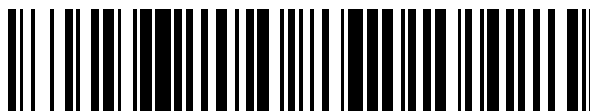


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 039**

51 Int. Cl.:

C07D 417/06 (2006.01)

A61K 38/11 (2006.01)

C07K 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014** **PCT/US2014/048317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15013690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014** **E 14755464 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 3024829**

54 Título: **Agonistas del receptor de vasopresina-2**

30 Prioridad:

26.07.2013 US 201361859024 P

12.03.2014 US 201461952073 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.02.2018

73 Titular/es:

FERRING B.V. (100.0%)

Polaris Avenue 144

2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

WISNIEWSKI, KAZIMIERZ;

SCHTEINGART, CLAUDIO y

RIVIERE, PIERRE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 656 039 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agonistas del receptor de vasopresina-2

Campo

- 5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos con actividad agonista en el receptor de vasopresina-2 (V_2), a composiciones farmacéuticas que comprenden estos, y al uso de los compuestos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

- 10 Existen tres subtipos conocidos de receptores de vasopresina, V_{1a} , V_{1b} y V_2 . El receptor V_{1b} también es conocido como el receptor V_3 y el receptor V_{1a} también como el receptor V_1 . Cada subtipo tiene un patrón de expresión distinto en tejidos, encontrándose V_2 principalmente en el riñón, donde media la actividad antidiurética del ligando endógeno vasopresina (Favory *et al.*, 2009). El V_{1b} está ampliamente distribuido en el cerebro (Hernando *et al.*, 2001). El V_{1a} se encuentra en una variedad de tejidos, incluyendo músculo liso, hígado, riñón, plaquetas, bazo y cerebro (Zingg, 1996; Ostrowski *et al.*, 1994).

- 15 Los agonistas del receptor V_2 son clínicamente útiles. La desmopresina es un agonista del receptor V_2 que está aprobada en algunas regiones para el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria, nicturia, y trastornos de coagulación incluyendo hemofilia A y enfermedad de von Willebrand. La desmopresina se une y activa tanto los receptores V_2 como V_{1b} , con una actividad menor sobre el V_{1a} .

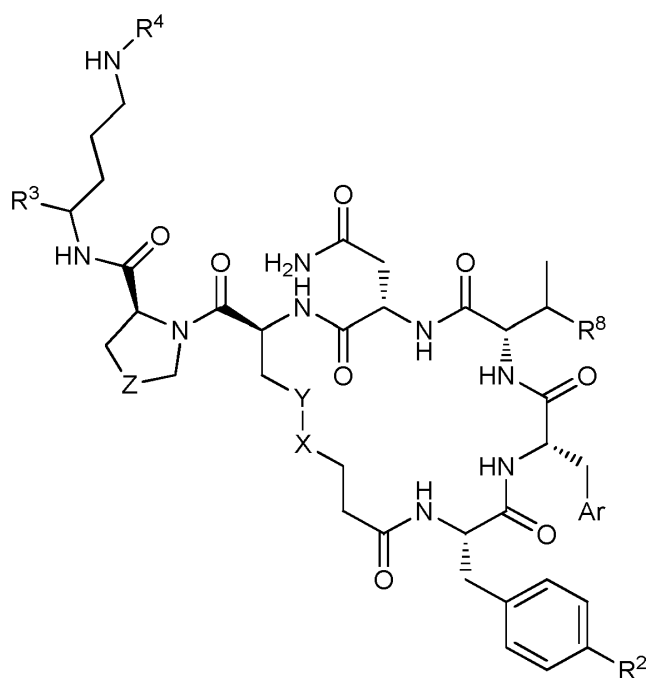
- 20 Se ha demostrado que la desmopresina se excreta parcialmente por los riñones (por ejemplo, Fjellestad-Paulsen *et al.*, 1993), y la semivida de desmopresina está aumentada en pacientes con insuficiencia renal (Ruzicka, *et al.* 2003; Agersoe *et al.* 2004). Agersoe *et al.* sugieren que la semivida aumentada puede dar lugar a efectos antidiuréticos prolongados y aumentar el riesgo de hiponatremia, una bajada en los niveles de sodio en suero que puede dar lugar a acontecimientos adversos tales como convulsiones o coma. Además, establecen que "aunque la desmopresina parece que es segura y bien tolerada por pacientes con una función renal disminuida, se debe tener especial precaución cuando se pretende determinar un régimen posológico eficaz, si es que los
- 25 pacientes con una función renal grave o moderadamente disminuida se van a tratar con desmopresina".

J. Med. Chem., vol. 30, 1987, páginas 2245-2252 divulga análogos de vasopresina "desglicinados".

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar agonistas del receptor V_2 adicionales con actividad reducida en el receptor V_{1b} . Adicionalmente, también pueden ser deseables agonistas del receptor V_2 que no dependan tan acusadamente de los riñones para su eliminación.

30 **Sumario**

En un modo de realización, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



(I)

en la que R^2 es H, alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 ;

R^3 es H o $-CH_2-OH$ o $-C(O)-NR^5R^6$;

R^4 es H o $-C(=NH)-NH_2$;

- 5 R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo C_1-C_6 , $-CH_2$ -ciclopropilo, -ciclopropilo o arilalquilo con la condición de que R^5 y R^6 no son ambos H;

X e Y son independientemente $-CH_2-$ o $-S-$ con la condición de que si X es $-CH_2-$, Y no es $-CH_2-$;

Z es $-CHR^7-$ o S y R^7 es H o alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 ;

R^8 es H o $-CH_3$; y

- 10 Ar es heteroarilo o fenilo opcionalmente sustituido con un alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 .

En algunos modos de realización, R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo C_1-C_6 o arilalquilo.

En algunos modos de realización, R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo C_1-C_6 o arilalquilo.

En algunos modos de realización, R^5 y R^6 no son ambos H.

- 15 En algunos modos de realización, solo uno de X e Y es $-S-$. En algunos modos de realización, X es $-CH_2-$. En algunos modos de realización, X e Y son ambos $-S-$.

En algunos modos de realización, Ar es tiofeno.

En algunos modos de realización, R^8 es $-CH_3$.

En algunos modos de realización, R^3 es $-C(O)-NR^5R^6$. En determinados de estos modos de realización, R^5 es H y R^6 es alquilo C_1-C_4 . En determinados de estos modos de realización, tanto R^5 como R^6 son $-CH_2CH_3$.

- 20 En algunos modos de realización, R^2 es un halógeno. En determinados de estos modos de realización, R^2 es $-Cl$. En determinados de estos modos de realización, R^2 es $-F$.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria o nicturia, junto con el uso de los compuestos descritos en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar diabetes insípida, enuresis nocturna primaria o nicturia.

25

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto de fórmula I se usa en un medicamento para su uso en el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria o nicturia.

Descripción detallada

A menos que se establezca de otro modo, los siguientes términos usados en esta solicitud, incluyendo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones dadas a continuación. Cabe destacar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular “un”, “una” y “el/la” inducen referentes al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. La definición de términos químicos estándar se puede encontrar en trabajos de referencia, incluyendo Carey y Sundberg (2007) *Advanced Organic Chemistry* 5ª ed. vols. A y B, Plenum Press, Nueva York. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química orgánica de síntesis, espectroscopía de masas, procedimientos preparativos y analíticos de cromatografía, química de proteínas, bioquímica y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica.

“Alquilo” es un alquilo C₁₋₁₂ de cadena lineal o ramificada. El alquilo ramificado incluye las configuraciones *iso*-, *sec*- y *terc*-.

“Ariilo” es un sistema de anillo carbocíclico aromático mono- o bicíclico de 5-12 átomos de carbono opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-C4}, halógeno, -OH u -O-alquilo C_{1-C4}. Los sistemas de anillos carbocíclicos aromáticos mono- o bicíclicos a modo de ejemplo incluyen fenilo opcionalmente sustituido y naftilo opcionalmente sustituido.

“Ariilalquilo” es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo ariilo o heteroarilo.

“Heteroarilo” es un sistema de anillo de cinco o seis miembros heterocíclico aromático opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-C4}, halógeno, -OH u -O-alquilo C_{1-C4}. Un sistema de anillo heteroaromático de cinco miembros es un sistema de anillo aromático monocíclico que tiene cinco átomos de anillo, en el que 1, 2, 3 o 4 átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Los sistemas de anillos heteroaromáticos de cinco miembros a modo de ejemplo incluyen imidazolilo, tiazolilo, tienilo, furilo, pirazolilo y triazolilo opcionalmente sustituidos. Un sistema de anillo heteroaromático de seis miembros es un sistema de anillo aromático monocíclico que tiene seis átomos de anillo, en el que 1, 2, 3 o 4 átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O y S. Los sistemas de anillos heteroaromáticos de seis miembros a modo de ejemplo incluyen piridilo, pirimidilo y pirazinilo opcionalmente sustituidos.

Un modo de realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende compuestos de la invención. En un primer modo de realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Dichos excipientes son conocidos por los expertos en la técnica. Los compuestos de la presente invención incluyen, sin limitación, compuestos básicos tales como bases libres. Está disponible un análisis completo de excipientes y sales farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido, por ejemplo, una sal formada por la reacción con ácidos halohídricos, tales como ácido clorhídrico y ácidos minerales, tales como ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico, así como ácidos sulfónicos o carboxílicos alifáticos, alicíclicos, aromáticos o heterocíclicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido embónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido halobencenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico, (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 66:1 19, 1977 y Wemuth, C.G. y P.H. Stahl, eds. *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*. Zürich: *Verlag Helvetica Chimica Acta*, 2002).

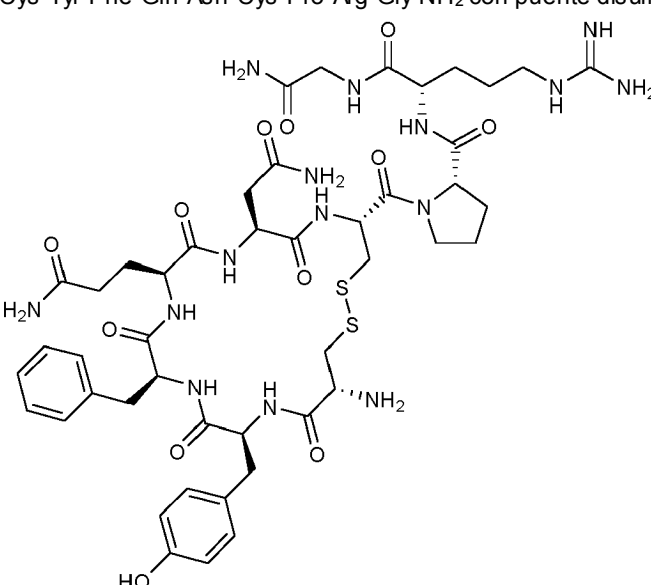
Dependiendo del modo de administración intencionado, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, pastillas, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, pomadas, lociones o similares, preferentemente en una forma de dosificación unitaria adecuada para la administración única de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes, adyuvantes, diluyentes, tampones farmacéuticos, etc.

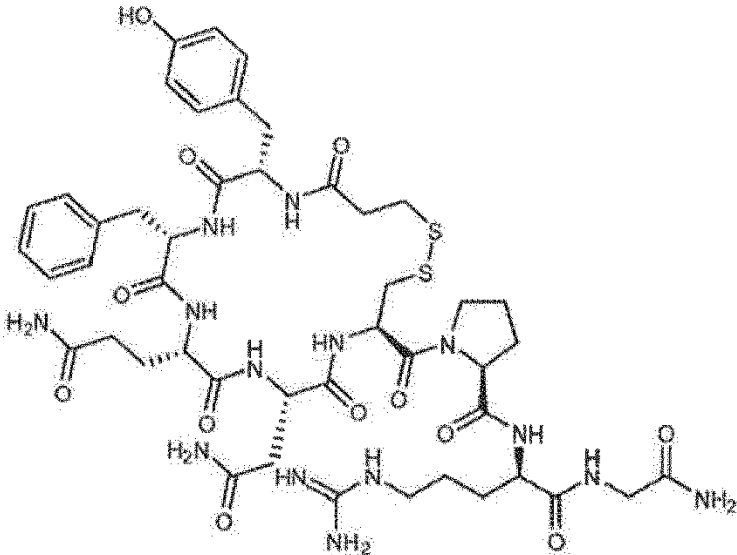
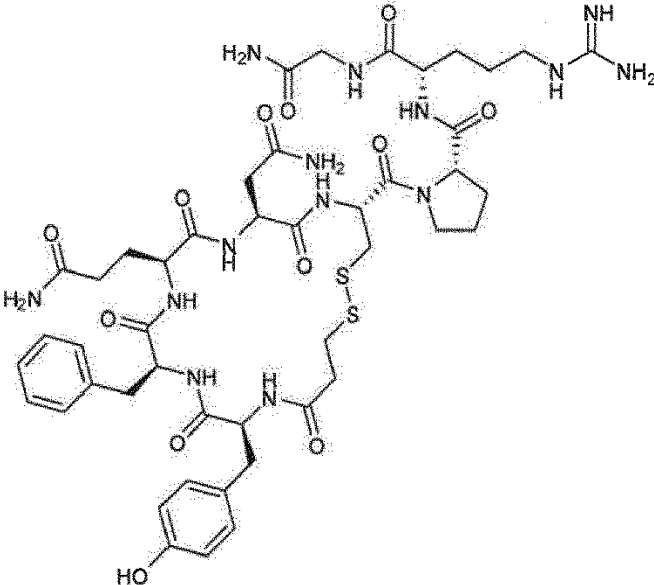
La invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención incluyendo isómeros, mezclas racémicas o no racémicas de isómeros, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

Para composiciones sólidas, los vehículos sólidos atóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

- 5 Para administración oral, la composición adoptará generalmente la forma de un comprimido, cápsula, una cápsula de gel blanda, solución, suspensión o jarabe no acuosos. Los comprimidos y cápsulas son formas de administración oral preferentes. En algunos modos de realización, el comprimido es una oblea, por ejemplo, una oblea de disolución rápida. En algunos modos de realización, la oblea se administra mediante una vía de administración sublingual. Los comprimidos y cápsulas para uso oral incluirán generalmente uno o más vehículos usados habitualmente tales como lactosa y almidón de maíz. Típicamente, también se añaden agentes
- 10 lubricantes, tales como estearato de magnesio. Cuando se usan suspensiones líquidas, el agente activo se puede combinar con agentes de emulsión y suspensión. Si se desea, se pueden añadir igualmente agentes saborizantes, colorantes y/o edulcorantes. Otros componentes opcionales para la incorporación en una formulación oral en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y similares.
- 15 Las dosificaciones para el tratamiento dependerán de las tasas de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los componentes del tratamiento de combinación, así como otros factores conocidos para un experto en la técnica. Los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Adicionalmente se debe entender que, para cualquier sujeto particular, se pueden ajustar los regímenes y pautas posológicas específicos a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio
- 20 profesional de la persona que administra o supervisa la administración del tratamiento. En algunos modos de realización, una dosis intravenosa es de aproximadamente 100 ng. En algunos modos de realización, una dosis oral es de desde 1 µg hasta 1 mg. En algunos modos de realización, una dosis nasal es de desde 3 mg hasta 6 mg.

