán, candesartán, valsartán, telmisartán o embusartán.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista del receptor beta-2, tal como a modo de ejemplo y preferentemente, salbutamol, pirbuterol, salmeterol, terbutalin, fenoterol, tulobuterol, clenbuterol, reproterol o formoterol.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE), tal como a modo de ejemplo y preferentemente, milrinona, amrinona, pimobendán, cilostazol, sildenafilo, vardenafilo o tadalafilo.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista del receptor de glucocorticoides, tal como a modo de ejemplo y preferentemente, cortisol, cortisona, hidrocortisona, prednisona, metil-prednisolona, prednilideno, deflazacort, fluocortolona, triamcinolona, dexametasona o betametasona.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con diuréticos, tal como a modo de ejemplo y preferentemente, furosemida, torasemida y hidroclorotiazida.

La presente invención además se refiere a medicamentos que comprenden al menos un compuesto de acuerdo con la invención, por lo general junto con uno o más excipientes inertes, no tóxicos adecuados para uso farmacéutico, y al uso del mismo para los fines antes mencionados.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden actuar en forma sistémica y/o local. A este fin pueden administrarse de manera adecuada, por ejemplo por vía parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, dérmica, transdérmica, conjuntiva, ótica o como implante o estent.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden administrarse en formas de administración adecuadas para estas vías de administración.

La administración parenteral puede realizarse evitando el paso de absorción (p. ej., por vía intravenosa, intraarterial, intracardial, intraespinal o intralumbar) o usando la absorción (p. ej., por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Para la administración por vía parenteral incluyen preparados para inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Para las demás formas de administración son adecuadas, p. ej., formas farmacéuticas para inhalación (entre otros, inhaladores en polvo, nebulizadores), gotas nasales, colirios, soluciones o aerosoles, obleas/láminas o suspensiones acuosas (lociones, mezclas agitables), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (p. ej., parches), leches, pastas, espumas, talco para espolvorear, implantes o estents.

Se prefiere la administración por vía parenteral, especialmente la administración por vía intravenosa.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser transformados a las formas de aplicación indicadas. Ello puede suceder de un modo en sí conocido mediante la mezcla con excipientes inertes, no tóxicos, adecuados para uso farmacéutico. Forman parte de estos excipientes entre otros sustancias portadoras (por ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (p. ej., polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y agentes de dispersión o humectantes (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, polioxisorbitanoleato), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizadores (p. ej., antioxidantes como por ejemplo ácido ascórbico), colorantes (p. ej., pigmentos inorgánicos, como por ejemplo óxidos de hierro) y sustancias que enmascaran el gusto y/o de olor.

En general resultó ventajoso administrar por vía parenteral cantidades de aproximadamente 0,001 a 5 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal para lograr resultados efectivos.

A pesar de ello, dado el caso puede ser necesario apartarse de las cantidades indicadas y ello en relación con el peso corporal, la vía de aplicación, la reacción individual frente al principio activo, la forma y el momento de la preparación o bien el intervalo, en el que se realiza la aplicación. Por ejemplo, puede ser suficiente en algunos casos, administrar menos que la cantidad mínima antes indicada, mientras que en otros casos es necesario exceder el límite superior mencionado. En caso de aplicar cantidades más elevadas puede ser recomendable distribuir estas en varias dosis individuales a lo largo del día.

Los ejemplos de realización indicados luego explican la invención, aunque la invención no se limita a los ejemplos.

Los datos en porcentaje en los siguientes ensayos y ejemplos son, salvo indicación en contrario, porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Las proporciones de disolventes, de dilución y los datos de la concentración de las soluciones líquido/líquido en cada caso se refieren al volumen.

A. Ejemplos

Abreviaturas

AA	aminoácido
Acm	acetamidometilo
ADM	adrenomedulina (humana)
ADM(2-52) aprox.	secuencia peptídica de ADM AA 2 a AA 52, incluyendo un enlace disulfuro y amida C-terminal aproximadamente
Boc	*terc*-butiloxicarbonilo
CDI	carbonildiimidazol
d	día(s), doblete (en RMN)
TLC	cromatografía de capa fina
DCI	Ionización química directa (en MS)

dd	doblete de dobletes (en RMN)
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
del teórico	del teórico (en rendimiento)
eq.	equivalente(s)
ESI	Ionización por electropulverización (en EM)
Fmoc	(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo
h	hora(s)
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta presión, alto rendimiento
CL/EM	cromatografía líquida acoplada con espectroscopia de masa
m	multiplete (en RMN)
min	minuto(s)
EM	espectroscopia de masa
RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear
pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PEG	polietilenglicol
RP	fase reversa (en HPLC)
TA	temperatura ambiente
R_t	tiempo de retención (en HPLC)
s	singlete (en RMN)
TBTU	benzotriazol-1-il-N-tetrametil-uronio tetrafluoroborato
tBu	*terc*-butilo
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Trt	tritilo

La nomenclatura de los aminoácidos y las secuencias peptídicas es según:
International Union of Pure and Applied Chemistry e International Union of Biochemistry: Nomenclatura y símbolos para aminoácidos y péptidos (recomendaciones 1983). En: Pure & Appl. Chem. 56, vol. 5, 1984, págs. 595–624

Nombre común	Símbolo	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspartico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Procedimientos CL/EM y EM

Procedimiento 1 (CL/EM): Tipo de instrumento: Waters ACQUITY SQD UPLC System; columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µ 50 mm x 1 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 %, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 %; gradiente: 0,0 min 90 % A → 1,2 min 5 % A → 2,0 min 5 % A; horno: 50 ºC; caudal: 0,40 ml/min; detección UV: 210 – 400 nm.

Procedimiento 2 (CL/EM): Equipo EM: tipo: Waters (Micromass) Quattro Micro; instrumento HPLC tipo: Agilent

1100 series; columna: Thermo Hypersil GOLD 3 µ 20 mm x 4 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 100 % A → 3,0 min 10 % A → 4,0 min 10 % A; horno: 50 ºC; caudal: 2,0 ml/min; detección UV: 210 nm.

Procedimiento 3 (HPLC): Tipo de instrumento: HP 1200 Series; UV DAD; columna: Phenomenex Luna 5 µm C5 100Å, 150 mm x 4,6 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 95 %A → 5 min 5 % A; → 5,8 min 95 % A → 6,2 min 95 % A; caudal de flujo: 2,5 ml/min; horno: TA; detección UV: 210 nm.

Procedimiento 4 (HPLC): Tipo de instrumento: HP 1200 Series; UV DAD; columna: Merck Chromolith Fastgradient RP18 50 mm x 2 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 95 % A → 2,9 min 5 % A → 3,2 min 5 % A; caudal de flujo: 3 ml/min; horno: TA; detección UV: 210 nm.

Procedimiento 5 (EM DCI): Tipo de instrumento: Thermo Fisher-Scientific DSQ; ionización química; gas de amoníaco reactivo; temperatura de fuente: 200 ºC; energía de ionización 70 eV.

Procedimiento 6 (EM MALDI): Tipo de instrumento Kratos PC-Kompact SEQ V1,2,2 MALDI TOF MS, modo de ionización positivo, Linear high, potencia: 75.

Sintetizador por microondas: sintetizador Biotage Emrys Initiator II, con tamaño variable de vial de hasta 20 ml de volumen de reacción y procesador de muestra “Robot 60”

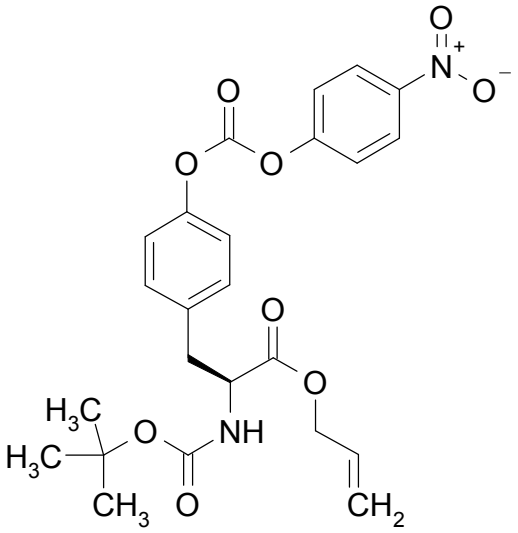
Tampón de citrato pH 4: Fluka n. º 82566; tampón de citrato pH 4, estabilizado con una composición de azida de sodio: ácido cítrico, ~0,056 M; azida de sodio, ~0,05 %; cloruro de sodio, ~0,044 M; hidróxido de sodio, ~0,068 M.

Metoxi poli(etilenglicol) maleimido propionamida 40 kDa (mPEG maleimida lineal 40 kDa); CAS No 724722-89-8; de Dr. Reddys Inc., Lote n.º 233101301; peso molecular promedio, Mw (GPC) 40.500 Da; polidispersidad (GPC) 1,08.

Compuestos de partida

Ejemplo 1A

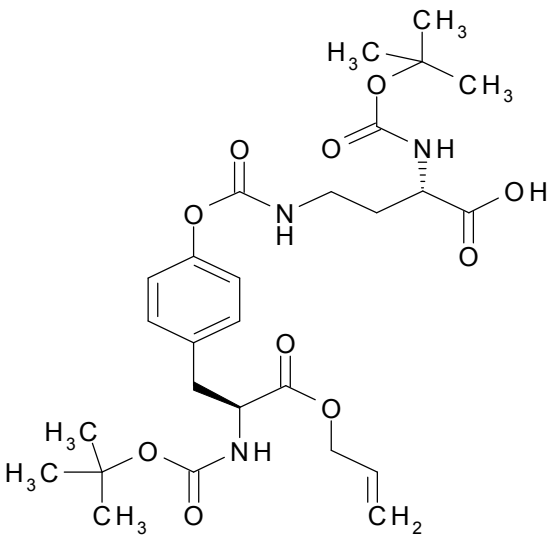
N-(terc-butoxicarbonil)-O-[(4-nitrofenoxi)carbonil]-L-tirosinato de alilo



Se combinaron 36,7 g (114,3 mmol) de aliléster de N-Boc-L-tirosina, 23,0 g (114,3 mmol) de cloroformato de 4-nitrofenilo, 17,5 ml (125,7 mmol) de trietilamina y 1,40 g (11,4 mmol) de 4-dimetilamino piridina en 1000 ml de diclorometano y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se extrajo con aprox. 500 ml de agua y con aprox. 250 ml de salmuera y se secó sobre aprox. 100 g de sulfato de sodio. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotativa (aprox. 40 ºC, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min.) y el producto se disolvió en dietiléter tibio y se cristalizó durante la noche a 4 ºC. Los cristales se filtraron, se lavaron con dietiléter frío y se secaron al alto vacío (aprox. 0,1 mbar, 18 h). El rendimiento fue 29,86 g, (59,6 mmol, 52 % del teórico) del producto deseado. CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,23 min., m/z = 487 $(M+H)^+$