Las abreviaturas usadas son:

Abreviatura	Definición
Ac	Acetil
AcOH	Ácido acético
AVP	Arginina vasopresina Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂ con puente disulfuro entre Cys 
BTA	<i>N</i> , <i>O</i> -Bis(trimetilsilil)acetamida
Bu	butilo - los residuos alquilo se pueden denominar adicionalmente como n (normal, es decir, sin ramificar), i (iso), s (sec) y t (terciario)
BzI	Bencilo
CH ₃ CN	Acetonitrilo
DCE	1,2-dicloroetano

Abreviatura	Definición
DCM	Diclorometano
dDAVP	Desmopresina, [1-desamino, 8-D-arginina]-vasopresina 
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
dVP	1-desamino-vasopresina 
Et	Etilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
HBTU	Hexafluorofosfato de O-benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-uronio
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOBt	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol

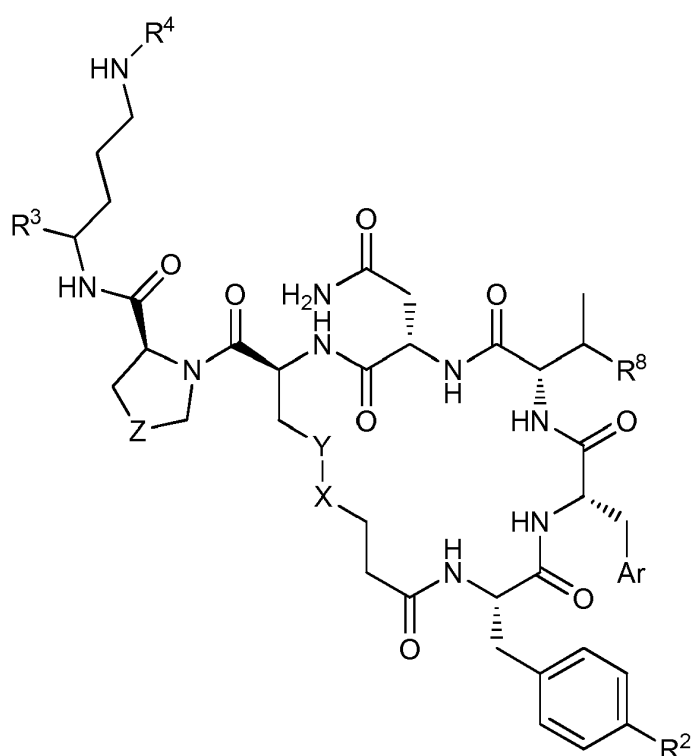
Abreviatura	Definición
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -butilo
cPr	ciclopropilo
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -propilo
CL	cromatografía de líquidos
Me	metilo
MeOH	metanol
EM	espectrometría de masas
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -butilo
<i>t</i> BuOH	alcohol <i>terc</i> -butilico
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
TMOF	Ortoformiato de trimetilo, trimetoximetano
Trt	trítalo [trifenilmetilo, (C ₆ H ₅) ₃ C-]

A menos que se especifique lo contrario, se usaron L-aminoácidos y se usa terminología de aminoácidos convencionales. Los ejemplos de aminoácidos distintos de los veinte aminoácidos convencionales incluyen:

Abreviatura	Nombre convencional
Thi	β-(2-tienil)alanina
Cpa	β-(4-clorofenil)alanina
Fpa	β-(4-fluorofenil)alanina
Hyp	4-hidroxiprolina
Thz	ácido 1,3-tiazolidin-4-carboxílico, tioprolina
Abu	ácido 2-aminobutírico
Agm	agmatina, (4-aminobutil)guanidina
Phe(4-Me)	β-(4-metilfenil)alanina
Phe(4-Et)	β-(4-etilfenil)alanina

Compuestos

Los compuestos de la invención tienen una estructura de fórmula I:



mismos, en la que:

R² es H, alquilo C₁-C₄, halógeno, -OH u -O-alquilo C₁-C₄;

R³ es H o -CH₂-OH o -C(O)-NR⁵R⁶;

5 R⁴ es H o -C(=NH)-NH₂;

R⁵ y R⁶ son independientemente H, alquilo C₁-C₆, -CH₂-ciclopropilo, -ciclopropilo o arilalquilo con la condición de que R⁵ y R⁶ no son ambos H;

X e Y son independientemente -CH₂- o S con la condición de que si X es -CH₂-, Y no es -CH₂-;

Z es -CHR⁷- o S y R⁷ es H o alquilo C₁-C₄, halógeno, -OH u -O-alquilo C₁-C₄;

10 R⁸ es H o -CH₃;

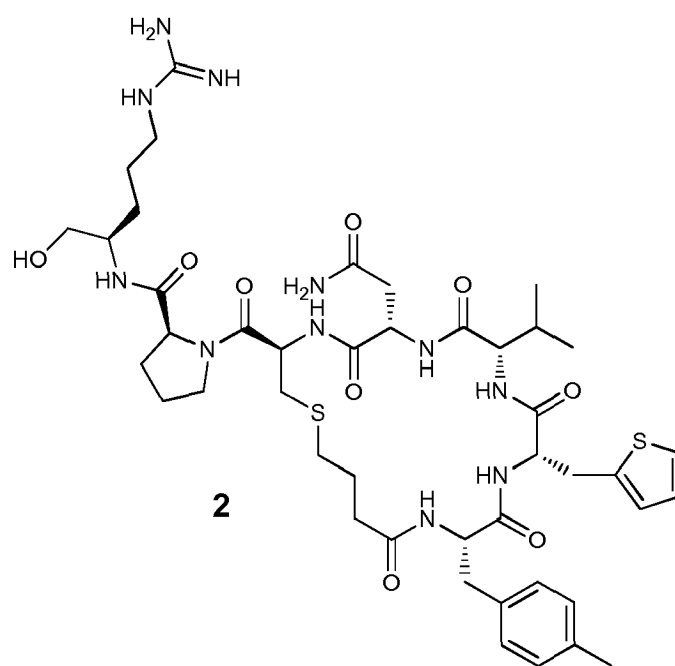
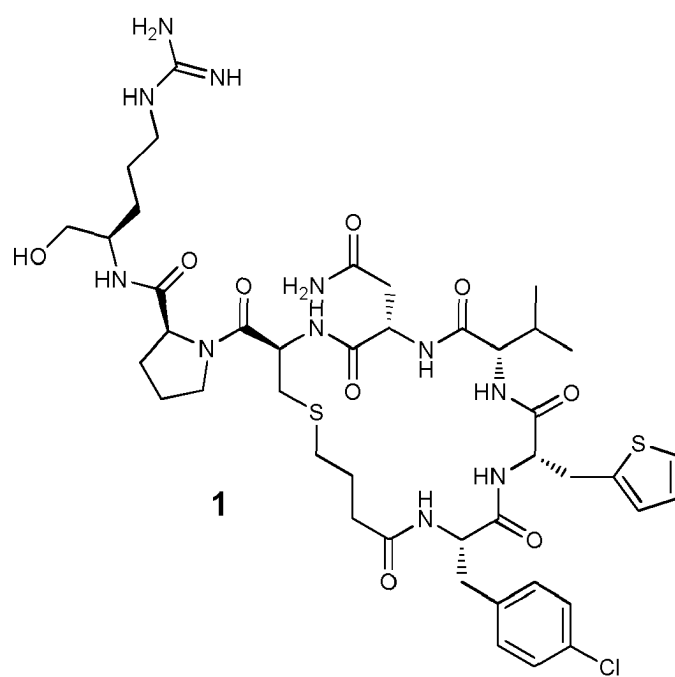
Ar es heteroarilo o fenilo opcionalmente sustituido con un alquilo C₁-C₄, halógeno, -OH u -O-alquilo C₁-C₄.

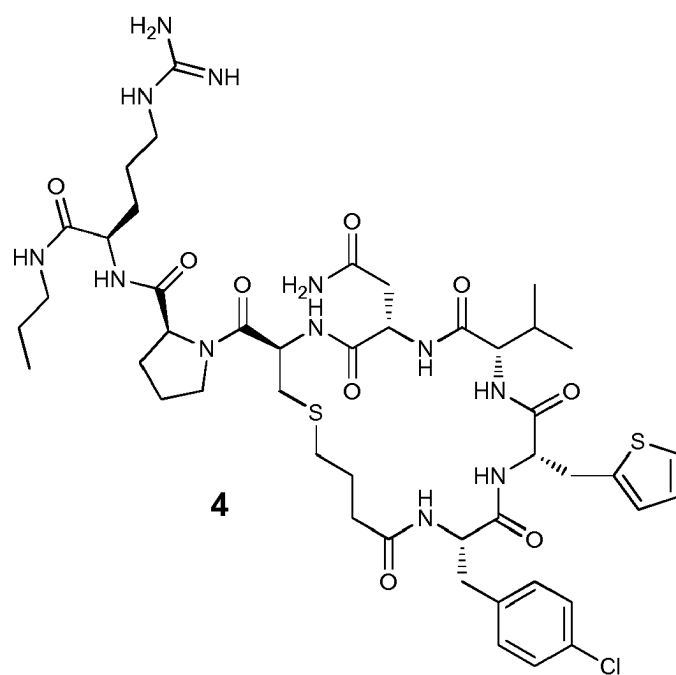
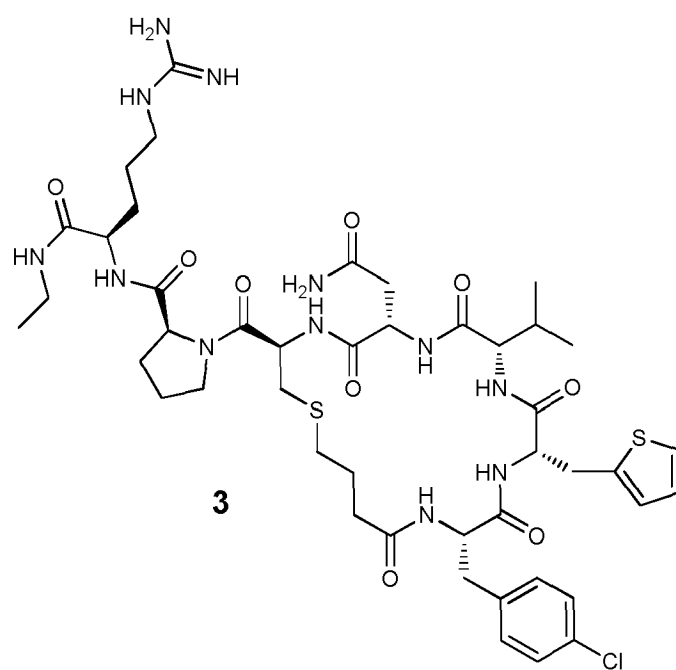
Tabla 1. Compuestos de ejemplo de la invención.

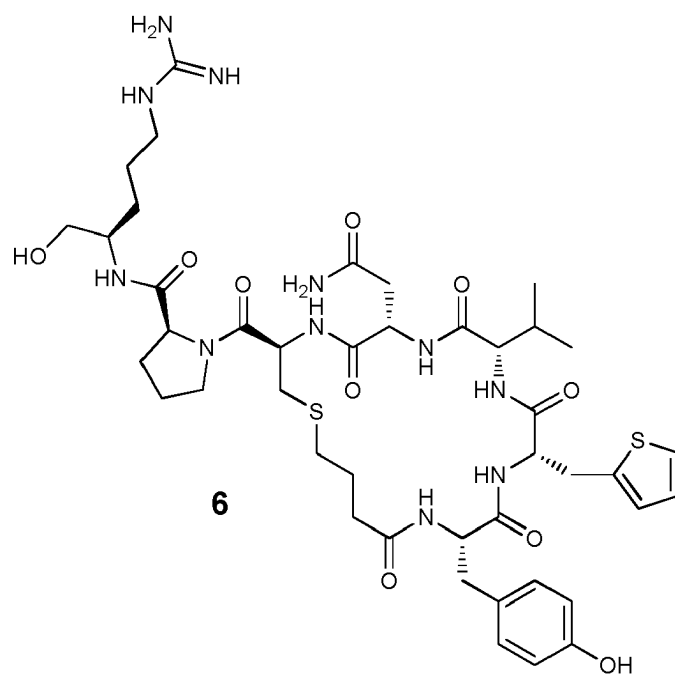
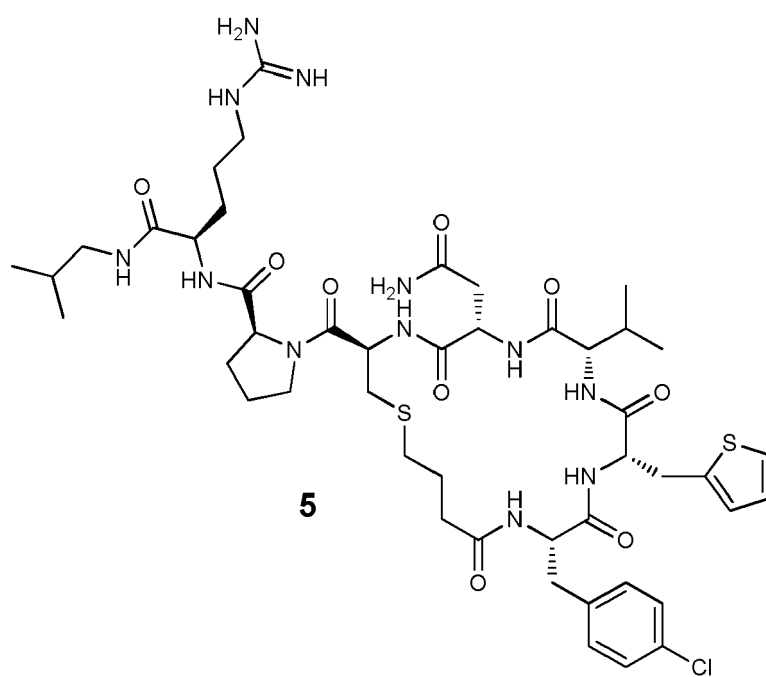
SEQ ID	R ²	R ³ y configuración	R ⁴	Ar	X	Y	Z
1	Cl	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
2	Me	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
3	Cl	C(=O)-NH ₂ Et (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
4	Cl	C(=O)-NH ₂ Pr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
5	Cl	C(=O)-NH ₂ iBu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
6	OH	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
7	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	4-fluorofenilo	CH ₂	S	CH ₂
8	OH	H	C(=NH)-NH ₂	4-fluorofenilo	CH ₂	S	CH ₂
9	OH	H	H	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂

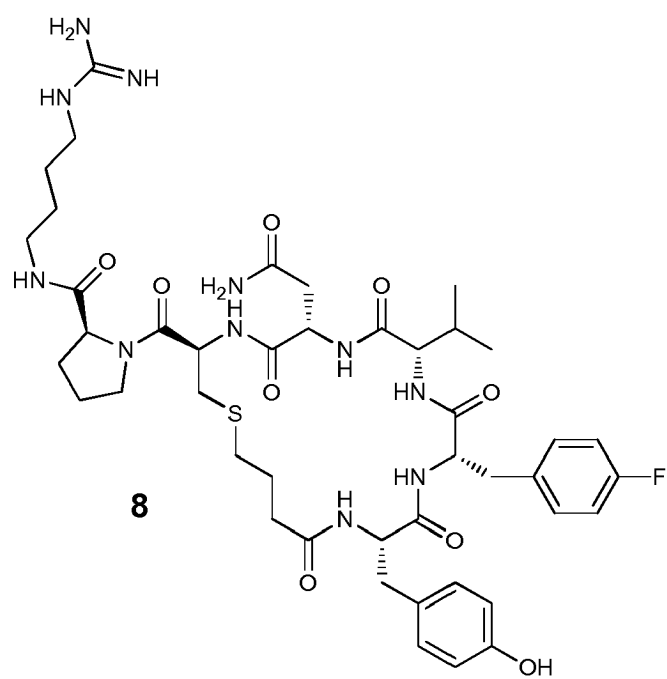
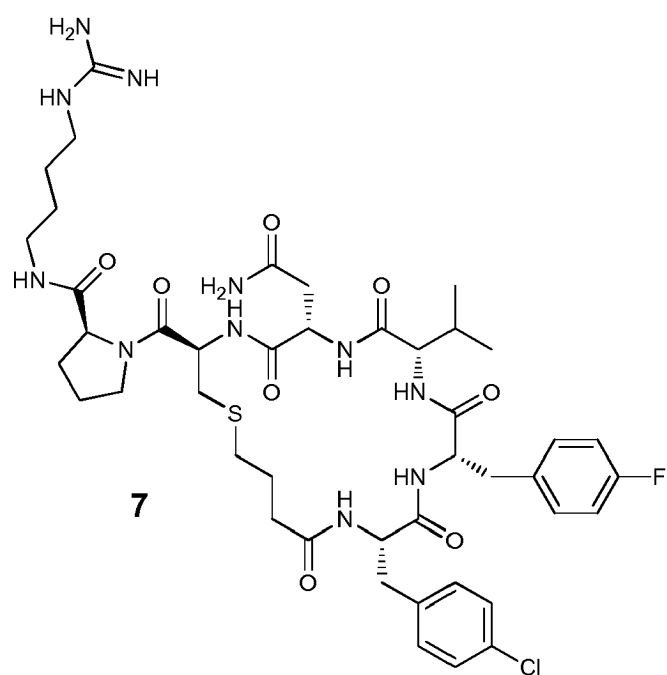
SEQ ID	R ²	R ³ y configuración	R ⁴	Ar	X	Y	Z
10	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
11	Cl	C(=O)-NHcPr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
12	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ -cPr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
13	Cl	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
14	Cl	C(=O)-NHBu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
15	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Pr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
16	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH(OH)
17	Et	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
18	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	CH ₂
19	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (S)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
20	Cl	C(=O)-NHMe (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
21	Cl	C(=O)-NEt ₂ (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
22	Cl	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
23	OH	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
24	Cl	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	4-fluorofenilo	CH ₂	S	CH ₂
25	Cl	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	CH ₂
26	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	fenilo	S	CH ₂	CH ₂
27	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	CH(OH)
28	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	S	CH ₂
29	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	fenilo	S	S	CH ₂
30	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	CH ₂
31	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	CH(OH)
32	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	fenilo	CH ₂	S	CH(OH)
33	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	S
34	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	S	CH ₂	S
35	Cl	C(=O)-NHPr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	S
36	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ -2-tienilo (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	S
37	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ -2-tienilo (R)	C(=NH)-NH ₂	4-fluorofenilo	CH ₂	S	S
38	OH	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	CH ₂
39	Cl	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	S
40	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	2-tienilo	CH ₂	S	S
41	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	4-fluorofenilo	CH ₂	S	S

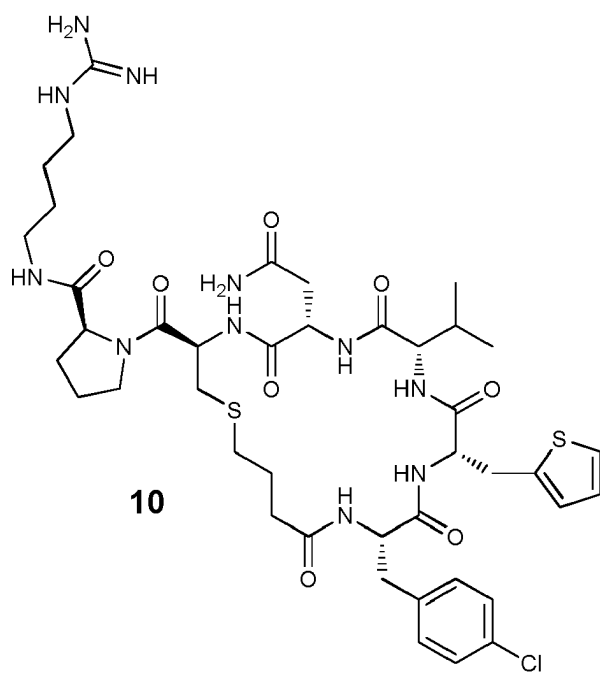
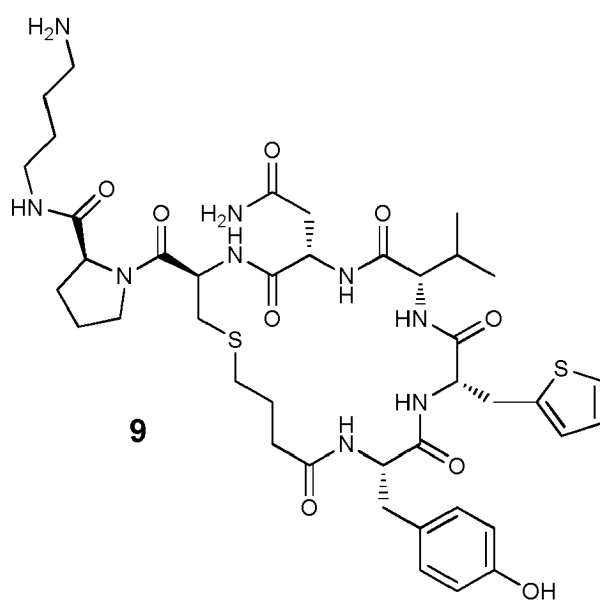
Estructuras de los compuestos 1-41 (SEQ ID 1-41):

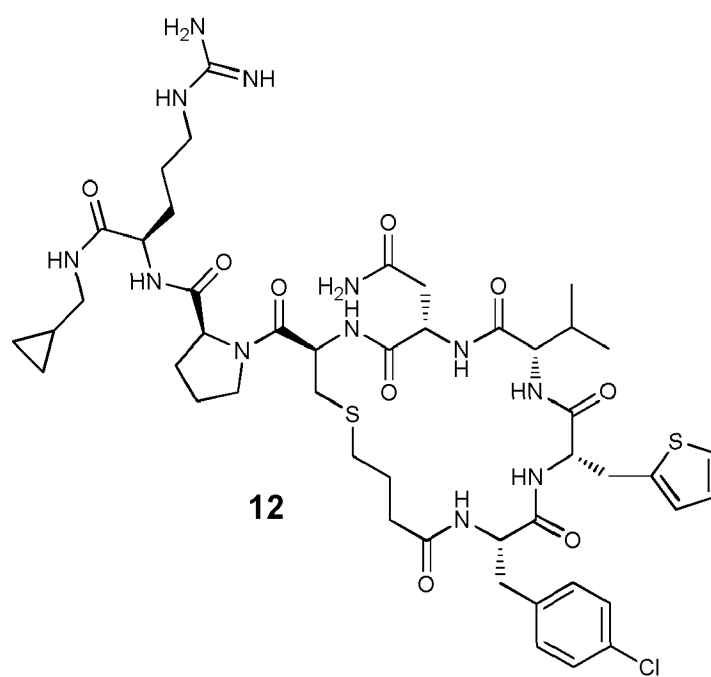
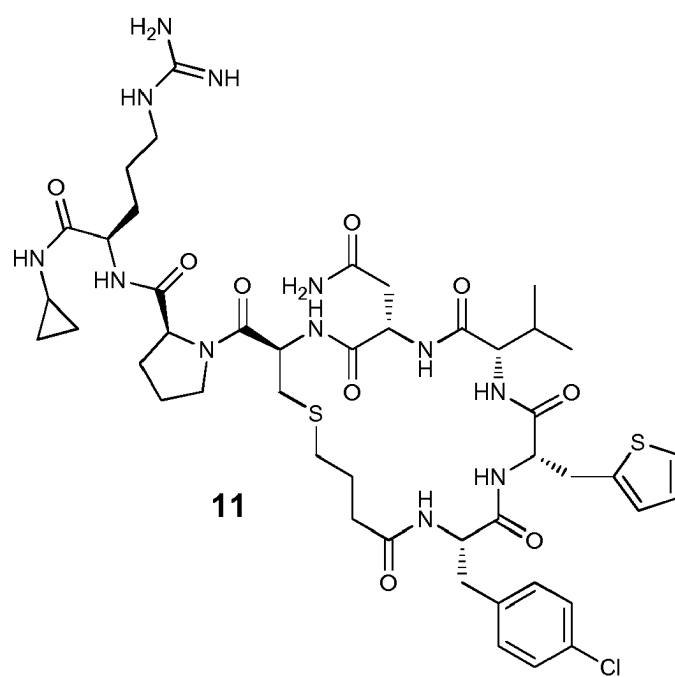


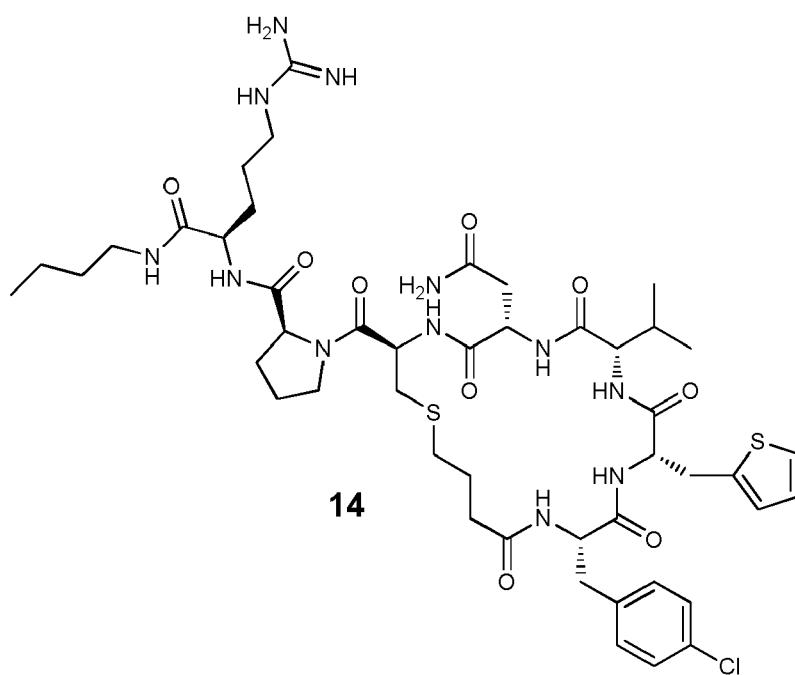
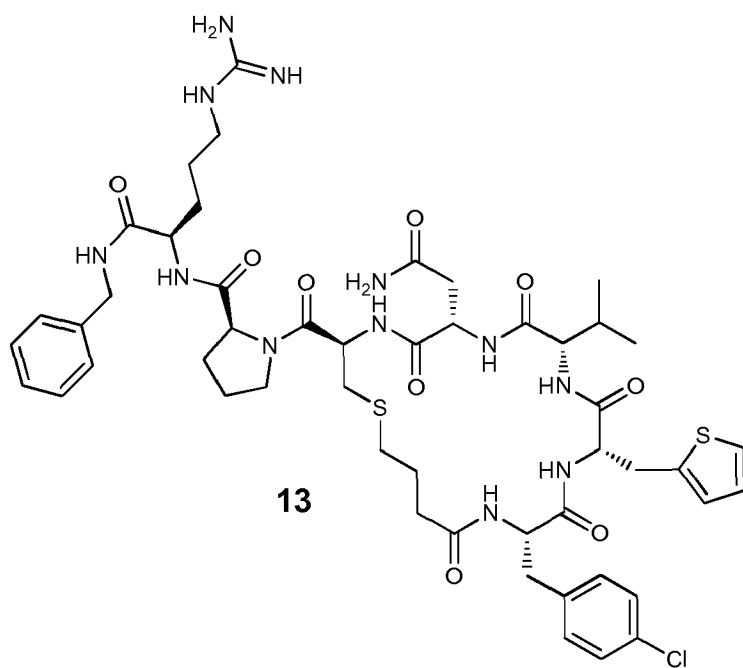


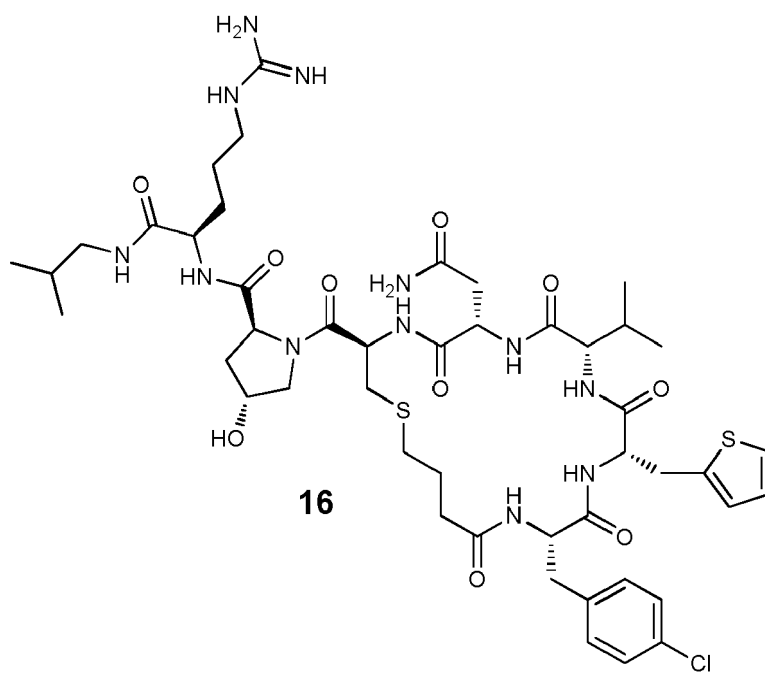
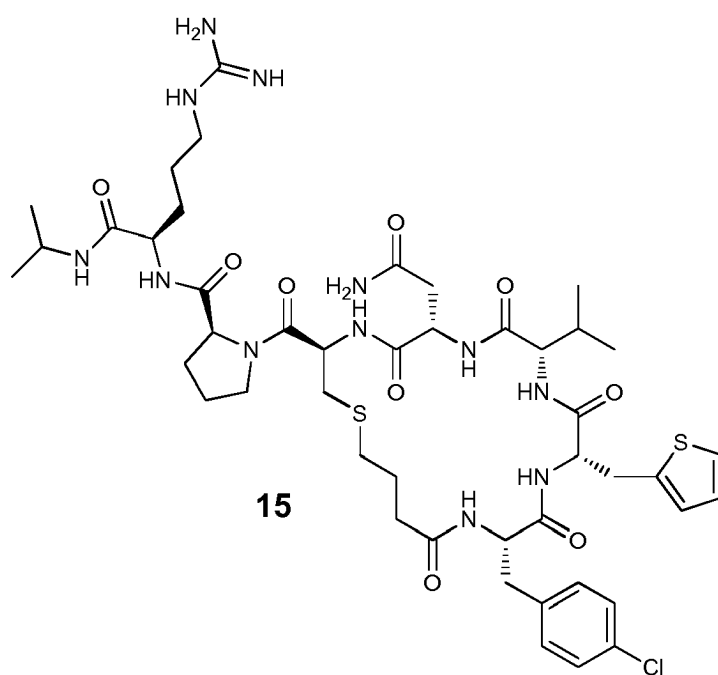