Ejemplo 2A

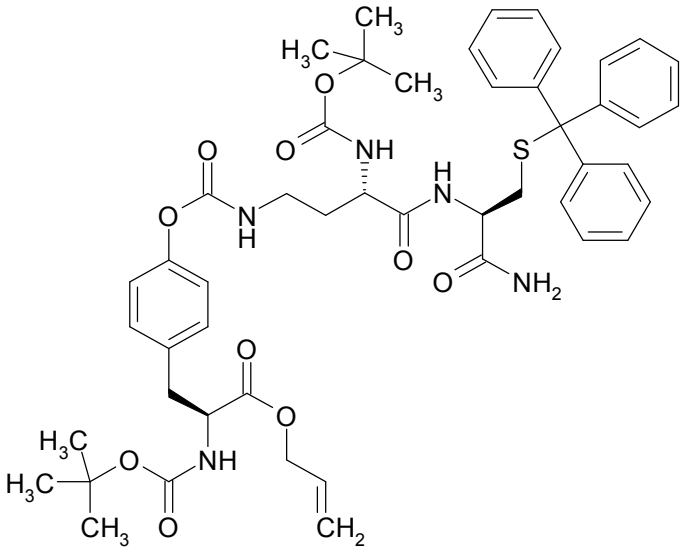
Ácido (2S)-4-{[(4-{(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)carbonil]-amino}-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoico



Se disolvieron 4,0 g (8,22 mmol) del compuesto del ejemplo 1A en 60 ml de diclorometano. Se adicionaron 1,795 (8,22 mmol) de ácido (2S)-4-amino-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanóico y 1,43 ml (8,22 mmol) de N,N-diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se dividió en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo sellado a 75 ºC en un sintetizador por microondas. De la mezcla de reacción combinada se eliminó el disolvente mediante evaporación rotativa (aprox. 40 ºC, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min.). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 4/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1, diclorometano/metanol 4/1 y diclorometano/ metanol 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 4,02 g (6,54 mmol, 80 % del teórico) del producto deseado.CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,07 min., m/z = 564 $(M-H)^-$

Ejemplo 3A

O-({(3S)-4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritilsulfanil)propan-2-il]amino}-3-[(terc-butoxi-carbonil)amino]-4-oxobutil}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato de alilo

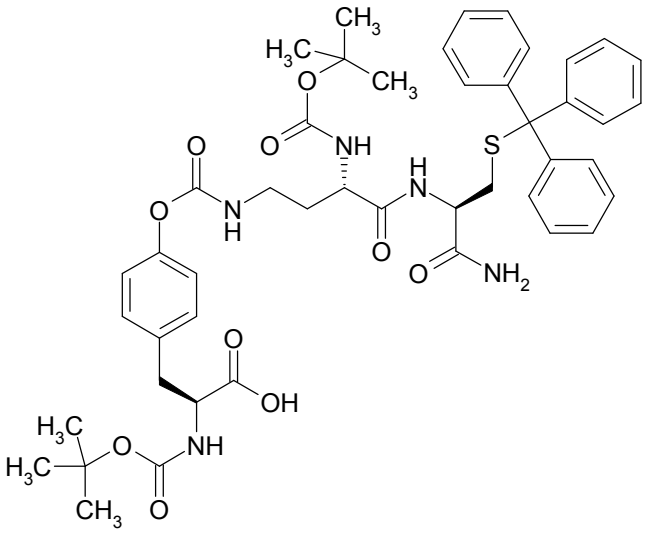


Se disolvieron 2,50 g (4,42 mmol) del compuesto del ejemplo 2A en 100 ml de diclorometano. Se adicionaron 1,602 g (4,42 mmol) de S-Tritil-L-cisteinamida, 0,77 ml (4,42 mmol) de N,N-diisopropiletilamina y 1,68 g (4,42 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se dividió en 5 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo

sellado a 60 ºC en un sintetizador por microondas. De la mezcla de reacción combinada se eliminó el disolvente mediante evaporación rotativa (aprox. 40 ºC, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min.). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1, diclorometano/metanol 20/1 y diclorometano/metanol 10/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 4,12 g (3,30 mmol, 75 % del teórico, 73 % pureza) del producto deseado. CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,36 min., m/z = 911 $(M+H)^+$

Ejemplo 4A

O-({(3S)-4-{[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritilsulfanil)propan-2-il]amino}-3-[(terc-butoxicarbonil)-amino]-4-oxobutil}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



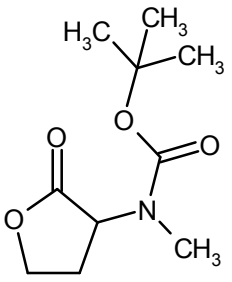
Se disolvieron 4,14 g (4,55 mmol) del compuesto del ejemplo 3A en 90 ml de tetrahidrofurano. Se adicionaron 3,17 ml (22,8 mmol) de trietilamina, 0,86 ml (22,8 mmol) de ácido fórmico y 0,526 g (0,455 mmol) de tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 100 ml de agua, y se extrajo dos veces con aprox. 100 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1 y diclorometano/metanol 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 2,62 g de producto en bruto de 94,5 % de pureza. El producto se purificó ulteriormente mediante RP-HPLC preparativa en un C18 con un gradiente agua/metanol para dar 2,35 g (2,70 mmol, 59 % del teórico) de producto puro.

CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,22 min., m/z = 871 $(M+H)^+$

^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6, δ/ppm): δ = 7,92 (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,28-7,35 (m, 12H), 7,25-7,28 (t, 3H), 7,15-7,20 (m, 4H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (q, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,11 (m, 3H), 2,90 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 1,84 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,34 (d, 18H).

Ejemplo 5A

terc-Butil-metil(2-oxotetrahidrofuran-3-il)carbamato



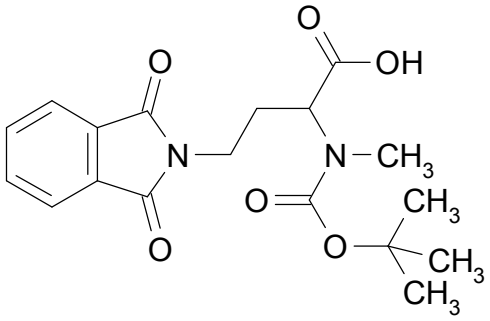
El compuesto se sintetizó de acuerdo con Alberico, Dino; Paquin, Jean-Francois; Lautens, Mark; Tetrahedron, 2005, vol. 61, págs. 6283 - 6297.

Se disolvieron 5,18 g (25,7 mmol) de terc-butil(tetrahidro-2-oxo-3-furanil)carbamato, 4,81 ml (77,2 mmol) de yodometano en 100 ml de dimetilformamida seca. La solución se secó a 0 ºC y se adicionó 1,34 g (60 % en aceite mineral, 33,5 mmol) de hidruro de sodio. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se adicionó a aprox. 400 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con aprox. 300 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 8,70 g (25,7 mmol, 100 % del teórico, 63 % pureza) del producto deseado.

Los datos analíticos fueron acordes con la literatura. El producto se usó en el próximo paso de síntesis sin otra purificación.

Ejemplo 6A

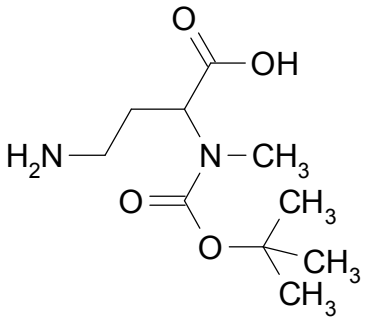
Ácido 2-[(terc-butoxicarbonil)(metil)amino]-4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)butanoico



Se disolvieron 8,70 g (aprox. 25 mmol, aprox. 63 % pureza) del compuesto del ejemplo 5A en 560 ml de dimetilformamida. Se adicionaron 8,23 g (44,4 mmol) de oftalimida de potasio y la mezcla de reacción se calentó a 150 ºC durante 7 h. Se eliminó aprox. 400 ml del disolvente mediante evaporación rotativa (aprox. 60 ºC, aprox. 10 mbar, aprox. 30 min.). La mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de aprox. 100 ml de agua, 200 g de hielo y 15 ml de ácido acético. Después de descongelar el hielo restante se filtró la mezcla de reacción y el filtrado se extrajo 3 veces con aprox. 100 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 70 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 9/1 hasta diclorometano/acetato de etilo 6/4. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 2,39 g (6,04 mmol, 24 % del teórico) de producto.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 0,92 min., m/z = 363 $(M+H)^+$

Ejemplo 7A

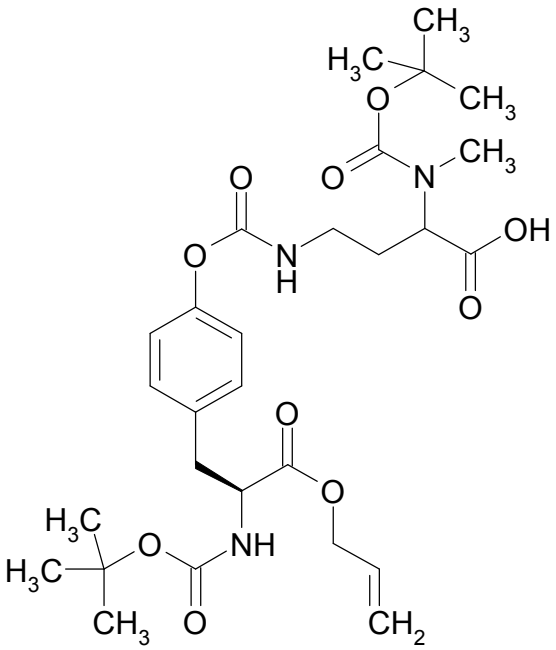
Ácido 4-amino-2-[(terc-butoxicarbonil)(metil)amino]butanoico



Se disolvieron 11,8 g (32,6 mmol) del compuesto del ejemplo 6A en aprox. 640 ml de etanol y se adicionó 23,8 ml (488 mmol) de hidrato de hidrazina a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche, se filtró la mezcla de reacción y el filtrado se concentró a sequedad bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en etanol y se adicionaron aprox. 50 g de gel de sílice, se eliminó el disolvente bajo presión reducida. El sólido resultante se adicionó a una columna de aprox. 500 g de gel de sílice y se sometió a cromatografía. Los disolventes usados fueron diclorometano/metanol 9/1 hasta diclorometano/metanol 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 2,98 g (12,8 mmol, 39 % del teórico) del producto.
CL/EM (procedimiento 2): R_t = 0,21 min., m/z = 233 $(M+H)^+$
EM DCI (procedimiento 5): m/z = 233 $(M+H)^+$

Ejemplo 8A

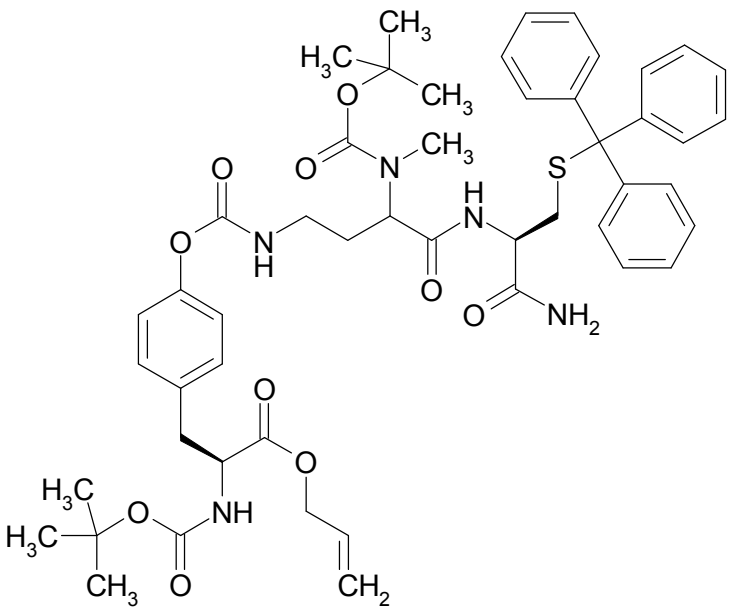
Ácido 4-{[(4-{(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)-carbonil]-amino}-2-[(terc-butoxicarbonil)-(metil)amino]butanoico



Se disolvió 0,931 g (1,92 mmol) del compuesto del ejemplo 1A en 30 ml de diclorometano. Se adicionaron 0,455 g (1,92 mmol) del compuesto del ejemplo 7A. La mezcla de reacción se dividió en 2 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo sellado a 80 ºC en un sintetizador por microondas. De la mezcla de reacción combinada se eliminó el disolvente bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente agua metanol de 9/1 a 1/9. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 0,523 g (0,85 mmol, 44 % del teórico) del producto deseado como una mezcla de 2 diastereómeros.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,08 y 1,11 min., m/z = 578 $(M-H)^-$

Ejemplo 9A

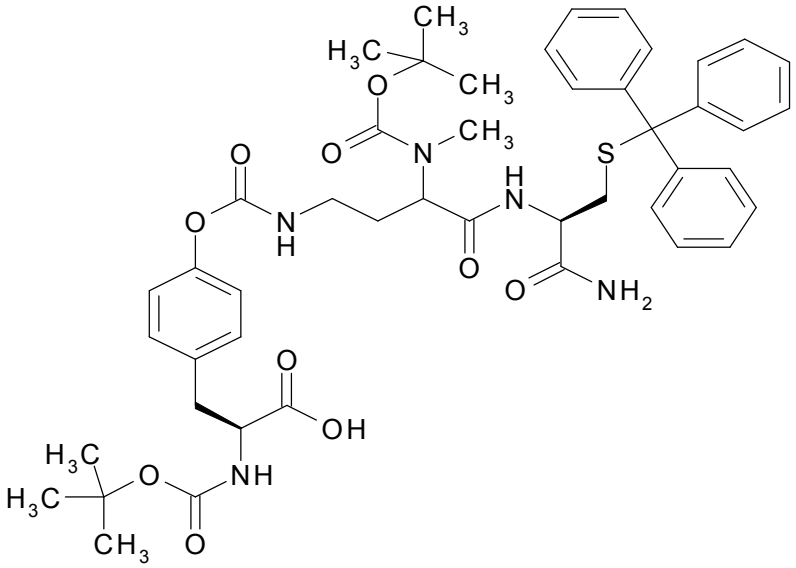
O-[(4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritilsulfanil)propan-2-il]amino}-3-[(terc-butoxicarbonil)-(metil)amino]-4-oxobutil)carbamoil]-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato de alilo



Se disolvieron 2,24 g (3,86 mmol) del compuesto del ejemplo 8A en 100 ml de diclorometano. Se adicionaron 1,401 g (3,86 mmol) de S-Tritil-L-cisteinamida, 0,67 ml (3,86 mmol) de N,N-diisopropiletilamina y 1,47 g (3,86 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se dividió en 5 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo sellado a 60 ºC en un sintetizador por microondas. De la mezcla de reacción combinada se eliminó el disolvente mediante evaporación rotativa (aprox. 40 ºC, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min.). El producto en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente agua metanol de 9/1 a 1/9. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 3,26 g (2,75 mmol, 71 % del teórico, 78 % pureza) del producto deseado como una mezcla de diastereómeros.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,41 y 1,43 min., m/z = 924 $(M+H)^+$

Ejemplo 10A

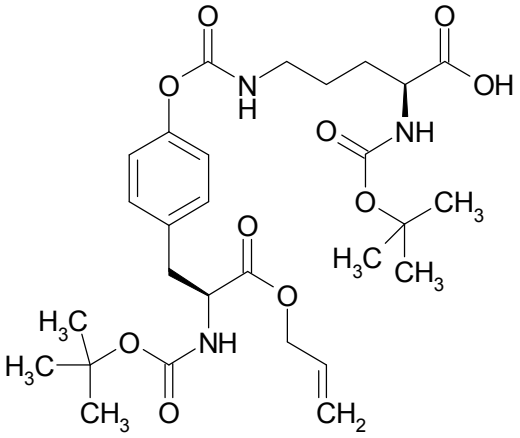
O-[(4-{[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritilsulfanil)propan-2-il]amino}-3-[(terc-butoxicarbonil)-(metil)amino]-4-oxobutil)carbamoil]-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



Se disolvieron 2,2 g (2,38 mmol) del compuesto del ejemplo 9A en 48 ml de tetrahidrofurano. Se adicionaron 1,66 ml (11,9 mmol) de trietilamina, 0,45 ml (11,9 mmol) de ácido fórmico y 0,275 g (0,238 mmol) de tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 50 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 100 g de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 50/1 y diclorometano/metanol 4/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 1,44 g (1,61 mmol, 68 % del teórico) del producto como una mezcla de diaestereómeros.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,20 y 1,24 min., m/z = 884 $(M+H)^+$
^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6, δ/ppm): δ = 8,00 (m, 1H), 7,65-7,90 (m, 4H), 7,18-7,35 (m, 18H), 7,10 (m, 2H), 6,96 (m, 4H), 4,60 (m, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,05 (m, 2H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 6H), 2,36 (m, 3H), 2,00 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,40 (m, 3H), 1,35 (s, 18H).

Ejemplo 11A

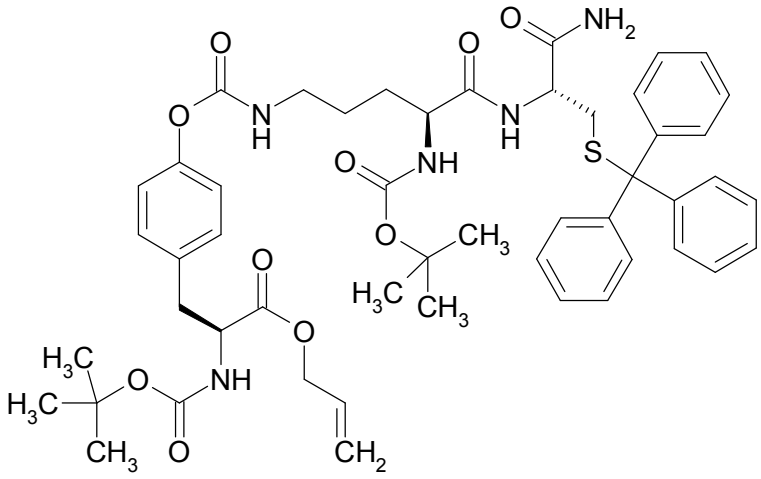
N^5-[(4-{(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)-carbonil]-N^2-(terc-butoxicarbonil)-L-ornitina



Se disolvieron 6,00 g (12,33 mmol) del compuesto del ejemplo 1A en 120 ml de diclorometano. Se adicionaron 2,57 g (12,33 mmol) de N^2-(terc-Butoxicarbonil)-L-ornitina. La mezcla de reacción se dividió en 6 porciones. Las porciones se calentaron durante 90 min en un tubo sellado a 75 ºC en un sintetizador por microondas. La mezcla de reacción combinada se extrajo con aprox. 100 ml de solución saturada de cloruro de amonio. La fase acuosa se re-extrajo dos veces con aprox. 30 ml de diclorometano cada vez. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con aprox. 50 ml de salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/ metanol 40/1 a diclorometano/metanol 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 2,63 g (4,06 mmol, 33 % del teórico, 89 % pureza) del producto deseado.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,03 min., m/z = 578 $(M-H)^-$

Ejemplo 12A

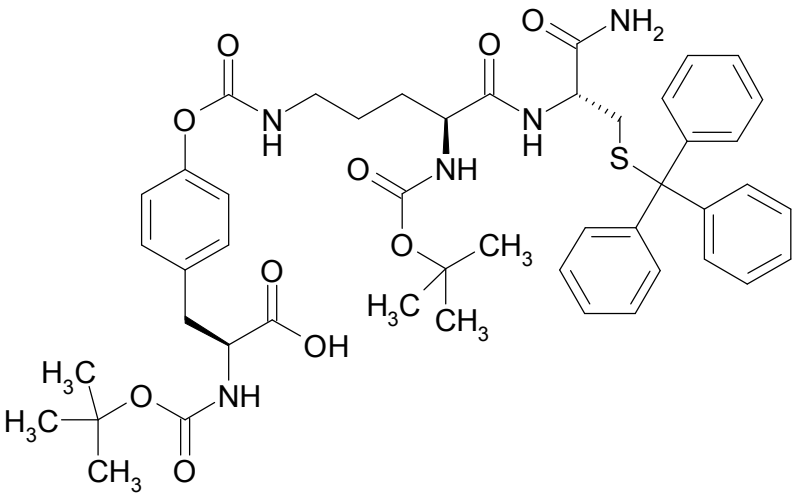
N^5-[(4-{(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)-carbonil]-N^2-(terc-butoxicarbonil)-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida



Se disolvió 1,20 g (2,07 mmol) del compuesto del ejemplo 11A en 48 ml de diclorometano. Se adicionaron 0,750 g (2,07 mmol) de S-Tritil-L-cisteinamida, 0,36 ml (2,07 mmol) de N,N-diisopropiletilamina y 0,787 g (2,07 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se dividió en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo sellado a 60 ºC en un sintetizador por microondas. De la mezcla de reacción combinada se eliminó el disolvente mediante evaporación rotativa (aprox. 40 ºC, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min.). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 400 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 1,30 g (1,5 mmol, 56 % del teórico, 82 % pureza) del producto deseado.
CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,35 min., m/z = 924 $(M+H)^+$

Ejemplo 13A

N^2-(terc-Butoxicarbonil)-N^2-[(4-{(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil}fenoxi)-carbonil]-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida



Se disolvieron 3,06 g (2,33 mmol) del compuesto del ejemplo 12A en 46 ml de tetrahidrofurano. Se adicionaron 1,63 ml (11,6 mmol) de trietilamina, 0,44 ml (11,6 mmol) de ácido fórmico y 0,265 g (0,233 mmol) de tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 50 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 40/1 y diclorometano/metanol 1/1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. Esto dio 1,40 g de producto en bruto de 86 % pureza. El producto se purificó ulteriormente mediante RP-HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente agua/metanol para dar 2 fracciones: 0,93 g de producto (45 % del teórico).

CL/EM (procedimiento 1): R_t = 1,18 min., m/z = 885 $(M+H)^+$

^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6, δ/ppm): δ = 7,89 (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,25-7,35 (m, 12H), 7,20-7,25 (m, 6H), 7,10-7,20 (m, 3H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,11 (d, 1H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 2H), 2,36 (m, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,51 (m, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

Ejemplo 14A

Resina de amida basada en Tentagel enlazada con ADM (2-52)

El péptido fue ensamblado paso a paso sobre una resina de amida basada en Tentagel en un sintetizador automático de péptidos (Protein Technologies Inc. Symphony). Se usaron 8 recipientes de reacción de poli-propileno para llevar a cabo en forma paralela el mismo procedimiento químico. En cada recipiente se cargó 0,05 mmol de resina Rink basada en Tentagel hasta un tamaño total de lote de 0,4 mmol.

Cada aminoácido se adicionó con acceso 8 veces molar respecto de la carga de la resina. Los aminoácidos se protegieron con Fmoc como el grupo de protección N-terminal y se usaron los grupos de protección indicados a continuación para la funcionalidad de las cadenas laterales. También se adicionaron 188 mg (0,59 mmol, 7,8 eq.) de TBTU y 0,21 ml (1,2 mmol, 16 eq.) de DIEA. Las reacciones se llevaron a cabo en DMF como disolvente, usándose DMF en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente. El tiempo de reacción por aminoácido fue de aprox. 1 hora. Se logró la escisión del grupo de protección Fmoc usando 20 % piperidina/DMF, usándose 20 % piperidina/DMF en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente.

La secuencia de acoplamiento fue la siguiente:

1. Tyr(tBu) (Tyr = Y = AA 52 de ADM humana)
2. Gly (Gly = G = AA 51 de ADM humana)
3. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 50 de ADM humana)

4. Pro (Pro = P = AA 49 de ADM humana)

5. Ser(tBu) (Ser = S = AA 48 de ADM humana)

6. Ile (Ile = I = AA 47 de ADM humana)

7. Lys(Boc) (Lys = K = AA 46 de ADM humana)

8. Ser(tBu) (Ser = S = AA 45 de ADM humana)

9. Arg(pbf) (Arg = R = AA 44 de ADM humana)

10. Pro (Pro = P = AA 43 de ADM humana)

11. Ala (Ala = A = AA 42 de ADM humana)

12. Val (Val = V = AA 41 de ADM humana)

13. Asn(Trt) (Asn = N = AA 40 de ADM humana)

14. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 39 de ADM humana)

15. Lys(Boc) (Lys = K = AA 38 de ADM humana)

16. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 37 de ADM humana)

17. Lys(Boc) (Lys = K = AA 36 de ADM humana)

18. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 35 de ADM humana)

19. Thr(tBu) (Thr = T = AA 34 de ADM humana)

20. Phe (Phe = F = AA 33 de ADM humana)

21. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 32 de ADM humana)

22. Tyr(tBu) (Tyr = Y = AA 31 de ADM humana)

23. Ile (Ile = I = AA 30 de ADM humana)

24. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 29 de ADM humana)

25. His(Trt) (His = H = AA 28 de ADM humana)

26. Ala (Ala = A = AA 27 de ADM humana)

27. Leu (Leu = L = AA 26 de ADM humana)

28. Lys(Boc) (Lys = K = AA 25 de ADM humana)

29. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 24 de ADM humana)

30. Val (Val = V = AA 23 de ADM humana)

31. Thr(tBu) (Thr = T = AA 22 de ADM humana)

32. Cys(Trt) (Cys = C = AA 21 de ADM humana)

33. Thr(tBu) (Thr = T = AA 20 de ADM humana)

34. Gly (Gly = G = AA 19 de ADM humana)

35. Phe (Phe = F = AA 18 de ADM humana)

36. Arg(pbf) (Arg = R = AA 17 de ADM humana)

37. Cys(Acm) (Cys = C = AA 16 de ADM humana)

38. Gly (Gly = G = AA 15 de ADM humana)

39. Phe (Phe = F = AA 14 de ADM humana)

40. Ser(tBu) (Ser = S = AA 13 de ADM humana)

41. Arg(pbf) (Arg = R = AA 12 de ADM humana)

42. Leu (Leu = L = AA 11 de ADM humana)

43. Gly (Gly = G = AA 10 de ADM humana)

44. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 9 de ADM humana)

45. Phe (Phe = F = AA 8 de ADM humana)

46. Asn(Trt) (Asn = N = AA 7 de ADM humana)

47. Asn(Trt) (Asn = N = AA 6 de ADM humana)

48. Met (Met = M = AA 5 de ADM humana)

49. Ser(tBu) (Ser = S = AA 4 de ADM humana)

50. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 3 de ADM humana)

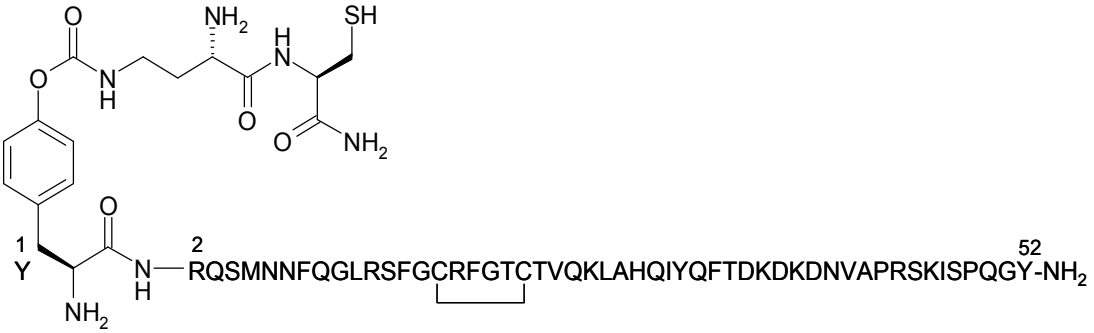
51. Arg(pbf) (Arg = R = AA 2 de ADM humana)

La oxidación sobre la resina se realizó usando la protección de Cys(Trt) y Cys(Acm) con la escisión concomitante de grupos de protección y la oxidación a un enlace disulfuro usando yoduro (8 equivalentes de yoduro más 8 equivalentes de DIEA con un tiempo de reacción de 30 minutos). La oxidación se confirmó mediante la escisión de una muestra y el análisis usando HPLC y EM MALDI.

Se unieron los 8 lotes para un empleo posterior.

Ejemplo 15A

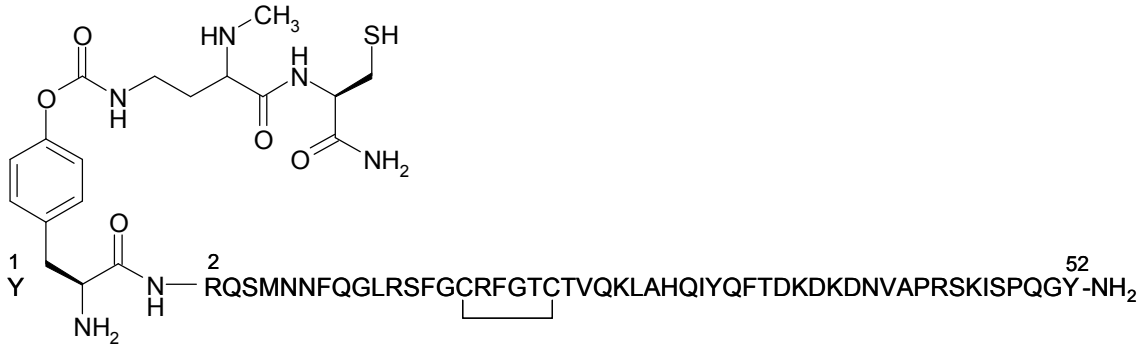
O-{[(3S)-3-Amino-4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-sulfanilpropan-2-il]amino}-4-oxobutil]-carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina (2-52)



A 0,075 mmol del compuesto del ejemplo 14A se adicionaron 520 mg (0,6 mmol, 8 eq.) del compuesto del ejemplo 4A. Asimismo se adicionaron 188 mg (0,59 mmol, 7,8 eq.) de TBTU y 0,21 ml (1,2 mmol, 16 eq.) de DIEA. La reacción se realizó con DMF como disolvente, usándose DMF en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente. El tiempo de reacción fue de aprox. 1 hora a temperatura ambiente. El péptido se escindió de la resina mientras se realizaba la desprotección global en forma concomitante usando TFA concentrado en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente, mientras TFA contenía antioxidante (1- 5 % en cada caso de agua, fenol, tioanisol y 1,2-etanodiol), con un tiempo de reacción de 2 ½ horas. El producto en bruto se liofilizó y purificó mediante cromatografía de fase reversa usando 0,1 % de TFA en agua y 0,1 % de TFA en acetonitrilo como fases móviles para asegurar que el valor de pH continuaba siendo menor de 4 todas las veces durante el procedimiento de purificación y liofilización. Se combinaron todas las fracciones que contenían el ion correcto mediante análisis EM MALDI. El rendimiento fue 44,0 mg de péptido parcialmente purificado (aprox. 0,0035 mmol, aprox. 4,7 % del teórico; pureza estimada: aprox. 50 %, impureza principal: ADM (2-52)).
EM MALDI (procedimiento 6): m/z = 6275$(M+H)^+$ y 5866 (impureza: $(ADM(2-52)+H)^+$)