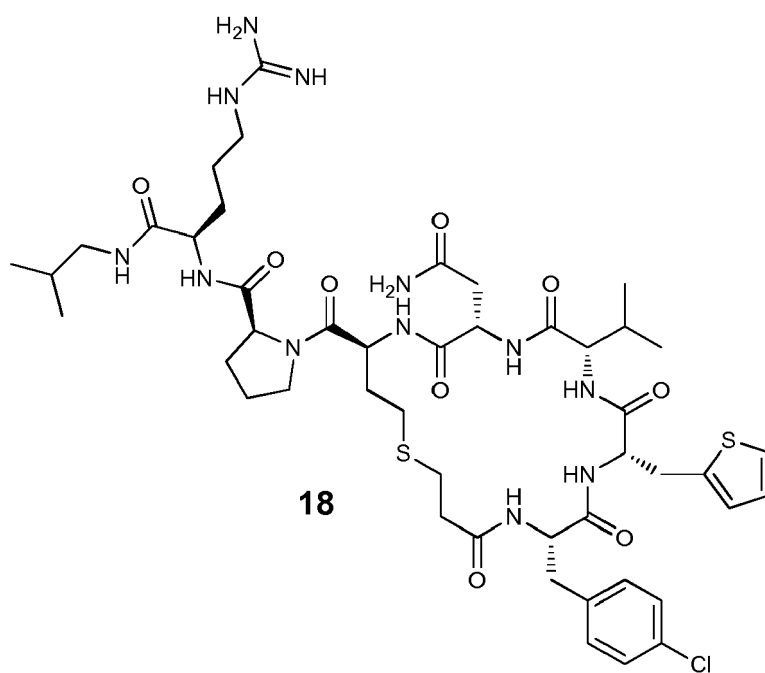
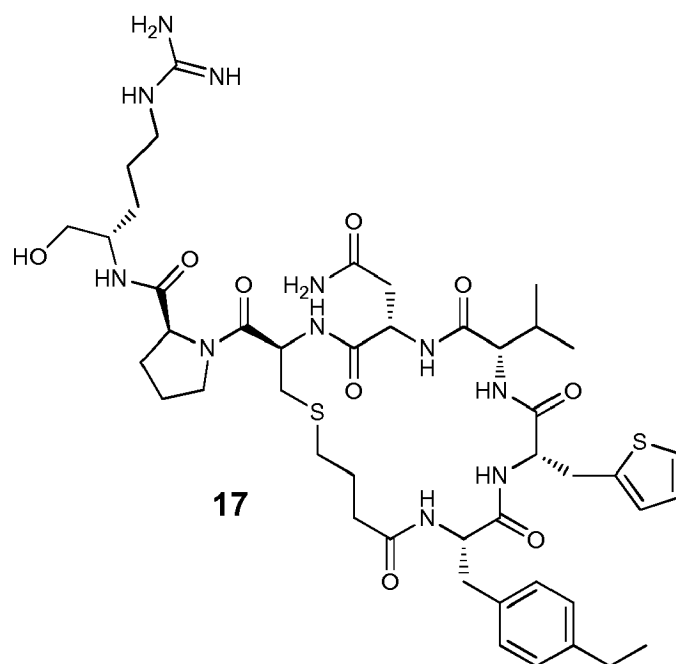


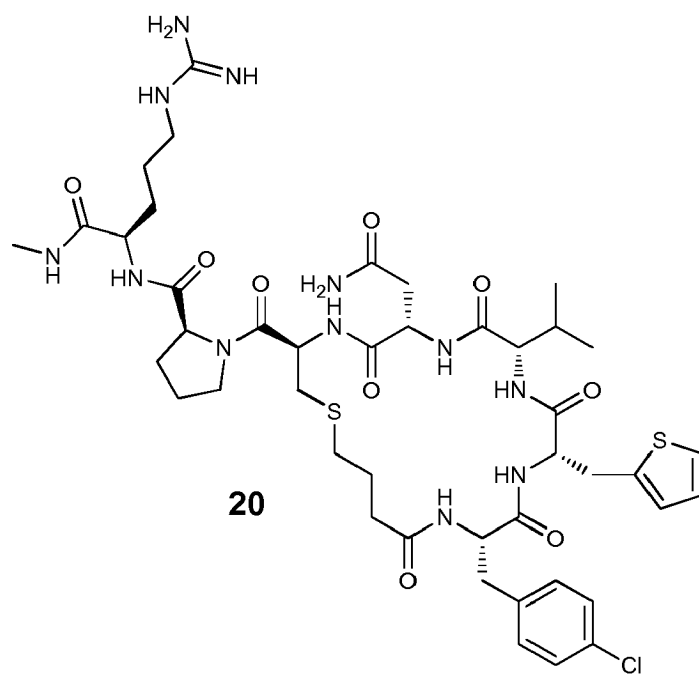
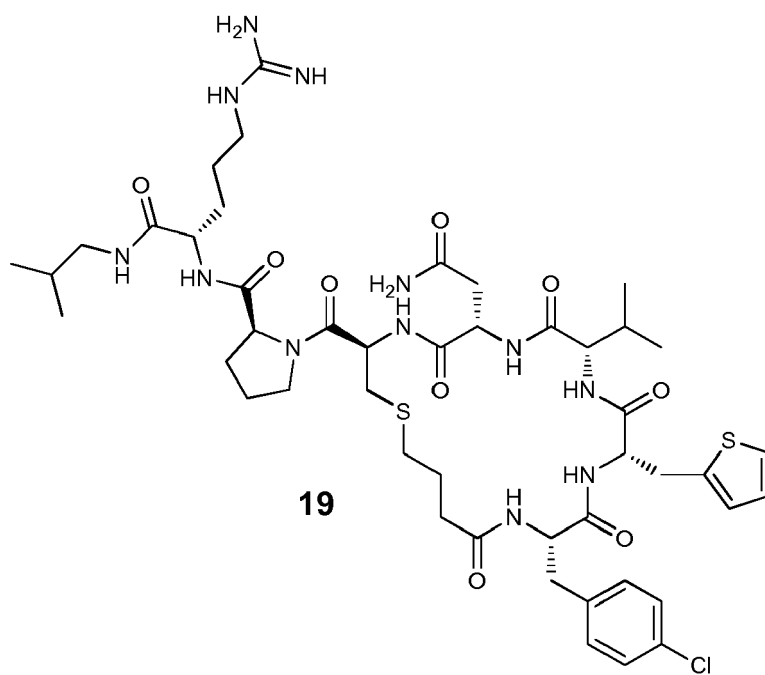




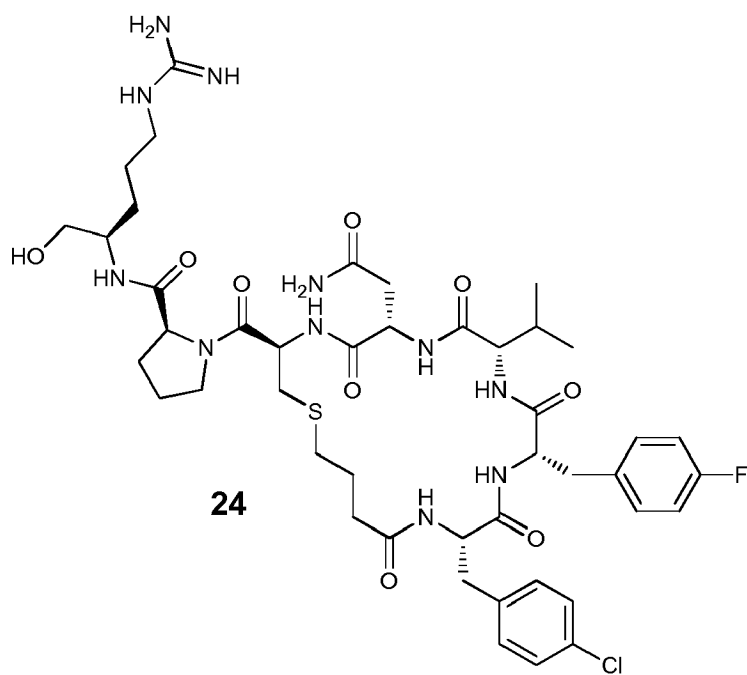
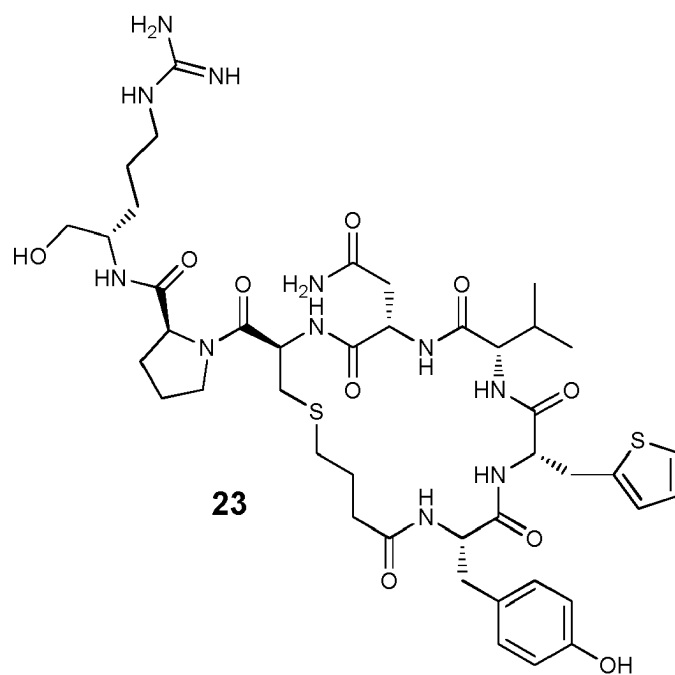


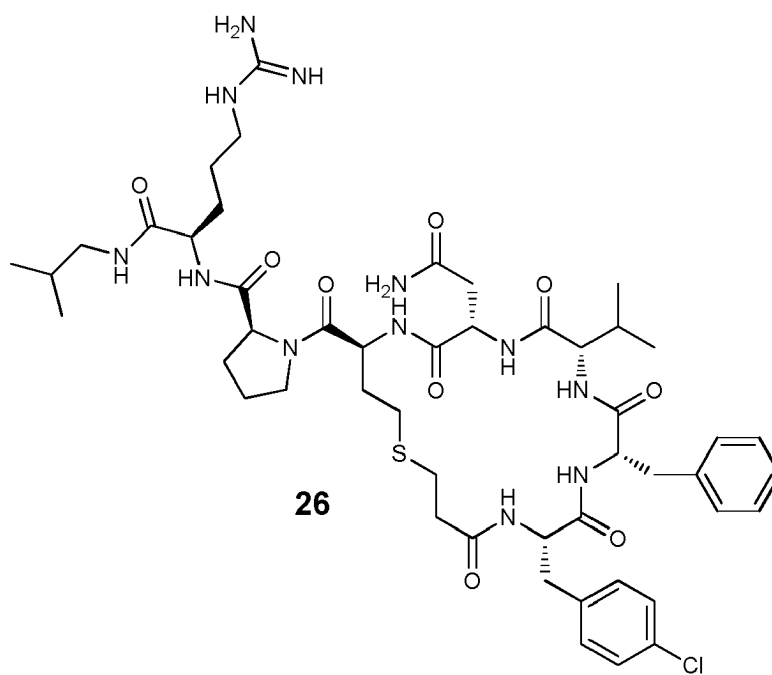
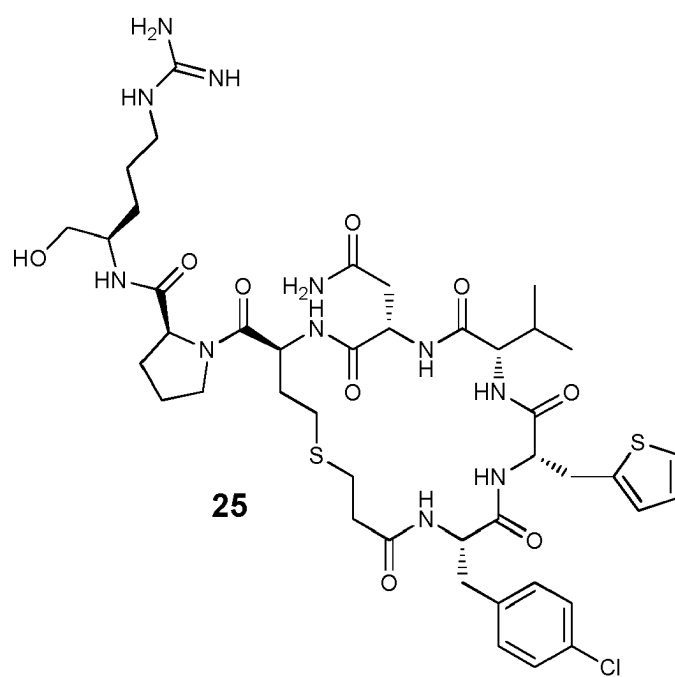




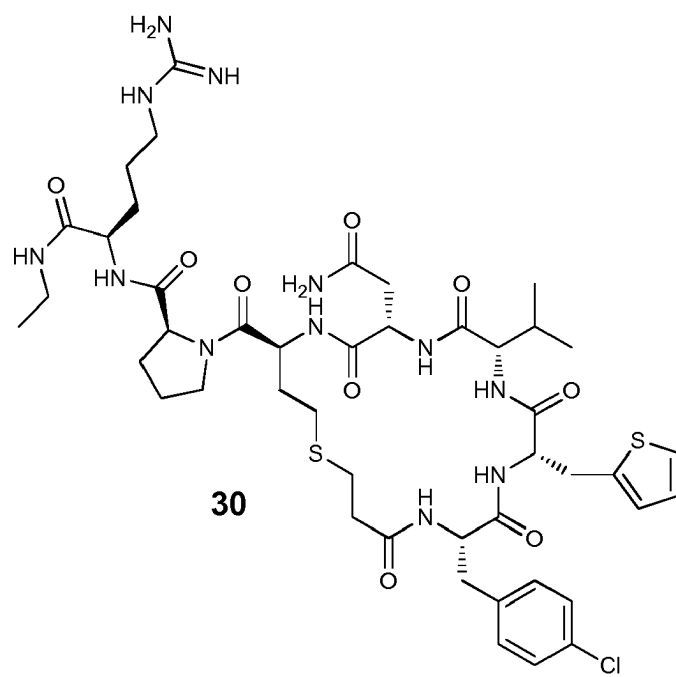
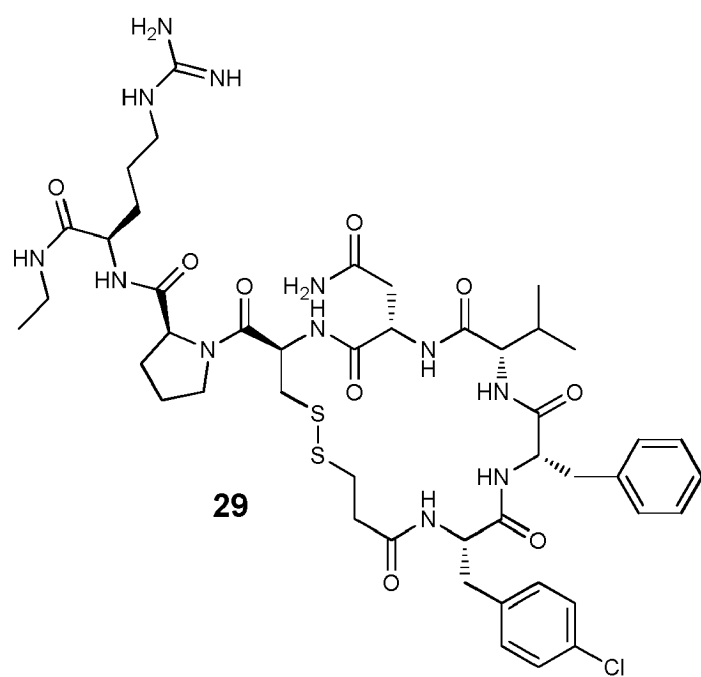


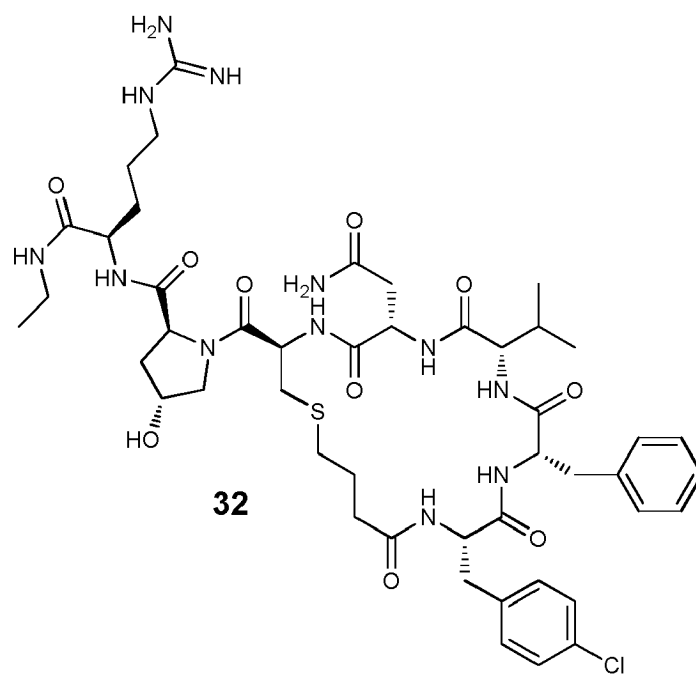
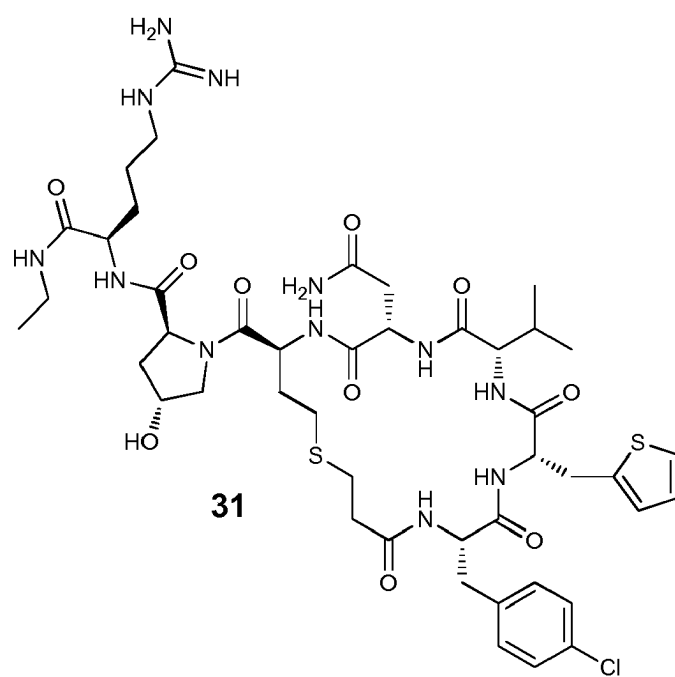




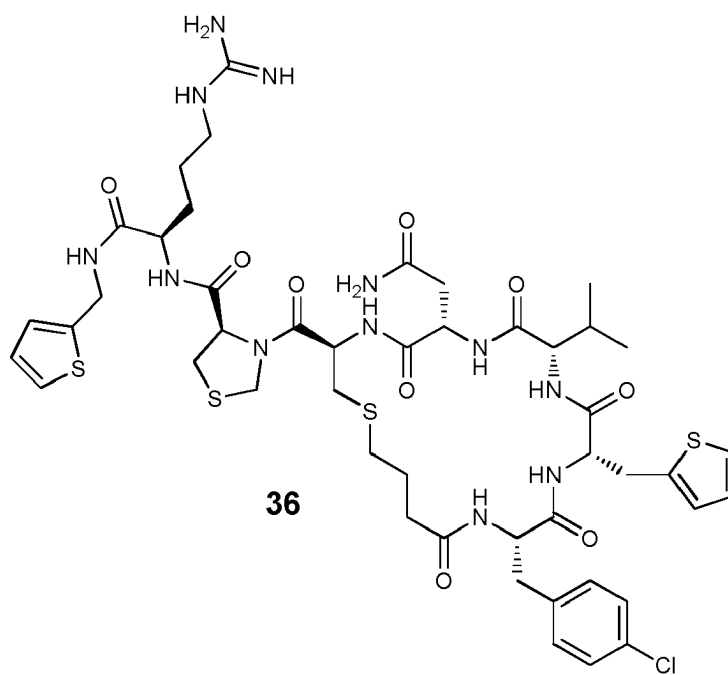
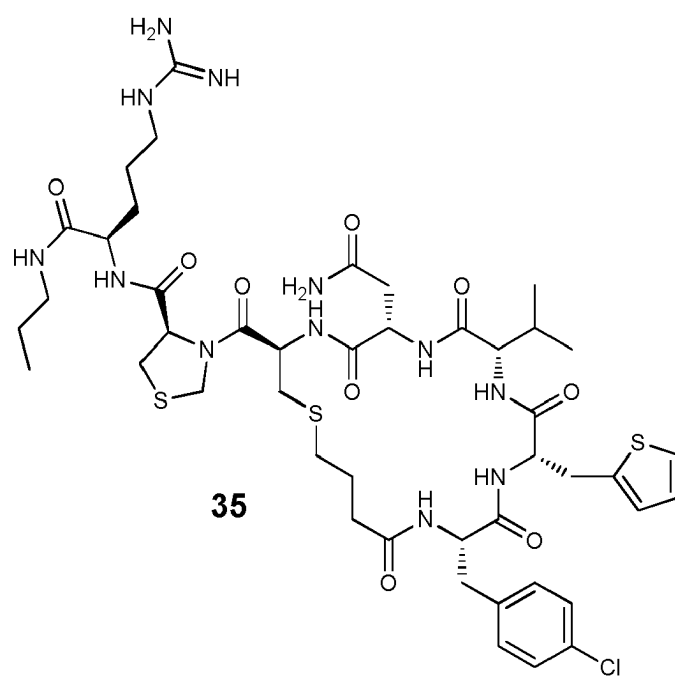




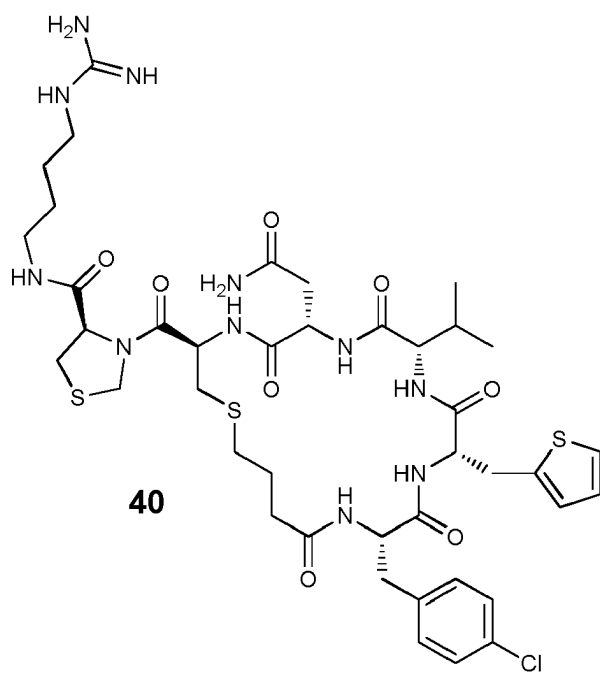
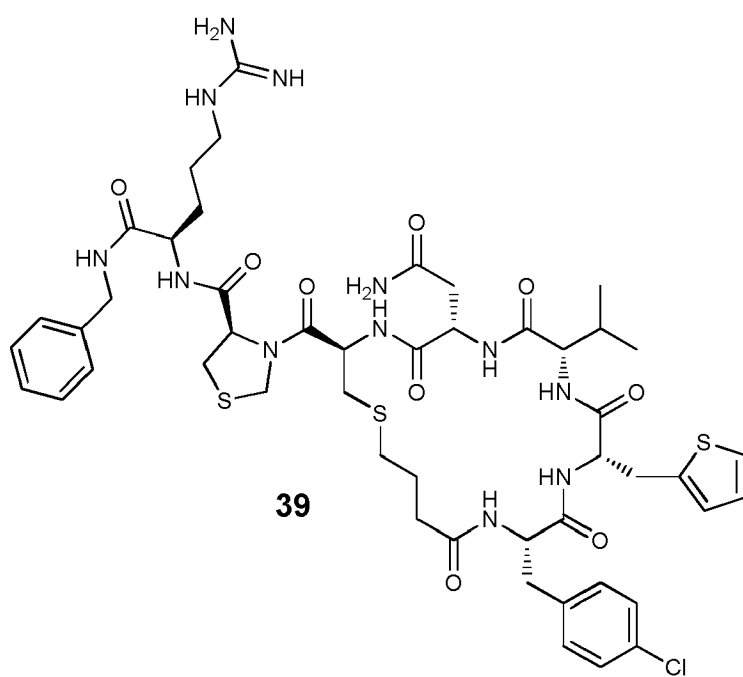












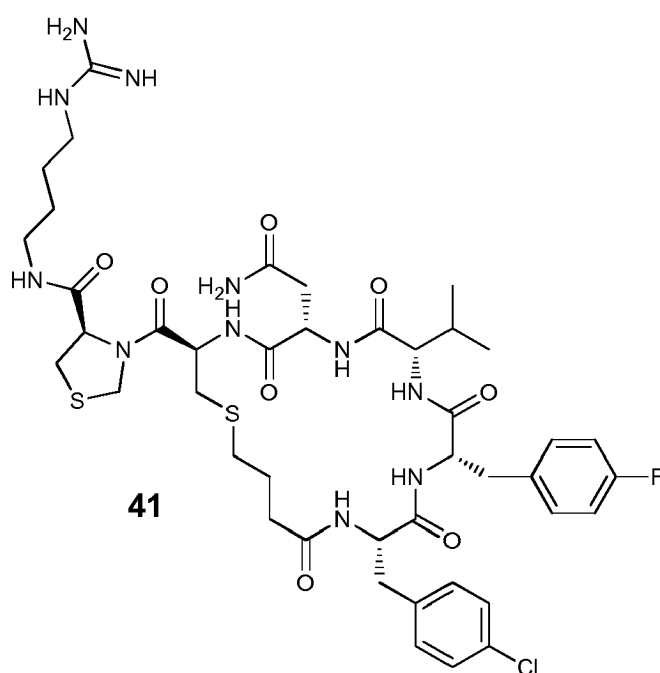


Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de los compuestos 1-41 (SEQ ID 1-41)

SEQ ID	M+H (calculado)	M+H (observado)	Pureza HPLC
1	976,4	976,4	99,3
2	956,5	956,4	98,3
3	1017,4	1017,4	100,0
4	1031,4	1031,5	100,0
5	1045,5	1045,5	100,0
6	958,4	958,5	100,0
7	958,4	958,5	95,8
8	940,5	940,5	99,6
9	886,4	886,4	99,6
10	946,4	946,7	99,1
11	1029,4	1029,4	100,0
12	1043,4	1043,4	100,0
13	1079,4	1079,5	100,0
14	1045,5	1045,8	97,3
15	1031,4	1031,5	100,0
16	1061,5	1061,5	100,0
17	970,5	970,4	100,0
18	1045,5	1045,4	100,0
19	1045,5	1045,5	100,0
20	1003,5	1003,4	100,0
21	1045,5	1045,5	99,2

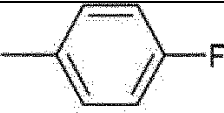
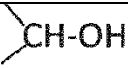
SEQ ID	M+H (calculado)	M+H (observado)	Pureza HPLC
22	976,4	976,5	98,2
23	948,4	958,5	96,6
24	988,4	988,5	99,3
25	976,4	976,5	100,0
26	1039,5	1039,5	100,0
27	1061,5	1061,5	99,8
28	1035,4	1035,4	97,4
29	1029,4	1029,5	99,3
30	1017,4	107,5	99,5
31	1033,4	1033,5	99,2
32	1027,5	1027,5	99,2
33	1035,4	1035,5	100,0
34	1035,4	1035,5	100,0
35	1049,4	1049,7	99,3
36	1103,4	1103,7	100,0
37	1115,4	1115,7	99,2
38	1061,5	1061,7	98,3
39	1097,4	1097,7	96,8
40	964,3	964,6	99,6
41	976,4	976,7	100,0

Tabla 3: Datos de ensayo *in vitro* para los compuestos 1-41

SEQ ID	CE ₅₀ de hV ₂ -R	Eficacia en % de hV ₂ -R	CE ₅₀ de hV _{1b} -R	Eficacia en % de hV _{1b} -R
1	0,10	102	140,91	42
2	0,39	104	806,52	27
3	0,29	92	171,74	62
4	0,33	92	249,07	49
5	0,22	100	213,51	50
6	0,08	93	57,58	56
7	0,31	89	142,28	39
8	0,10	91	175,57	62
9	0,19	94	>10000	60
10	0,07	104	104,64	42
11	0,23	86	480,08	36
12	0,21	90	321,63	43

SEQ ID	CE ₅₀ de hV ₂ -R	Eficacia en % de hV ₂ -R	CE ₅₀ de hV _{1b} -R	Eficacia en % de hV _{1b} -R
13	0,19	100	149,75	37
14	0,26	98	187,54	36
15	0,45	81	576,96	33
16	0,23	87	480,92	26
17	0,35	110	>10000	34
18	0,22	103	>10000	29
19	0,29	98	>10000	19
20	0,27	106	351,12	37
21	0,25	102	535,72	21
22	0,14	96	382,84	44
23	0,10	92	518,47	53
24	0,35	102	223,19	45
25	0,08	115	64,30	38
26	0,27	101	45,79	33
27	0,20	100	132,93	24
28	0,32	103	>10000	20
29	0,38	103	>10000	16
30	0,19	114	123,00	33
31	0,10	92	258,02	25
32	0,29	98	150,43	21
33	0,10	103	159,76	32
34	0,11	93	40,21	34
35	0,21	111	122,05	43
36	0,17	108	95,56	53
37	0,30	102	100,61	46
38	0,26	111	150,12	48
39	0,31	111	328,73	72
40	0,12	106	140,67	50
41	0,22	108	114,44	42
42 (dDAVP)	0,22	100	6,59	100
43 ([Val4]dDAVP)	0,05	89	24,13	98
44 (AVP)	0,04		5,4	

Tabla 4: Leyenda para la nomenclatura de aminoácidos.