Ejemplo 16A

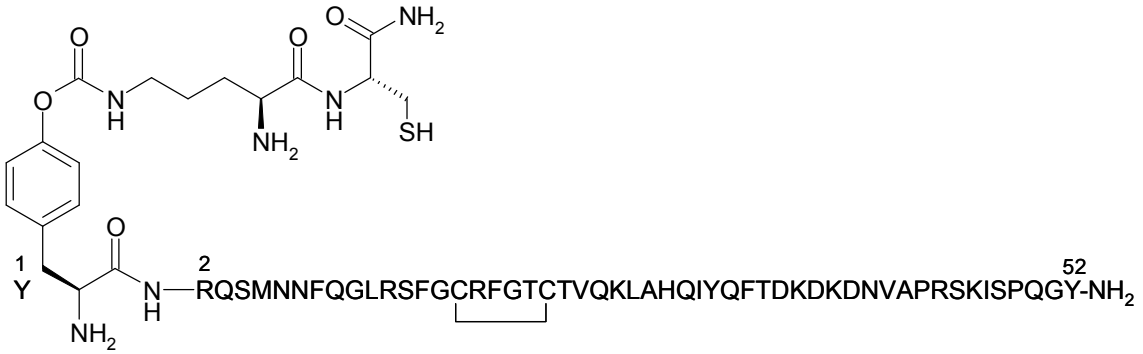
O-{[4-{[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-sulfanilpropan-2-il]amino}-3-(metilamino)-4-oxobutil]-carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina(2-52)



A 0,075 mmol del compuesto del ejemplo 14A se adicionaron 530 mg (0,6 mmol, 8 eq.) del compuesto del ejemplo 10A. También se adicionaron 188 mg (0,59 mmol, 7,8 eq.) de TBTU y 0,21 ml (1,2 mmol, 16 eq.) de DIEA. La reacción se realizó con DMF como disolvente, usándose DMF en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente. El tiempo de reacción fue de aprox. 1 hora a temperatura ambiente. El péptido se escindió de la resina mientras se realizaba la desprotección global en forma concomitante usando TFA concentrado en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente, mientras TFA contenía aceptores (1- 5 % en cada caso de agua, fenol, tioanisol y 1,2-etanodiol), con un tiempo de reacción de 2 ½ horas. El producto en bruto se liofilizó y purificó mediante cromatografía de fase reversa usando 0,1 % de TFA en agua y 0,1 % de TFA en acetonitrilo como fases móviles para asegurar que el valor de pH permanecía en un valor menor de 4 todas las veces durante el procedimiento de purificación y liofilización. Se combinaron todas las fracciones que contenían el ión correcto mediante análisis EM MALDI. El rendimiento fue 34,0 mg de péptido parcialmente purificado (aprox. 0,0026 mmol, aprox. 3,5 % del teórico; pureza estimada: aprox. 50 %, impureza principal: ADM (2-52)).
EM MALDI (procedimiento 6): m/z = 6289$(M+H)^+$ y 5866 (impureza: $(ADM(2-52)+H)^+$)

Ejemplo 17A

O-{[(4R)-4-Amino-5-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-sulfanilpropan-2-il]amino}-5-oxopentil]-carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina(2-52)



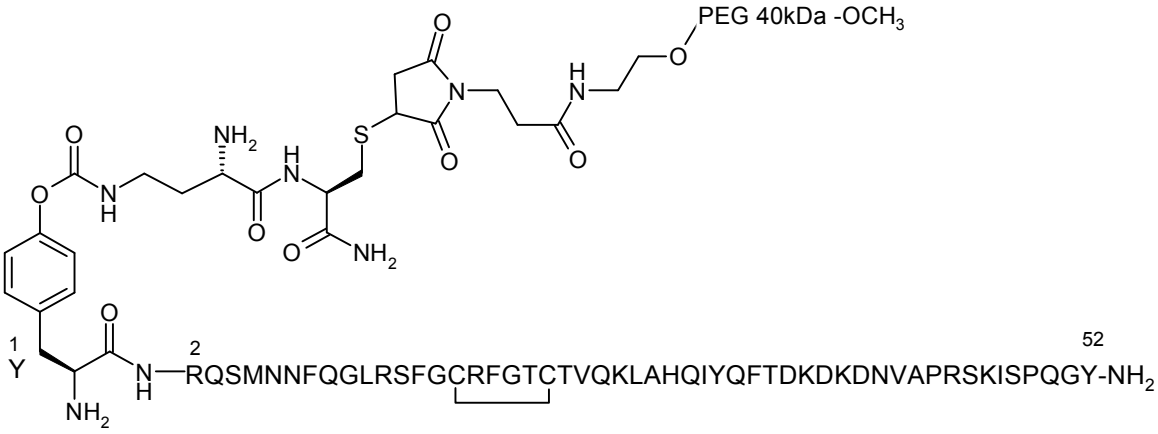
A 0,075 mmol del compuesto del ejemplo 14A se adicionaron 530 mg (0,6 mmol, 8 eq.) del compuesto del ejemplo 13A. También se adicionaron 188 mg (0,59 mmol, 7,8 eq.) de TBTU y 0,21 ml (1,2 mmol, 16 eq.) de DIEA. La reacción se realizó con DMF como disolvente, usándose DMF en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente. El tiempo de reacción fue de aprox. 1 hora a temperatura ambiente. El péptido se escindió de la resina mientras se realizaba la desprotección global en forma concomitante usando TFA concentrado en una cantidad suficiente para hinchar la resina y agitarla libremente, mientras TFA contenía aceptores (1- 5 % en cada caso de agua, fenol, tioanisol y 1,2-etanodiol), con un tiempo de reacción de 2 ½ horas. El producto en bruto se liofilizó y purificó mediante cromatografía de fase reversa usando 0,1 % de TFA en agua y 0,1 % de TFA en acetonitrilo como fases móviles para asegurar que el valor de pH permanecía en un valor menor de 4 todas las veces durante el procedimiento de purificación y liofilización. Se combinaron todas las fracciones que contenían el ion correcto mediante análisis EM MALDI. El rendimiento fue 47 mg de péptido parcialmente purificado (aprox. 0,0037 mmol, aprox. 5,0 % del teórico; pureza estimada: aprox. 50 %, impureza principal: ADM (2-52)).
EM MALDI (procedimiento 6): m/z = 6289$(M+H)^+$ y 5866 (impureza: $(ADM(2-52)+H)^+$)

<u>Ejemplos de trabajo</u>

Ejemplo 1

O-{[(3S)-3-amino-4-({(2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ω-metoxi-poli-

oxietilen[40 kDa]}etil)amino]propil}pirrolidin-3-il)sulfanil]-1-oxopropan-2-il}amino)-4-oxobutil]carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina (2-52)



Se agitaron 44 mg del péptido crudo del ejemplo 15A con 426 mg (10,5 µmol, 1,5 equivalentes, fuente de Dr. Reddys) 40 kDa metoxi poli(etilenglicol) maleimido propionamida en 9 ml de tampón de citrato de pH 4 durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción cruda se inyectó en dos porciones en un sistema de HPLC preparativa con una columna de Phenomenex Luna 10µ Proteo C5 100A AXIA 250 mm x 21,2 mm y se sometió a cromatografía con un gradiente de agua/acetonitrilo (ambos con TFA al 0,1 %). Las fracciones se recolectaron en tubos de ensayo de 20 ml en un colector de fracciones automático. Para asegurar la suficiente acidez cada vial se llenó con 0,5 ml de ácido acético previo a la recolección.

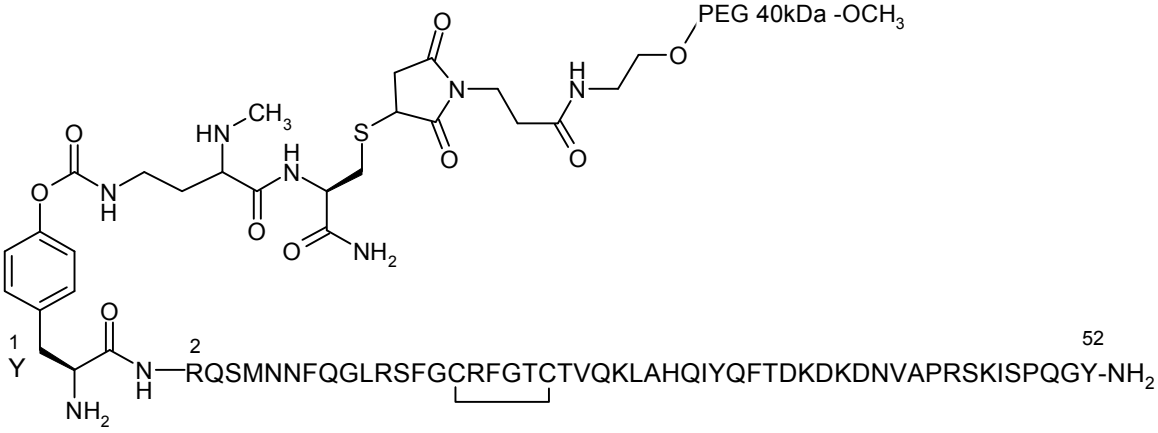
ADM(2-52), que es el subproducto del ejemplo 15A y que no pasó por PEGilación en esta reacción, así como el PEG sin reaccionar se eliminaron completamente.

Todas las fracciones que contenían el ejemplo 1 se combinaron. Se eliminó parcialmente acetonitrilo en un evaporador rotativo a temperatura de baño de agua de 30 ºC y aproximadamente 50 mbar durante aproximadamente 30 minutos.