Aminoácido	Posición	Nomenclatura reivindicada
Cpa	2	$R^2 = \text{Cl}$
Fpa	2	$R^2 = \text{F}$
Phe(4-Me)	2	$R^2 = -\text{CH}_3$
Phe(4-Et)	2	$R^2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$
Thi	3	Ar = 
Fpa	3	Ar = 
Val	4	$R^0 = -\text{CH}_3$
Abu	4	$R^0 = -\text{H}$
Hyp	7	Z = 
Thz	7	Z = S
Agm	8	$R^3 = \text{H}$ y $R^* = -\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$

Ejemplos

Síntesis general

5 Se adquirieron los derivados de aminoácido de proveedores comerciales (Aapptec, EMD Millipore y Peptides International). Se adquirieron las resinas de proveedores comerciales (PCAS BioMatrix Inc. y EMD Millipore). Se adquirieron todos los reactivos, productos químicos y disolventes adicionales de Sigma-Aldrich y VWR.

10 Se sintetizaron los compuestos descritos en el presente documento mediante procedimientos estándar en química de péptidos en fase sólida utilizando la metodología Fmoc. Se ensamblaron los péptidos o bien manualmente, de manera automática usando un sintetizador de péptidos Tribute (Protein Technologies Inc., Tucson, Arizona) o bien mediante combinación de síntesis manual y automática.

15 Se realizó la HPLC preparativa en un sistema de CL Prep de Waters usando un cartucho PrepPack Delta-Pack C_{18} , 300 Å, 15 µm, 47 x 300 mm a un caudal de 100 ml/min y/o en una columna C_{18} Phenomenex Luna, 100 Å, 5 µm, 30 x 100 mm a un caudal de 40 ml/min. Se realizó la HPLC de fase inversa analítica en un cromatógrafo de líquidos serie 1200rr de Agilent Technologies que usa una columna Zorbax C_{18} de Agilent, 1,8 µm, 4,6 x 110 mm a un caudal de 1,5 ml/min. Se realizaron los análisis de compuesto final en un cromatógrafo serie 1200 de Agilent Technologies mediante HPLC de fase inversa en una columna Gemini Gemini 110 Å C_{18} de Phenomenex, 3 µm, 2 x 150 mm a un caudal de 0,3 ml/min. Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas con electropulverización MAT Finnigan LCQ. A menos que se establezca de otro modo, todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente. La siguiente literatura de referencia estándar
20 proporciona orientación adicional acerca de configuración experimental general, así como acerca de la disponibilidad de material de partida y reactivos requeridos: Kates, S.A., Albericio, F., Eds., Solid Phase Synthesis: A Practical Guide, Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 2000; Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley Sons Inc., 2ª edición, 1991; Stewart, J.M., Young, J.D., Solid Phase Synthesis, Pierce Chemical Company, 1984; Bisello, *et al.*, J. Biol. Chem. 1998, 273, 22498-22505; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149-2154; y Chang y White P.D., 'Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach', Oxford University Press, Oxford, 2000.

Se utilizaron los siguientes grupos protectores para proteger los grupos funcionales de cadena lateral de aminoácidos dados: Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonyl) para Arg; tBu (t-butilo) para Tyr y Trt (tritol) para Cys, Gln y Asn.

5 Se mediaron los acoplamientos de aminoácidos protegidos con Fmoc en el sintetizador Tribute con HBTU/NMM en DMF excepto para derivados de cisteína que se acoplaron con DIC/HOBt en DMF. Se usaron ciclos únicos de 30-60 minutos con un exceso de 5 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc activados durante la síntesis. Se monitorizó la retirada del grupo protector Fmoc mediante UV. Se realizaron lavados múltiples (hasta 10 veces, según sea necesario) de dos minutos de la resina peptídica con piperidina al 20 % en DMF.

10 Se emplearon acoplamientos mediados con DIC/HOBt en DMF para todos los aminoácidos en modo manual. Se usaron ciclos únicos de al menos 2 horas con un exceso de 3 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc activados durante la síntesis. Se evaluó la totalidad de acoplamientos con la prueba de nihidrina (Kaiser). Se logró la retirada del grupo protector Fmoc con un lavado único de 30 min de la resina peptídica con piperidina al 20 % en DMF.

15 Tras la finalización de la síntesis peptídica, se lavaron las resinas peptídicas con DCM y se secaron a vacío. Se *trataron las resinas con TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (v/v/v) durante 2 h para* retirar los grupos protectores de cadena lateral con una escisión simultánea del péptido de la resina. Se filtraron los péptidos, se precipitó con éter dietílico y se decantó. Para obtener péptidos con puentes disulfuro, se disolvió el precipitado en TFA sin diluir y posteriormente se vertió la solución en acetonitrilo al 10 % en agua. En algunos casos, se añadió una cantidad adicional de acetonitrilo para solubilizar el sustrato. Se oxidó el péptido lineal con MeOH/I₂ 0,1 M. Se añadió la solución de oxidante gota a gota hasta que persistió el color amarillo. Se redujo el exceso de yodo con ácido ascórbico sólido. A continuación, se ajustó el pH hasta aproximadamente 4 con amoníaco concentrado. Se cargó la solución obtenida directamente en una columna prep. de HPLC y se eluyó con un gradiente de componente B (véase la tabla a continuación).

25 Para ciclar péptidos mediante formación de enlaces amida, se disolvieron los péptidos lineales brutos en DMF y también se preparó una solución de HBTU en DMF. Se añadieron la solución peptídica y la solución de activador de manera intercambiable a un volumen de DMF agitado enérgicamente que contenía DIPEA. Se mantuvo el pH a 9-10 con la adición de DIPEA sin diluir. Se monitorizó la reacción mediante HPLC y típicamente no se detectó ningún pico de sustrato después de que se añadiesen las últimas porciones de las soluciones de activador y péptido. Se diluyó la mezcla de reacción con AcOH al 0,1 % y se cargó la solución obtenida directamente en una columna prep. de HPLC y se eluyó con un gradiente de componente B.

30 Se purificó cada péptido bruto con sistema tampón T. Se agruparon las fracciones con una pureza que excedía un 93 %, determinada mediante HPLC analítica de fase inversa, y se recargaron en la columna y se eluyó con tampón T para proporcionar sales de trifluoroacetato. En algunos casos, se realizó una purificación adicional con sistema tampón C. Para obtener sales de acetato, se recargaron las fracciones de los ciclos con tampón T o C en la columna y se lavó la columna con 5 volúmenes de acetato de amonio 0,1 M. Se eluyó el producto final con tampón A. Se agruparon las fracciones y se liofilizaron.

Tabla. Composiciones de tampón

Tampón	Componente A	Componente B
C	Perclorato de trietilamonio 0,25 M, pH 2,3	Acetonitrilo al 60 %, componente A al 40 %
T	Ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %	Acetonitrilo al 60 %, TFA al 0,1 %
A	Ácido acético (AcOH) al 2 %	Acetonitrilo al 60 %, AcOH al 2 %

Típicamente, se descubrió que los compuestos preparados eran al menos aproximadamente un 95 % puros.

Ejemplo 1 - SEQ ID: 21

40 Se ensambló manualmente el fragmento 1-7 partiendo de 7,8 g (6,9 mmol) de resina H-Pro-2-dorotritilo-AM (EMD Millipore, número de catálogo 856057, 0,88 mmol/g). Se emplearon acoplamientos mediados por DIC/HOBt en DMF. Se usaron ciclos únicos de al menos 2 horas con un exceso de 3 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc activados durante la síntesis. Se evaluó la totalidad de acoplamientos con la prueba de nihidrina. Se logró la retirada del grupo protector Fmoc con un lavado único de 30 min de la resina peptídica con piperidina al 20 % en DMF. Se usaron los siguientes derivados de aminoácido para ensamblar los

45 residuos 1-7 del péptido unido a resina: Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH y Boc-Cpa-OH. Después de que se ensamblara el fragmento de péptido 1-7, se lavó la resina completamente con DCM y se trató con la mezcla de DCM/HFIP 7:3 (v/v) (2 x 1 h, 30 ml cada uno). A continuación, se evaporaron los disolventes y se precipitó el residuo con éter etílico, se filtró y se secó a vacío.

Se obtuvieron 5,79 g (4,63 mmol, 67 %) del péptido lineal protegido bruto. (Se usó el resto de este producto en la síntesis de otros compuestos como se describe en el presente documento.)

H-D-Arg-NEt₂ x 2TFA. Se disolvieron 2,81 g (5,4 mmol) de Boc-D-Arg(Pbf)-OH (Chem Impex, n.º de cat. 05282), 1,95 ml (11,2 mmol) de DIPEA y 2,13 g (5,6 mmol) de HBTU en 10 ml de DMF. Posteriormente se añadieron 0,62 ml (6 mmol) de dietilamina a la solución. No se detectó ningún sustrato mediante HPLC analítica después de 5 min. Se vertió la mezcla de reacción en 500 ml de agua y se separó el precipitado mediante centrifugación y se secó a vacío. *Se trató el residuo con 20 ml de TFA/TIS/H₂O (96/2/2, v/v/v) durante 1 h y se evaporaron los disolventes. Se trató el residuo con éter etílico y se decantó. Se obtuvieron 1,65 g (3,6 mmol, 67 %) de derivado semisólido que se usó en la etapa posterior sin purificación.*

Acoplamiento con H-D-Arg-NEt₂. Se disolvieron 2,3 g (aproximadamente 1,86 mmol) del péptido protegido lineal y 0,76 g (2 mmol) de HBTU en 10 ml de DMF que contenía 0,73 ml (4,2 mmol) de DIPEA. Posteriormente se añadieron 0,93 g (2,05 mmol) de H-D-Arg(Pbf)-OH x 2TFA en 1 ml de DMF a la mezcla de reacción. No se detectó ningún sustrato después de 5 min mediante HPLC. Se precipitó el producto con 1 l de agua, se extrajo mediante filtración y secó a vacío. *Se obtuvieron 2,6 g (1,78 mmol, 96 %) de péptido lineal protegido bruto. Se trató el péptido totalmente protegido con 20 ml de TFA/TIS/H₂O (96/2/2, v/v/v) durante 1 h y se evaporó el disolvente. Se precipitó el péptido lineal no protegido con éter etílico y se liofilizó. Rendimiento 1,82 g (1,55 mmol, 83 %).*

Se disolvió toda la cantidad del péptido lineal en 50 ml de DMF. También se preparó una solución de 0,59 g (aproximadamente 1,55 mmol) de HBTU en 10 ml de DMF. Se añadieron la solución peptídica y la solución de activador de manera intercambiable a 50 ml de DMF agitado enérgicamente que contenía 200 µl de DIPEA en 10 porciones de 5 ml y 1 ml, respectivamente. Se mantuvo el pH a 9-10 con la adición de DIPEA sin diluir. No se detectó ningún pico de sustrato mediante HPLC después de que se añadiesen las últimas porciones de las soluciones de activador y péptido. Se diluyó la mezcla de reacción con AcOH al 0,1 % hasta 1 l. Se cargó la solución obtenida directamente en una columna prep. de HPLC y se purificó con sistema tampón T eluido con un gradiente de componente B (véase la tabla anterior). Se agruparon las fracciones con una pureza que excedía un 93 %, determinada mediante HPLC analítica de fase inversa, y se recargaron en la columna. Se lavó la columna con 5 volúmenes de AcONH₄ 0,1 M y posteriormente se eluyó el compuesto con tampón C para proporcionar sal de acetato. Se agruparon las fracciones y se liofilizaron. Se obtuvieron 703,1 mg (0,60 mmol, 22 % global basándose en un contenido peptídico de un 89,6 %) de péptido en polvo blanco. Se determinó la pureza del producto mediante HPLC analítica como de un 99,7 % y la M+H observada fue de 1045,6 (M+H calc. = 1045,5).

Ejemplo 2 - SEQ ID NO: 10

Se disolvieron 2,32 g (aproximadamente 1,8 mmol) del péptido lineal protegido preparado en la síntesis de SEQ ID NO: 21 en 7 ml de DMF y se añadieron 0,63 ml (3,6 mmol, 2 eq.) de NMM seguido de 0,76 g (2 mmol, 1,1 eq.) de HBTU. En un vial separado, se suspendieron 0,64 g (2,8 mmol, 1,5 eq.) de sulfato de agmatina en 7 ml de DMF que contenía 0,49 ml (2,8 mmol) de DIPEA. Se añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BTA, Sigma-Aldrich, n.º de cat. 128910) a la suspensión sometida ocasionalmente a vórtex/sonicación. Se obtuvo una solución transparente después de que se añadiesen 4 eq. de BTA a la suspensión. Se combinaron las dos soluciones y no se detectó ningún péptido sustrato mediante HPLC después de 5 min. Se precipitó el producto con 1 l de agua, se extrajo mediante filtración y secó a vacío. *Se trató el polvo resultante con 50 ml de la mezcla de TFA/TIS/H₂O 96/2/2 (v/v/v) durante 1,5 h. Se evaporó el disolvente y se precipitó el péptido lineal con éter etílico, se reconstituyó en agua/acetonitrilo y se liofilizó.*

Se disolvió toda la cantidad de péptido (2,13 g, aproximadamente 2 mmol) obtenido en la etapa precedente en 50 ml de DMF. También se preparó una solución de 0,76 g (2 mmol) de HBTU en 10 ml de DMF. Se añadieron la solución peptídica y la solución de activador de manera intercambiable a 50 ml de DMF agitado enérgicamente que contenía 400 µl de DIPEA en 10 porciones de 2,5 ml y 0,5 ml, respectivamente. Se mantuvo el pH a 9-10 con la adición de DIPEA sin diluir. No se detectó ningún pico de sustrato después de que se añadiesen las últimas porciones de las soluciones de activador y péptido. Se diluyó la mezcla de reacción con AcOH al 0,1 % hasta 1 l y se cargó la solución obtenida directamente en una columna prep. de HPLC y se purificó con sistema tampón T eluido con un gradiente de componente B (véase la tabla anterior). Se agruparon las fracciones con una pureza que excedía un 93 %, determinada mediante HPLC analítica de fase inversa, y se recargaron en la columna. Se lavó la columna con 5 volúmenes de AcONH₄ 0,1 M y posteriormente se eluyó el compuesto con tampón C para proporcionar sal de acetato. Se agruparon las fracciones y se liofilizaron. Se obtuvieron 656,7 mg (0,62 mmol, rendimiento global de un 23 % basándose en un contenido peptídico de un 89,5 %) de péptido en polvo blanco. Se determinó la pureza del producto mediante HPLC analítica como de un 100,0 % y la M+H observada fue de 946,6 (M+H calc. fue de 946,4).

Ejemplo 3 - SEQ ID NO: 5

Se hinchó 1 g (aproximadamente 1 mmol) de resina FMPB-AM (EMD Millipore, n.º de cat. 855028) en 15 ml de mezcla de DCE/TMOF 1:1. A la suspensión de resina se le añadió isobutilamina (1,5 ml, 15 mmol) seguido de 3,2 g de triacetoxiborohidruro de sodio sólido. Se agitó la suspensión durante la noche. Se lavó la resina con

MeOH, DMF y DCM y posteriormente se aciló con Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH/DIC (4 eq.) en DCM. Se lavó la resina con DMF y se sometió a prueba para determinar la totalidad de la acilación con la prueba de clorano (negativa). Se dividió la resina en tres porciones iguales y se continuó la síntesis a una escala de 0,33 mmol en el sintetizador Tribute. Se usaron acoplamientos únicos mediados con HBTU/NMM en DMF o con DIC/HOBt (para Cys) con un exceso de 5 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc. Se retiró el grupo protector Fmoc con varios lavados consecutivos de 2 min con piperidina al 20 % en DMF. Se usaron los siguientes derivados de aminoácido en la síntesis automática: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH y Boc-Cpa-OH. Después de que se hubiese ensamblado toda la secuencia peptídica se escindió el péptido de la resina con 20 ml de TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (v/v/v) durante 2 h. Se disolvió el péptido lineal en 40 ml de DMF que contenía 200 µl de DIPEA. También se preparó una solución de 152 mg (aproximadamente 0,4 mmol) de HBTU en 5 ml de DMF. Se añadieron la solución peptídica y la solución de activador de manera intercambiable a 40 ml de DMF agitado enérgicamente en 10 porciones de 4 ml y 0,5 ml, respectivamente. Se mantuvo el pH a 9-10 con la adición de DIPEA sin diluir. No se detectó ningún pico de sustrato mediante HPLC después de que se añadiese la última porción de la solución de activador. Se diluyó la mezcla de reacción con AcOH al 0,1 % hasta 1 l. Se cargó la solución obtenida directamente en una columna prep. de HPLC. Se purificó el compuesto mediante tres ciclos consecutivos en tampón T.

Se agruparon las fracciones que excedían una pureza de un 97 % y se liofilizaron. Se obtuvieron 49,0 mg (0,042 mmol, 12 % global suponiendo un contenido peptídico de un 90 %) de péptido en polvo blanco. Se determinó la pureza del producto mediante HPLC analítica como de un 99,5 % y la M+H observada fue de 1045,6 (M+H calc. = 1045,5).

Ejemplo 4 - SEQ ID NO: 9

Se hincharon 0,37 g (aproximadamente 0,3 mmol) de resina 1,4-diaminobutano-2-clorotritilo (EMD Millipore, n.º de cat. 856085) en 10 ml de DMF y se colocó la resina en un recipiente de reacción de síntesis automática. Se llevó a cabo en ensamblado peptídico en el sintetizador Tribute. Se usaron acoplamientos únicos mediados con HBTU/NMM en DMF o con DIC/HOBt (para Cys) con un exceso de 5 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc. Se retiró el grupo protector Fmoc con varios lavados consecutivos de 2 min con piperidina al 20 % en DMF. Se usaron los siguientes derivados de aminoácido en la síntesis automática: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH y Boc-Tyr(tBu)-OH. Después de que se hubiese ensamblado toda la secuencia peptídica se escindió el péptido de la resina con 30 ml de HFIP/DCM 3:7 (v/v) durante 2 h. Se filtró la resina y se evaporaron los disolventes. Se precipitó el péptido protegido lineal con éter etílico anhidro. Se decantó el precipitado y se suspendió en 20 ml de acetonitrilo. Posteriormente se añadieron 111 mg (0,4 mmol) de Z(2-Cl)-OSu y 0,136 ml (0,8 mmol) de DIPEA a la suspensión. Después de que se hubiese disuelto el sustrato, se evaporó el disolvente y se trató el residuo con 20 ml de la mezcla de TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 durante 1,5 h. A continuación, se evaporó el TFA y se precipitó el residuo con éter dietílico. Se disolvió el péptido lineal bruto en 100 ml de DMF que contenía 200 µl de DIPEA. Posteriormente se añadió una solución de 120 mg (0,31 mmol) de HBTU en 5 ml de DMF a la mezcla de reacción agitada enérgicamente. Después de 30 min, se diluyó la mezcla de reacción con 1 l de AcOH al 0,1 % y se recargó la solución obtenida en la columna de HPLC prep. Se eluyó el péptido cíclico rápido (aproximadamente MeCN al 3 %/min) en sistema tampón T. Se agruparon las fracciones que excedían una pureza de un 97 % mediante HPLC analítica y se liofilizaron. Se trató el liofilizado con 5 ml de la mezcla de TMSBr/tioanisol/TFA (1/1/6, v/v/v) durante 1 h a 0 °C. Se evaporó el TFA y se precipitó el péptido con éter etílico. Se purificó el producto final mediante un ciclo único en tampón T.

Se agruparon las fracciones que excedían una pureza de un 97 % y se liofilizaron. Se obtuvieron 77,5 mg (0,079 mmol, 26 % global suponiendo un contenido peptídico de un 90 %) de péptido en polvo blanco. Se determinó la pureza del producto mediante HPLC analítica como de un 99,6 % y la M+H observada fue de 886,4 (M+H calc. = 886,4).

Ejemplo 5 - SEQ ID NO: 17

Se hincharon 0,43 g (aproximadamente 0,3 mmol) de resina H-Arg(Pbf)-O-2-clorotritilo (EMD Millipore, n.º de cat. 856067) en 10 ml de DMF y se colocó la resina en un recipiente de reacción de síntesis automática. Se llevó a cabo en ensamblado peptídico en el sintetizador Tribute. Se usaron acoplamientos únicos mediados con HBTU/NMM en DMF o con DIC/HOBt (para Cys) con un exceso de 5 veces la cantidad de aminoácidos protegidos con Fmoc. Se retiró el grupo protector Fmoc con varios lavados consecutivos de 2 min con piperidina al 20 % en DMF. Se usaron los siguientes derivados de aminoácido en la síntesis automática: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Thi-OH. Después de que se hubiese ensamblado la secuencia peptídica 3-8 se acopló manualmente Fmoc-Phe(4-Et)-OH usando el procedimiento de DIC/HOBt con un exceso de 2 veces la cantidad de reactivos. A continuación, se reemplazó el grupo Fmoc con el grupo Boc tratando la resina con PIP/DMF al 20 % durante 30 min y acilando la función amino de extremo N con Boc₂O en DMF. Se escindió el péptido lineal de la resina con 30 ml de HFIP/DCM 3:7 (v/v) durante 2 h. Se filtró la resina y se evaporaron los disolventes. Se precipitó el péptido protegido lineal con éter etílico anhidro. Se decantó el precipitado y secó a vacío. Se obtuvieron 450 mg del péptido protegido bruto. Se disolvió toda la cantidad del péptido (aproximadamente 0,3 mmol) en 10 ml de 1,2-dicloroetano que contenía 0,5 ml de DMF y

61 µl (0,45 mmol) de NMM. Se enfrió la solución hasta 0 °C en baño de hielo y se añadieron 61 µl (0,45 mmol) de clorofornio de isobutilo. Se agitó magnéticamente la mezcla de reacción durante 10 min a 0 °C. Se añadió una solución de 160 mg (4,5 mmol) de borohidruro de sodio en 5 ml de agua en una porción. Se diluyó la reacción con 200 ml de agua y se separó el producto mediante centrifugación y se secó a vacío. A continuación, se trató el producto con 20 ml de la mezcla de TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 durante 1,5 h. A continuación, se evaporó el TFA y se precipitó el residuo con éter dietílico. Se disolvió el péptido lineal bruto en 80 ml de DMF que contenía 200 µl de DIPEA. Posteriormente se añadió una solución de 61 mg (0,15 mmol) de HBTU en 5 ml de DMF a la mezcla de reacción agitada enérgicamente. Después de 30 min, se diluyó la mezcla de reacción con 1 l de AcOH al 0,1 % y se recargó la solución obtenida en la columna de HPLC prep. Se purificó el péptido cíclico mediante tres ciclos consecutivos en tampón T.

Se agruparon las fracciones que excedían una pureza de un 97 % y se liofilizaron. Se obtuvieron 41,7 mg (0,039 mmol, 13 % global suponiendo un contenido peptídico de un 90 %) de péptido en polvo blanco. Se determinó la pureza del producto mediante HPLC analítica como de un 95,1 % y la M+H observada fue de 970,6 (M+H calc. = 970,5).

Experimental (pruebas biológicas)

Ensayos de receptor *in vitro*

Actividad de receptor V₂

Se determinó la actividad agonista de compuestos sobre el receptor V₂ humano (hV₂R) en un ensayo de gen indicador transcripcional transfectando de manera transitoria un ADN de expresión de receptor hV₂ en células HEK-293 (línea celular 293 de riñón embrionario humano) junto con un ADN indicador que contenía elementos promotores sensibles al calcio intracelular que regulan la expresión de luciferasa de luciémaga. Véase Boss, V., Talpade, D.J., Murphy, T.J. J. Biol. Chem. 1996, 3 de mayo; 271(18), 10429-10432 para una orientación adicional acerca de este ensayo. Se expusieron las células a diluciones en serie de compuestos diluidos 10 veces por dosis durante 5 h, seguido de lisis de células, determinación de la actividad luciferasa, y determinación de las eficacias de compuestos y valores de CE₅₀ a través de regresión no lineal. Se usó desmopresina (dDAVP) como control interno en cada experimento. Se muestran los resultados para los compuestos sometidos a prueba en la tabla 3.

Actividad de receptor V_{1b}

Para determinar la selectividad, se sometieron a prueba los compuestos en ensayos de gen indicador transcripcionales basados en luciferasa que expresan el receptor V_{1b} humano (hV_{1b}R). Se determinó la actividad agonista de compuestos sobre el hV_{1b}R en un ensayo de gen indicador transcripcional en una línea celular 293 Flp-In™ (HEK-flipin) transflectada de manera estable para expresar el hV_{1b}R. Estas células se transflectan de manera transitoria con un indicador de luciferasa con elementos sensibles a NFAT (NFAT-Luc). Se expusieron las células a diluciones en serie de compuestos diluidos 10 veces por dosis durante 5 horas, seguido de lisis de células, determinación de la actividad luciferasa, y determinación de las eficacias de compuestos y valores de CE₅₀ a través de regresión no lineal. Se usó AVP como control interno en cada experimento. Se muestran los resultados para los compuestos sometidos a prueba en la tabla 3.

Depuración renal

La desmopresina se depura del cuerpo principalmente por los riñones ("depuración renal"). Los compuestos de la invención tienen un mayor grado de depuración a través de mecanismos extrarrenales. Se realizaron experimentos farmacocinéticos en ratas sometidas a nefrectomía y operación simulada. Se determinó la depuración extrarrenal (DER) en ratas sometidas a nefrectomía, y se determinó la depuración total en ratas sometidas a operación simulada (Dsim). Se calculó el % de depuración extrarrenal mediante (DER/Dsim) x 100.

Para los estudios farmacocinéticos, se cateterizaron ratas Sprague Dawley macho adultas por medio de la vena yugular (para la administración de compuesto) y arteria carótida (para la extracción de sangre). Se inyectó una solución que contenía múltiples compuestos (*cassette dosing*) en el catéter de la vena yugular (0,1 mg de FB/ml de cada compuesto, 0,3 ml/animal; dosis nominal de 0,1 mg de FB/kg/compuesto). Se extrajeron muestras de sangre a los 2, 6, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos tras la administración usando un sistema de muestreo de sangre automatizado, la unidad de muestreo de sangre automatizada de 2ª generación de Instech Laboratories (ABS2). Se preparó el plasma a partir de sangre completa usando K2EDTA como anticoagulante. El bioanálisis posterior de muestras incluyó la extracción de compuesto y la determinación de la concentración en plasma usando procedimientos de CL/EM estándar. Se calculó la concentración de analito a partir de áreas de pico y curvas de calibración. Se obtuvieron los parámetros FC por el mejor ajuste del perfil de concentración de compuesto-tiempo para cada animal por medio de un procedimiento de análisis no compartimental usando el programa informático WINNONLIN™ v6.3 (Pharsight Corporation).

Antidiuresis

Se sometieron a prueba los compuestos para determinar la actividad antidiurética en un modelo de rata. En resumen, se dispusieron ratas Sprague Dawley eurolémicas cateterizadas en jaulas metabólicas. Cada jaula metabólica se ajustó para la medición continua de la diuresis espontánea mediante transductores de fuerza dispuestos encima de los viales de obtención de muestra de orina para monitorizar y registrar la evolución temporal de la diuresis usando el programa informático NOTOCORD™. Las ratas recibieron una infusión intravenosa del compuesto de prueba o vehículo durante tres horas usando una bomba de jeringuilla y procedimiento de atadura y anilla giratoria. Se recogieron los datos para la diuresis durante la administración del compuesto (0-3 horas) y se recogieron durante las 5 horas tras la administración. En algunos casos, también se determinó la osmolalidad de la orina. Los compuestos de la invención mostraron una actividad antidiurética.