Después de la adición de 0,5 ml de ácido acético, la solución restante se liofilizó. El rendimiento total del ejemplo 1 fue 109 mg (2,35 µmol, 33 % del teórico).
HPLC (procedimiento 3): R_t = 4,23 – 4,30 minutos

Ejemplo 2

O-{[(3-N-metil-amino-4-({(2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ω-metoxi-poli-oxietilen[40 kDa]}etil)amino]propil}pirrolidin-3-il)sulfanil]-1-oxopropan-2-il}amino)-4-oxobutil]carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina (2-52)



Se agitaron 15 mg del péptido crudo del ejemplo 16A con 145 mg (3,58 µmol, 1,5 equivalentes, fuente de Dr. Reddys) metoxi poli(etilenglicol) 40 kDa maleimido propionamida en 5 ml de tampón de citrato de pH 4 durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción cruda se inyectó en un sistema de HPLC preparativa con una columna Phenomenex Jupiter 10µ C18 300A 250 mm x 21,2 mm y se sometió a cromatografía con un gradiente de agua/acetonitrilo (ambos con TFA al 0,1 %). Las fracciones se recolectaron en tubos de ensayo de 20 ml de en

un colector de fracciones automático. Para asegurar la suficiente acidez cada vial se llenó con 0,5 ml de ácido acético previo a la recolección.

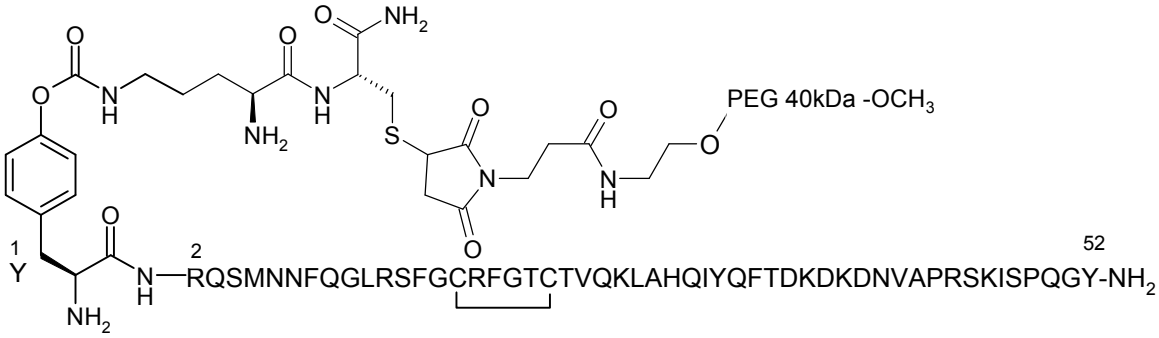
ADM(2-52), que es el subproducto del ejemplo 16A y que no pasó por PEGilación en esta reacción, así como el PEG sin reaccionar se eliminaron completamente.

Todas las fracciones que contenían el ejemplo 2 se combinaron. Se eliminó parcialmente acetonitrilo en un evaporador rotativo a temperatura de baño de agua de 30 ºC y aproximadamente 50 mbar durante aproximadamente 30 minutos.

Después de la adición de 0,5 ml de ácido acético, la solución restante se liofilizó. El rendimiento total del ejemplo 2 fue 50 mg (1,08 µmol, 43 % del teórico).
HPLC (procedimiento 4): R_t = 2,02 – 2,08 minutos

Ejemplo 3

O-{[(4S)-4-amino-5-({(2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ω-metoxi-poli-oxietilen[40 kDa]}etil)amino]propil}pirrolidin-3-il)sulfanil]-1-oxopropan-2-il}amino)-5-oxopentil]carbamoil}-L-tirosil-adrenomedulina (2-52)



Se agitaron 15 mg del péptido crudo del ejemplo 17A con 145 mg (3,58 µmol, 1,5 equivalentes, fuente de Dr. Reddys) metoxi poli(etilenglicol) 40 kDa maleimido propionamida en 5 ml de tampón de citrato de pH 4 durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción cruda se inyectó en un sistema de HPLC preparativa con una columna de Phenomenex Jupiter 10µ Proteo 90A AXIA 250 mm x 21,2 mm y se sometió a cromatografía con un gradiente de agua/acetonitrilo (ambos con TFA al 0,1 %). Las fracciones se recolectaron en tubos de ensayo de 20 ml de en un colector de fracciones automático. Para asegurar la suficiente acidez cada vial se llenó con 0,5 ml de ácido acético previo a la recolección.
ADM(2-52), que es el subproducto del ejemplo 17A y que no pasó por PEGilación en esta reacción, así como el PEG sin reaccionar se eliminaron completamente.

Todas las fracciones que contenían el ejemplo 3 se combinaron. Se eliminó parcialmente acetonitrilo en un evaporador rotativo a temperatura de baño de agua de 30 ºC y aproximadamente 50 mbar durante aproximadamente 30 minutos.

Después de la adición de 0,5 ml de ácido acético, la solución restante se liofilizó. El rendimiento total del ejemplo 3 fue 19,5 mg (0,42 µmol, 17 % del teórico).
HPLC (procedimiento 4): R_t = 2,02 – 2,08 minutos

B. <u>Evaluación de la actividad farmacológica</u>

La aplicabilidad de los compuestos en conformidad con la invención para el tratamiento de enfermedades puede demostrarse utilizando los siguientes sistemas de ensayo:

1) Descripciones de ensayos (*in vitro*)

1a) Ensayos en una célula recombinante informante del receptor de adrenomedulina

La actividad de los compuestos en conformidad con la invención se cuantifica con la ayuda de una línea celular recombinante de ovario de hámster de China (CHO) que lleva el receptor de adrenomedulina humana. La activación del receptor por ligandos puede medirse por luminiscencia de aequorina. La construcción de la línea celular y procedimiento de medición se ha descrito en detalle [Wunder F., Rebmann A., Geerts A, y Kalthof B., *Mol Pharmacol,* 73, 1235–1243 (2008)]. En resumen: Las células se siembran en placas de microtitulación de 384 pocillos opacas a una densidad de 4000 células/ pocillo y se cultivan durante 24 horas. Después de la eliminación

del medio de cultivo, las células se cargan durante 3 horas con 0,6 µg/ml de coelenterazina en solución Tyrode libre de Ca^{2+} (cloruro de sodio 130 mM, cloruro de potasio 5 mM, HEPES 20 mM ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), cloruro de magnesio 1 mM, e hidrocarbonato de sodio 4,8 mM, pH 7,4) suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 0,2 mM (IBMX) en un incubador de cultivo celular. Los compuestos se añaden durante 6 minutos en solución Tyrode libre de calcio^{2+} que contiene albúmina de suero bovino al 0,1 %. Inmediatamente antes de añadir el calcio^{2+} hasta una concentración final de 3 mM se inicia la medición de la luminiscencia de aequorina mediante el uso de un luminómetro apropiado. La luminiscencia se mide durante 60 segundos. En un experimento típico los compuestos se ensayan en un rango de concentración de 1 x 10^{-13} a 3 x 10^{-6} M.

A fin de determinar la liberación de la adrenomedulina activa de los compuestos en conformidad con la invención, los compuestos se incuban en diferentes concentraciones durante diferentes períodos de tiempo hasta 24 horas en solución Tyrode complementada con suero fetal bovino, medio de cultivo celular o plasma de diferentes especies a pH 7,4. El contenido de calcio^{2+} del respectivo medio de incubación es tamponado mediante la adición de EDTA 4 mM (ácido etilendiamino tetra acético) antes de añadir las muestras a la célula informante del receptor de adrenomedulina.

Después de la preincubación apropiada, los ejemplos de la realización activan la célula informante del receptor de adrenomedulina en forma más potente que antes de la preincubación. Esto está indicado por el hecho de que los valores de EC_{50} están determinado por un factor de hasta 10 más pequeño después de la preincubación que antes y es explicable por la liberación de la adrenomedulina activa de los compuestos.

Los valores representativos EC_{50} para los ejemplos de la realización antes y después de la incubación durante 24 horas en tampón complementado con suero fetal bovino al 2,5 % se proporcionan en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Ejemplo n. º	EC_{50} T = 0 h [nM]	EC_{50} T = 24 h [nM]
ADM	0,5	2,5
1	110	8,4
2	> 1000	161
3	124	12,3

1b) Ensayos de resistencia eléctrica transcelular en células endoteliales

La actividad de los compuestos en conformidad con la invención está caracterizada en los ensayos de permeabilidad in *vitro en* células venosas umbilicales humanas (HUVEC, Lonza). Mediante el uso del equipo ECIS (ECIS: *Electric Cell-substrate Impedance Sensing*; Applied Biophysics Inc; Troy, NY) los cambios de resistencia eléctrica transendotelial (TEER) sobre una monocapa endotelial se miden continuamente mediante el uso de un pequeño electrodo de oro en el que las células se han sembrado. Las HUVEC se hacen crecer en las placas de electrodo sensor de 96 pocillos (96W1E, Ibidi GmbH, Martinsried) hasta la confluencia de monocapas y la hiperpermeabilidad puede inducirse por estímulos inflamatorios tales como Trombina, TNF-α, IL-1β, VEGF, Histamina y peróxido de hidrógeno, en los que se ha demostrado que todos provocan descomposición de los contactos de células endoteliales y reducción de TEER. Se utiliza trombina en una concentración final de 0,5 U/ml. Los compuestos del ensayo se añaden antes o después de la adición de trombina. En un experimento típico los compuestos se ensayan en un rango de concentración de 1 x 10^{-10} a 1 x 10^{-6} M.

Los ejemplos de la realización inhiben la hiperpermeabilidad inducida por trombina en este ensayo en concentraciones de ≤ 10^{-6} M.

1c) Ensayos de permeabilidad i*n vitro* en células endoteliales

En otro modelo *in vitro* de hiperpermeabilidad endotelial la actividad de los compuestos en conformidad con la invención se evalúa con respecto a la modulación de la permeabilidad macromolecular. Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECS) se hacen crecer hasta la confluencia en membranas de filtro Transwell® recubiertas con fibronectina (placas de 24 pocillos, inserciones de 6,5 mm con membrana de policarbonato de 0,4 µM; Costar #3413) que separan una cámara de cultivo tisular superior de una inferior con células endoteliales que crecen en la parte inferior de la cámara superior. El medio de la cámara superior es suplementado con 250 µg/ml de FITC-dextrano 40 kDa (Invitrogen, D1844). La hiperpermeabilidad de la monocapa es inducida por la adición de trombina hasta una concentración final de 0,5 U/ml. Las muestras del medio se recolectan de la cámara inferior cada 30 minutos y se mide la fluorescencia relativa como un parámetro para los cambios de permeabilidad macromolecular en el tiempo en un fluorímetro apropiado. El estímulo de trombina induce casi una duplicación de transición de FITC-dextrano en todas la monocapas endoteliales. En un experimento típico los compuestos se

ensayan en un rango de concentración de 1 x 10^{-10} a 1 x 10^{-6} M.