10 **Composiciones farmacéuticas**

También se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I), como se define en el presente documento, como producto farmacéutico. Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), como se define en el presente documento, como ingrediente activo en asociación con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La composición farmacéutica se puede adaptar para diversos modos de administración incluyendo, por ejemplo, oral y nasal. Por tanto, la composición puede estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, micropartículas, gránulos, jarabes, suspensiones y soluciones.

La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente, por ejemplo, al menos un aditivo adicional seleccionado de un agente disgregante, aglutinante, lubricante, agente saborizante, conservante, colorante y cualquier mezcla de los mismos. Se encuentran ejemplos de dichos y otros aditivos en '*Handbook of Pharmaceutical Excipients*'; Ed. A.H. Kibbe, 3ª ed., American Pharmaceutical Association, EE.UU. y Pharmaceutical Press GB, 2000.

Procedimientos de tratamiento

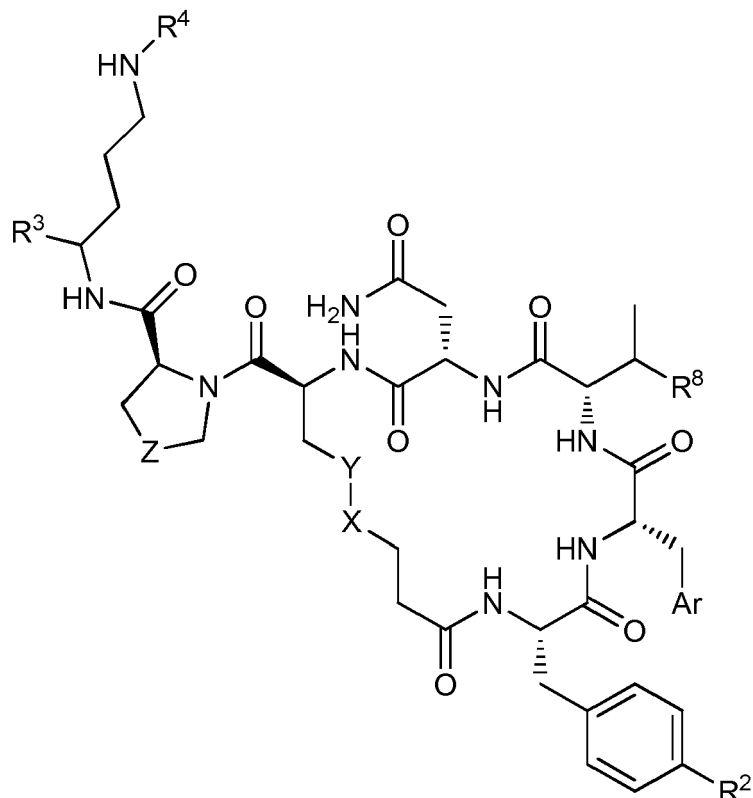
25 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto como se indica anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria y nicturia. Además, se proporcionan procedimientos de tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria y nicturia. Como se usa en el presente documento, 'tratamiento' significa el alivio de síntomas, el aplazamiento del inicio de la enfermedad y/o la cura de la enfermedad cuando se administra un compuesto de la invención en una dosis adecuada.

30 La dosificación típica de los compuestos de acuerdo con la presente invención varía dentro de un amplio intervalo y dependerá de diversos factores tales como las necesidades individuales de cada paciente y la vía de administración. La dosificación se puede administrar una vez al día o de manera más frecuente que una vez al día, por ejemplo, de manera intermitente. Un médico experto en la técnica será capaz de optimizar la dosificación a la situación en cuestión.

35

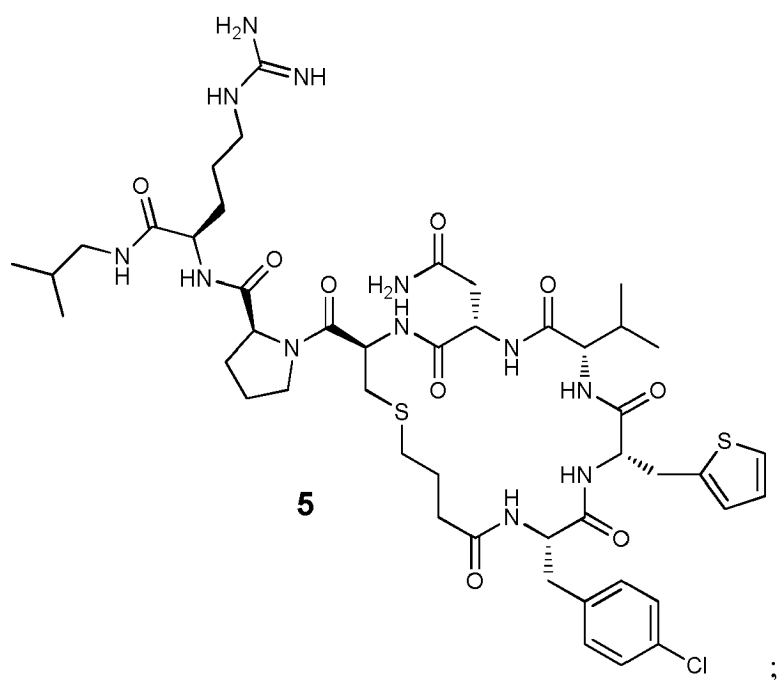
REVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:

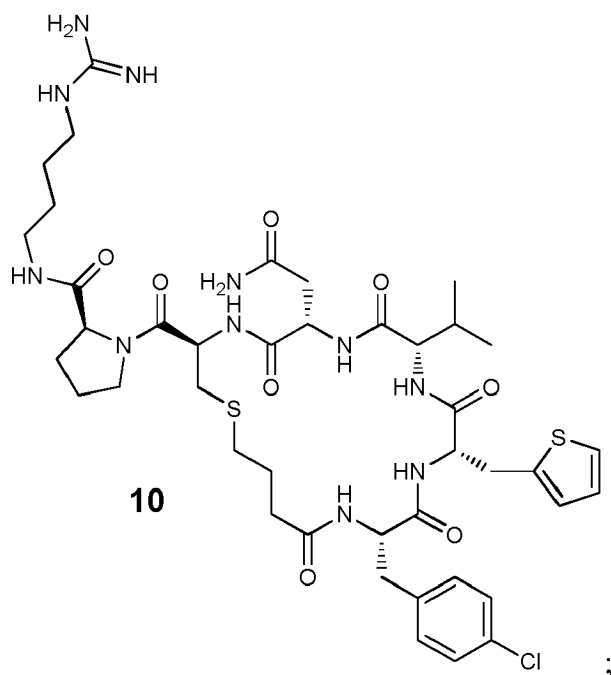


- 5 aceptable del mismo, en la que:
- R^2 es H, alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 ;
- R^3 es H o $-CH_2-OH$ o $-C(O)-NR^5R^6$;
- R^4 es H o $-C(=NH)-NH_2$;
- 10 R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo C_1-C_6 , $-CH_2$ -ciclopropilo, -ciclopropilo o arilalquilo con la condición de que R^5 y R^6 no son ambos H;
- X e Y son independientemente $-CH_2-$ o $-S-$ con la condición de que si X es $-CH_2-$, Y no es $-CH_2-$;
- Z es $-CHR^7-$ o S y R^7 es H o alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 ;
- R^8 es H o $-CH_3$;
- Ar es heteroarilo o fenilo opcionalmente sustituido con un alquilo C_1-C_4 , halógeno, -OH u -O-alquilo C_1-C_4 .
- 15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo C_1-C_6 o arilalquilo.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que solo uno de X e Y es $-S-$.
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X es $-CH_2-$.
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X e Y son ambos $-S-$.
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que Ar es tiofeno.
- 20 7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R^8 es $-CH_3$.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^3 es $-C(O)-NR^5R^6$.

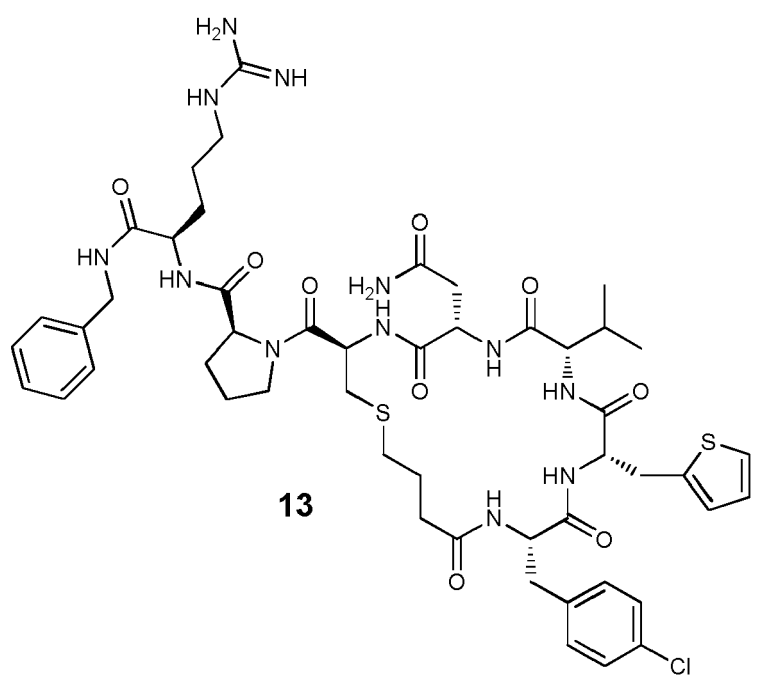
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que R^5 es H y R^6 es alquilo C_1-C_4 .
10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que tanto R^5 como R^6 son $-CH_2CH_3$.
- 5 11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que R^2 es un halógeno.
12. El compuesto de la reivindicación 11, en el que R^2 es $-Cl$.
13. El compuesto de la reivindicación 11, en el que R^2 es $-F$.
14. El compuesto de la reivindicación 1, que es: compuesto 5



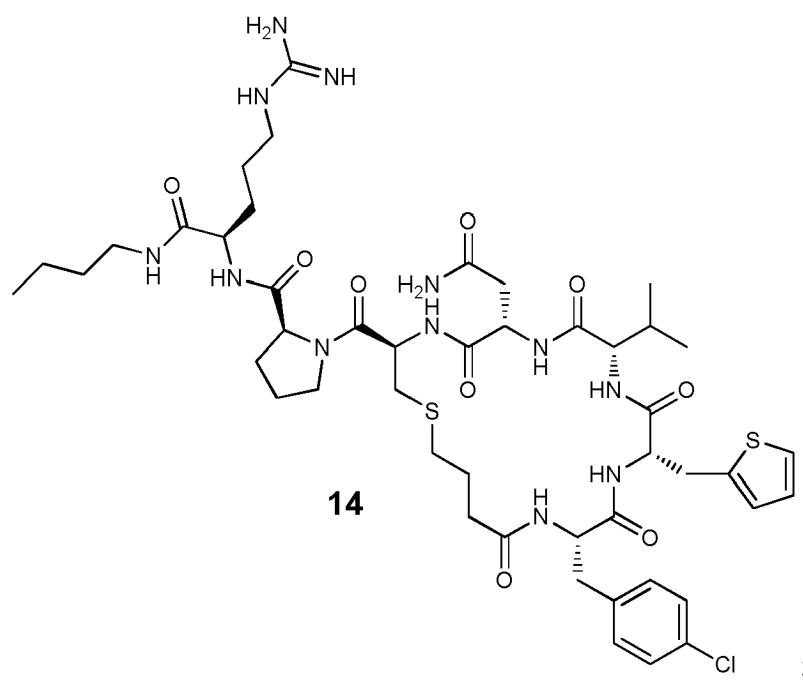
10 compuesto 10



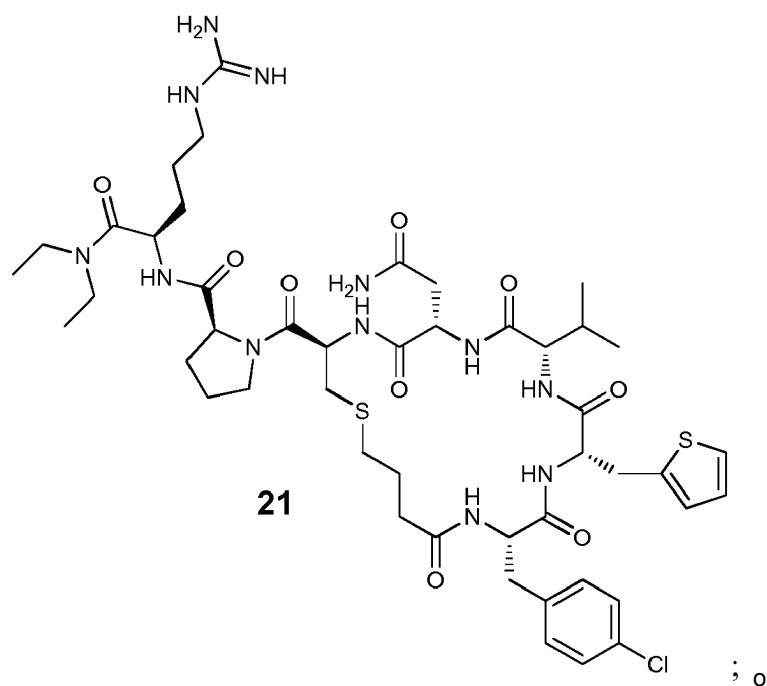
compuesto 13



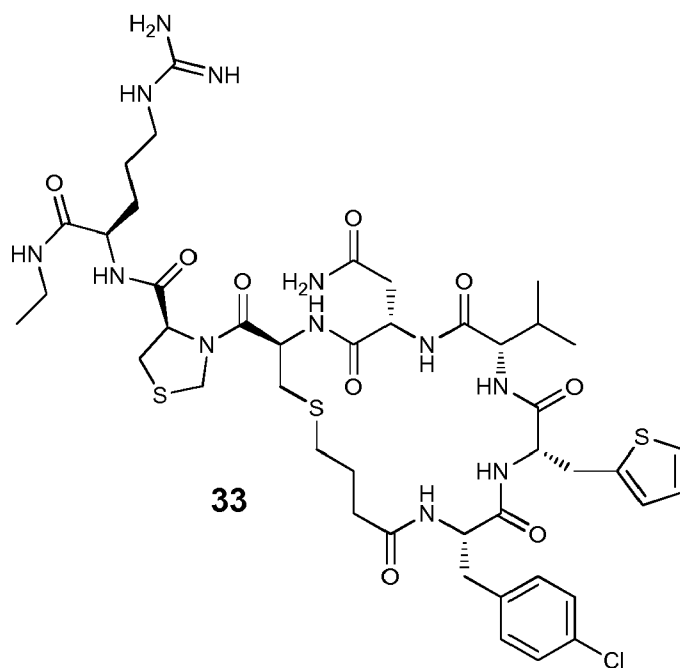
compuesto 14



compuesto 21



compuesto 33



15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria o nicturia.
16. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes insípida, enuresis nocturna primaria o nicturia.