Los ejemplos de la realización inhiben la hiperpermeabilidad inducida por trombina en este ensayo en concentraciones de ≤ 10^{-6} M.

2. Descripciones del ensayo (*in vivo*)

2a) Medición de la presión sanguínea y pulso cardíaco en ratas Wistar normotensivas, telemetradas

Los efectos cardiovasculares inducidos por los compuestos en conformidad con la invención se investigan en ratas Wistar hembra conscientes de libre movimiento (peso corporal > 200 g) por medición radio telemétrica de la presión sanguínea y pulso cardíaco. En resumen, el sistema telemétrico (DSI Data Science International, MN, EEUU) está compuesto por 3 elementos básicos: transmisores implantables (TA11PA-C40), receptores (RA1010) y un software de adquisición basado en informática (Dataquest™ A.R.T. 4.1 para Windows). Las ratas fueron instrumentadas con implantes de presión para uso crónico al menos 14 días previo a los experimentos. El catéter sensor se une con sutura 4-0 varias veces para producir un tapón a 0,5 cm de la punta del catéter. Durante el implante del catéter las ratas se anestesiaron con pentobarbital (Nembutal, Sanofi: 50 mg/kg i.p.). Después de afeitar la piel abdominal, se realiza una incisión abdominal de línea media, y el catéter sensor relleno con fluido se inserta corriente arriba en la aorta descendiente expuesta entre la bifurcación ilíaca y las arterias renales. El catéter se liga varias veces al tapón. La punta del catéter telemétrico se ubica justo caudal a las arterias renales y es asegurada por adhesivo tisular. El cuerpo transmisor se fija a la pared peritoneal interna antes del cierre del abdomen. Se utiliza un cierre de dos capas de la incisión abdominal, con sutura individual del peritoneo y la pared muscular seguida por el cierre de la piel externa. Para la protección postquirúrgica contra infecciones y el dolor se inyecta una dosificación simple de un antibiótico (Oxitetraciclina 10 % R, 5,0 ml/kg s.c., beta-pharma GmbH & Co, Alemania) y analgésico (Rimadyl R, 5,0 ml/kg s.c., Pfizer, Alemania). La configuración de hardware está equipada con 24 animales. Cada jaula de rata es colocada en la parte superior de una plataforma receptora individual. Después de la activación de los transmisores implantados, un sistema de adquisición de datos en línea, recoge los datos y convierte las señales de presión telemétrica a mm Hg. Una referencia de presión barométrica permite la relación de la presión absoluta (respecto del vacío) con la presión atmosférica ambiente. El software de adquisición de datos está predefinido para mostrar los datos hemodinámicos durante intervalos de 10 segundos cada 5 minutos. La recolección de datos para archivar se comienza 2 horas antes de la administración de los compuestos de ensayo y se termina después de la finalización de ciclos de 24 horas. En un experimento típico los compuestos de ensayo son administrados en forma de bolo por vía subcutánea o intravenosa en dosis de 1 a 1000 µg/kg de peso corporal (según lo referido al componente peptídico).

La adrenomedulina natural (Bachem, H-2932) induce la reducción de presión sanguínea en este ensayo con duración de ≤ 4 horas cuando se ensaya en dosis de ≤ 300 µg/kg de peso corporal [figura 1].

Figura 1: los perfiles de 24 horas de presión sanguínea arterial media (MABP) registrados a partir de ratas Wistar hembra normotensivas telemetradas después de la administración subcutánea de ADM o vehículo según lo indicado (línea de puntos). Los puntos de datos fueron representados como media ± SEM de intervalos promedio de 30 minutos de 4 animales por grupo. Una hora después de la administración los animales tratados con ADM mostraron una reducción media de MABP de casi 20 % en el pico (círculos llenos). Después de aproximadamente 3,5 horas la MABP había regresado a los niveles de iniciales y estaba en el rango de aquel de los animales tratados con vehículo (círculos abiertos).

En este ensayo las sustancias en conformidad con la presente invención inducen reducción de presión sanguínea de hasta 10 horas en dosis de ≤ 500 µg/kg de peso corporal (según lo referido en el componente peptídico) figura 2].

Figura 2: Los perfiles de 24 horas de la presión sanguínea arterial media (MABP) registrados a partir de ratas Wistar hembra normotensivas telemetradas después de la administración subcutánea del ejemplo 1 o vehículo según lo indicado (línea de puntos). Los puntos de datos fueron representados como media ± SEM de intervalos promedio de 30 minutos de 6 animales por grupo. La administración del ejemplo 1 en una dosis de 150 µg/kg (según lo referido en el componente peptídico) redujo la MABP en aproximadamente 15 a 19 % hasta 6 horas después de la administración (círculos llenos). Entre 6 horas y 14 horas después de la administración la MABP gradualmente regresó a los valores basales y finalmente estuvo en el intervalo de aquel de los animales tratados con vehículo.

2b) Ensayo de fuga vascular de piel en ratas Wistar

Un ensayo de estímulo de histamina intracutánea se emplea para evaluar el efecto de los compuestos en conformidad con la invención en la función de barrera vascular en animales saludables. Las ratas Sprague Dawley macho (peso corporal >200 g) se anestesiaron con isoflurano (2 %-3 % en aire ambiente) y se llevaron a la posición supina. El abdomen se afeita y se inserta un catéter en la vena femoral. El vehículo solamente (0,5ml PBS + albúmina de suero bovino al 0,1 %) o los compuestos de ensayo en dosis apropiadas se administran como inyección de bolo intravenoso. Después de 15 minutos una segunda inyección de 100 µl/kg de solución de azul de Evans al 2 % (Sigma) se administra e inmediatamente a partir de entonces se inyectan por vía intracutánea 100 µl de soluciones de histamina de concentraciones apropiadas (por ejemplo 0 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 µg/ml) en la piel abdominal. El azul de Evans es una tintura altamente unida a la proteína plasmática y por ello se utiliza como

indicador para la extravasación de fluido rico en proteína y fuga vascular. 30 minutos después de este procedimiento las ratas se sacrifican mediante una sobredosis de isoflurano y posterior dislocación de cuello y la piel abdominal se escinde. Las ronchas se escinden mediante el uso de un punzón de biopsia de 8 mm, las muestras de tejido se pesan y son transferidas a formamida durante 48 horas para extraer el azul de Evans. Las muestras se miden en longitud de onda de 620 nM a 750 nM en un fotómetro apropiado y el contenido de azul de Evans de las muestras se corrige en cuanto a los pigmentos hemo en conformidad con la fórmula A620 (corregido) = A620 - (1,426 X A750 + 0,030) y se calcula contra una curva estándar. [Procedimiento adaptado de Wang L.F., Patel M., Razavi H.M., Weicker S., Joseph M.G., McCormack D.G., Mehta S., *Am. Respir Crit Care Med*, **165**(12), 1634-9 (2002)].

Las sustancias en conformidad con la presente invención reducen la extravasación del fluido plasmático rico en proteína inducida por el estímulo de histamina en este ensayo.

2c) Instilación intratraqueal de LPS en ratones

Se emplea un estímulo intratraqueal con lipopolisacárido (LPS) para examinar los efectos de los compuestos en conformidad con la invención en lesión pulmonar aguda. Los ratones BALB/c macho (peso animal promedio 20-23 g) se anestesian con isoflurano (7 %) y se instila LPS de *E. coli* (por ejemplo, serotipo 055:B5; Sigma) en 100 µl de solución salina mediante el uso de una micropipeta. Las dosis típicas de LPS utilizada para el estímulo están en el rango de 1 a 10 mg/kg de peso corporal. En diferentes puntos de tiempo antes y después de la instilación se administran los compuestos del ensayo por vía subcutánea. Las dosis típicas están en el rango de 1 a 300 µg/kg de peso corporal. En este ensayo los puntos de tiempo típicos de administración de los compuestos del ensayo son 15 minutos antes o 1 hora después del estímulo con LPS. 48 horas después de la instilación de LPS los ratones se anestesian profundamente con isoflurano y se sacrifican por dislocación del cuello. Después de la canulación de la tráquea se realiza el lavado del espacio bronquioalveolar con 0,5 ml de solución salina fría con hielo. Los pulmones se preparan y se pesan. Las células en el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) se cuentan en un contador celular (Cell Dyn 3700, Abbott). En este ensayo se encuentra en forma reproducible que el peso del pulmón como medición para edema pulmonar aumenta en aproximadamente 50 % o más respecto de los controles simulados 48 horas después del estímulo con LPS. Como los pesos pulmonares muestran solamente variabilidad muy baja en los grupos, el peso pulmonar absoluto se utiliza como parámetro. Siempre se encuentra que los recuentos de glóbulos blancos se incrementan significativamente respecto del control en el BALF después del estímulo con LPS.

La administración de las sustancias en conformidad con la presente invención dio como resultado una reducción significativa en el peso pulmonar y recuento de glóbulo blancos en el BALF después de 48 horas cuando se administra en forma de bolo en dosis ≤ 300 µg/kg de peso corporal (según lo referido al componente peptídico).

2d) Inducción de lesión pulmonar aguda en mini cerdos

La lesión pulmonar aguda es inducida en mini cerdos anestesiados mediante el uso de lipopolisacárido (LPS) o ácido oleico como estímulos. En detalle: los minicerdos Göttingen hembra de alrededor de 3,5 a 5,5 kg de peso corporal (Ellegaard, Dinamarca) se mantienen anestesiados mediante una infusión continua intravenosa de Ketavet®, Dormicum® y Pancuronium® después de la premedicación con una inyección intramuscular de Ketavet®/Stresnil®. Después de la intubación intratraqueal los animales se ventilaron artificialmente utilizando un respirador pediátrico (Sulla 808V; Dräger, Alemania) con una mezcla de aire oxígeno en un volumen corriente de 30 a 50 ml de y frecuencia constante de 25 min^{-1}. El $PaCO_2$ arterial se ajusta hasta aproximadamente 40 mm Hg regulando la fracción de oxígeno inspirado (FiO_2) a través de la relación de mezcla de oxígeno aire. En forma rutinaria los siguientes parámetros cardiovasculares y respiratorios se miden después de la colocación las de sonda y catéteres necesarios adaptados a los transductores de presión apropiados y al equipo de registro: Presión venosa central (a través de la vena yugular izquierda), la presión sanguínea arterial y pulso cardíaco (BP y HR; a través de la arteria carótida izquierda), presión del ventrículo izquierdo (LVP; utilizando un catéter Millar [FMI, Mod.:SPC-340S, REF: 800-2019-1, 4F] introducido en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha), presión arterial pulmonar (PAP; utilizando catéter de balón angiográfico ARROW Berman [REF.: AI-07134 4 Fr. 50 cm] colocado en la arteria pulmonar a través de la vena yugular izquierda), gasto cardiaco (CO) e índice de agua pulmonar extravascular (EVWLI) mediante el uso del sistema PiCCO (Pulsion, Alemania) conectada a un catéter Pulsion 4F Thermodilution (PV2014L08 N) colocado en la arteria femoral derecha. Los catéteres para la medición de CVP, BP, HR, LVP, y PAP son adaptados a un sistema de registro Ponemah. El análisis de gas sanguíneo arterial se realiza para determinar el PaO_2/FiO_2. En conformidad con la Conferencia de Consenso Europeo-Norteamericano sobre ARDS un PaO_2/FiO_2 < 300 mmHg se considera indicativo de la presencia de lesión pulmonar aguda. Dependiendo del protocolo aplicado, la duración de los experimentos varió entre 4 y 5 horas después de la administración del estímulo de inducción de lesión pulmonar. Al final del experimento los cerdos son sacrificados por desangrado y el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) se recolecta de los pulmones. El contenido celular del BALF se determina mediante el uso de un contador de células sanguíneas (Cell DYN 3700).

En un medio típico la lesión pulmonar aguda es inducida por instilación intratraqueal de Lipopolisacárido (LPS; *E.coli* 0111:B4; Sigma L2630) en solución salina en una dosis de 5 mg/kg de peso corporal en cada pulmón a través del tubo endotraqueal. PAP y EVWLI se incrementaron mientras que PaO_2/FiO_2 disminuyó por debajo de 300 mmHg en repuesta al estímulo. El contenido celular de BALF se incrementó en forma significativa. La administración del compuesto 1 de la presente invención en forma de bolo intravenoso 15 minutos antes del estímulo con LPS mejoró o

previno los cambios inducidos por LPS.

En otro protocolo el ácido oleico (OA; Sigma-Aldrich, O1008) diluido con etanol (1:1) es infundido por vía intravenosa durante 15 minutos en una dosis final de 100 mg/kg de peso corporal. El estímulo con OA llevó a un incremento de PAP y EVLWI y reducción de PaO_2/FiO_2 por debajo de 300 mmHg. Los cambios son mejorados o prevenidos mediante la administración del compuesto 1 de esta invención 15 minutos ante del comienzo de la infusión de OA.

Se descubrió que las dosis del ejemplo 1 ≤ 30 µg/kg de peso corporal (según lo referido como componente peptídico) están activas en los sistemas de ensayo descritos.

C. Realizaciones de composiciones farmacéuticas citadas a modo de ejemplo

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden convertirse en preparaciones farmacéuticas en las siguientes formas:

Solución i.v.:

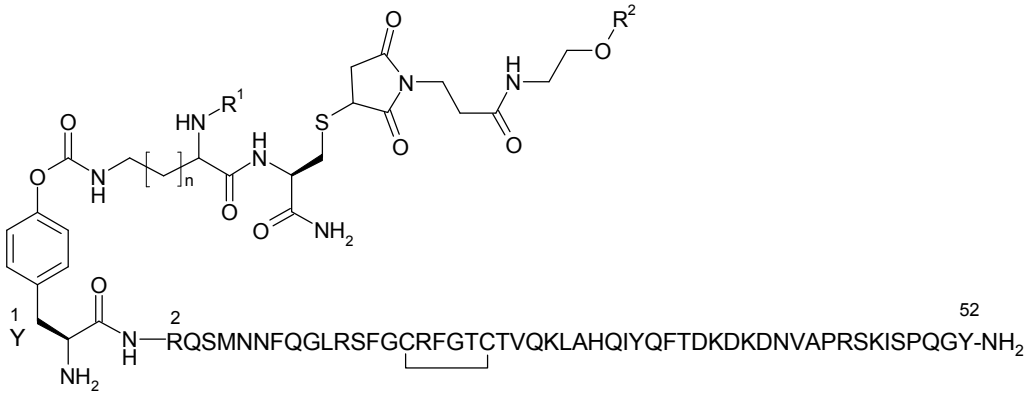
Un compuesto de acuerdo con la invención es disuelto hasta una concentración inferior a la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente adecuado (por ejemplo tampones de un valor de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro de sodio, solución de glucosa al 5 % y/o solución de PEG 400 al 30 %). La solución es esterilizada por filtración y envasada en recipientes estériles y libres de pirógeno para inyección.

Solución s.c.:

Un compuesto de acuerdo con la invención es disuelto hasta una concentración inferior a la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente adecuado (por ejemplo tampones de un valor de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro de sodio, solución de glucosa al 5 % y/o solución de PEG 400 al 30 %). La solución es esterilizada por filtración y envasada en recipientes estériles y libres de pirógeno para inyección.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



(I),

en la que

n representa el número 0, 1, 2 o 3,
R^1 representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo o isopropilo,
R^2 representa PEG 20 kDa a 80 kDa lineal o ramificado con un grupo metoxi de protección terminal,

o una de las sales del mismo, solvatos del mismo o los solvatos de sales del mismo.

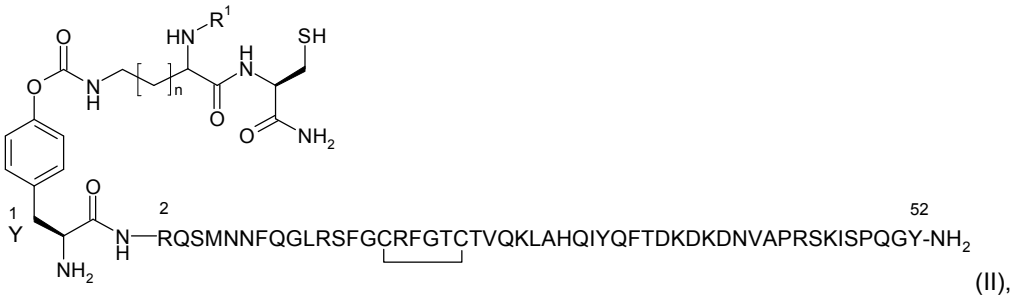
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque**

n representa el número 1 o 2,
R^1 representa hidrógeno o metilo,
R^2 representa PEG 40 kDa lineal con un grupo metoxi de protección terminal.

3. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado porque**

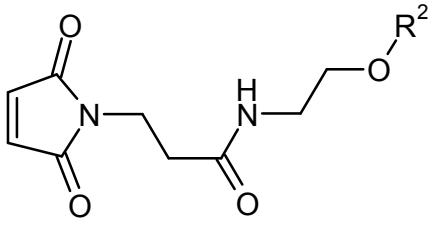
N representa el número 1 o 2,
R^1 representa hidrógeno,
R^2 representa PEG 40 kDa lineal con un grupo metoxi de protección terminal.

4. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) o una de las sales del mismo, solvatos del mismo o los solvatos de sales del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** un compuesto de fórmula (II)



(II),

en la que
n y R^1 son cada uno como se define en la reivindicación 1,
se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (III)



(III),

en la que
R^2 es como se define en la reivindicación 1.

5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades.

6. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades.

7. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

8. Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con un excipiente inerte no tóxico adecuado farmaceúticamente.

9. Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con otro ingrediente activo.

10. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

11. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de fallo cardíaco, enfermedad cardíaca coronaria, apoplejía isquémica y/o hemorrágica, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica oclusiva, pre-eclampsia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y/o crónico, alveolitis alérgica y/o neumonitis debido a la inhalación de polvo orgánico y partículas de origen fúngico, actinomicético u otro origen, y/o bronquitis química aguda, edema pulmonar agudo y/o crónico químico, edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y/o crónicas debido a radiación, trastornos intersticiales de pulmón agudos y/o crónicos, lesión pulmonar aguda/síndrome agudo de distrés respiratorio (ALI/ARDS) en adultos o niños incluyendo los recién nacidos, ALI/ARDS como consecuencia de neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS como consecuencia de aspiración, ALI/ARDS como consecuencia de inhalación de gas tóxico, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda después de cirugías, traumatismos y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por la ventilación (VILI), lesión pulmonar después de aspiración de meconio, fibrosis pulmonar, mal de las alturas, enfermedades renales crónicas, glomerulonefritis, lesión renal aguda, síndrome cardiorrenal, linfedemas, enfermedad intestinal inflamatoria, sepsis, shock séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, shock anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria y/o urticaria.

12. Un compuesto como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

Figura 1

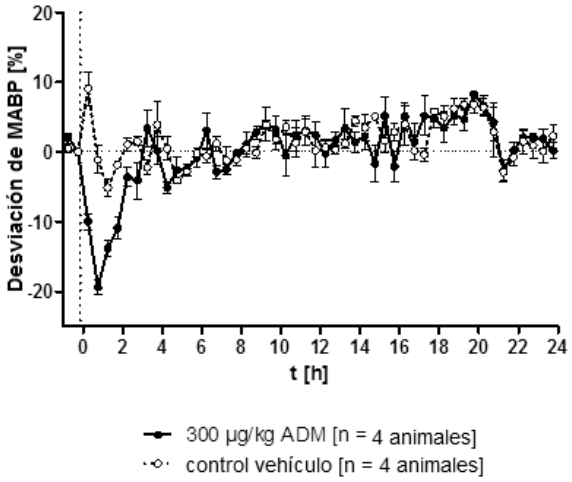
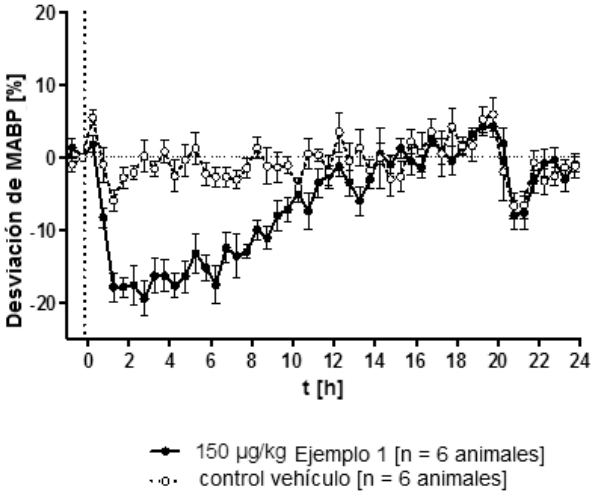



Figura 2