(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 690 317**

(51) Int. Cl.:
C07K 7/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2013** **PCT/EP2013/076783**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14095773**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2013** **E 13814079 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2935312**

(54) Título: **Péptidos como agonistas de oxitocina**

(30) Prioridad:

21.12.2012 EP 12199012

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2018

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

BISSANTZ, CATERINA;
BLEICHER, KONRAD y
GRUNDSCHOBER, CHRISTOPHE

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

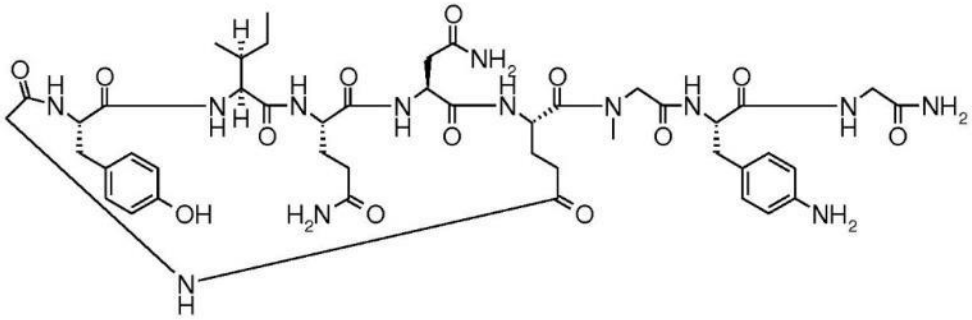
ES 2 690 317 T3

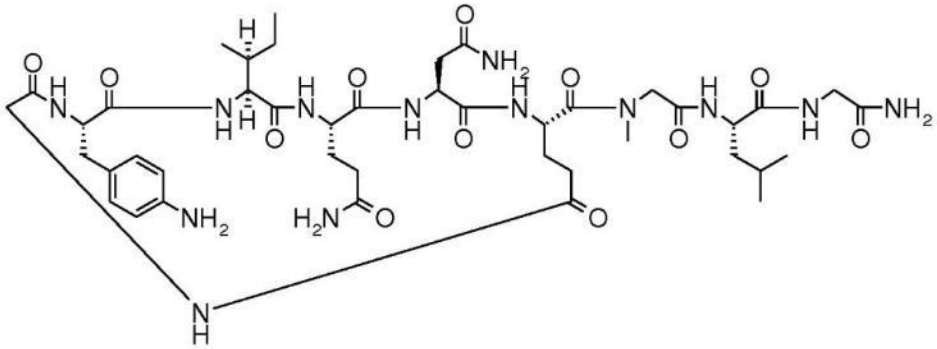
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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).

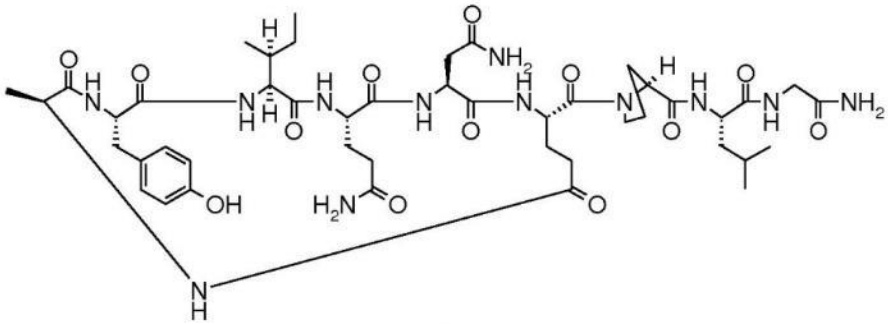
DESCRIPCIÓN

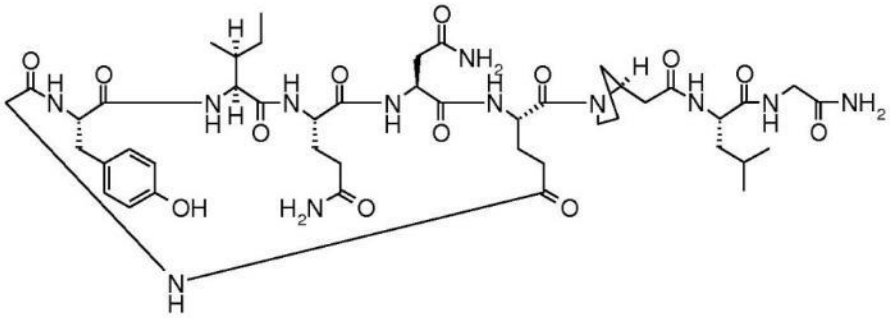
Péptidos como agonistas de oxitocina

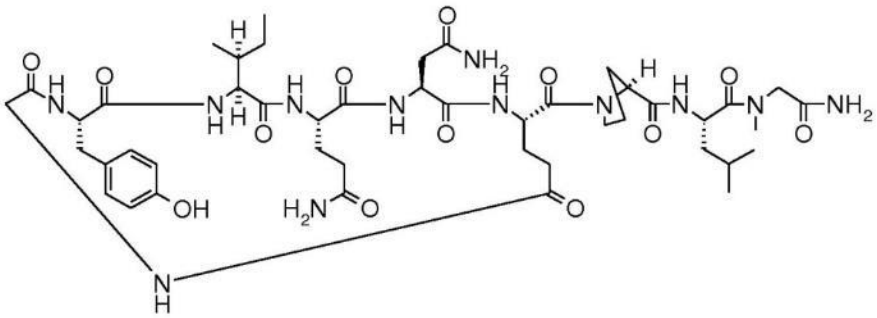
La invención se refiere a los compuestos

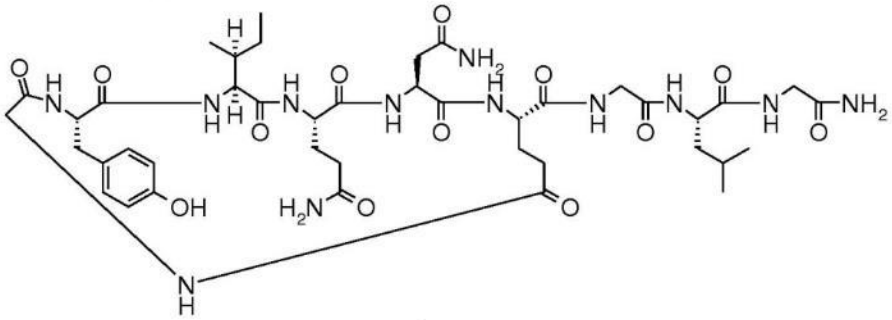


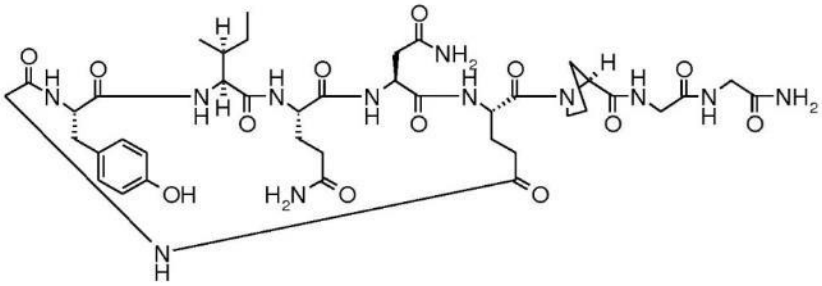


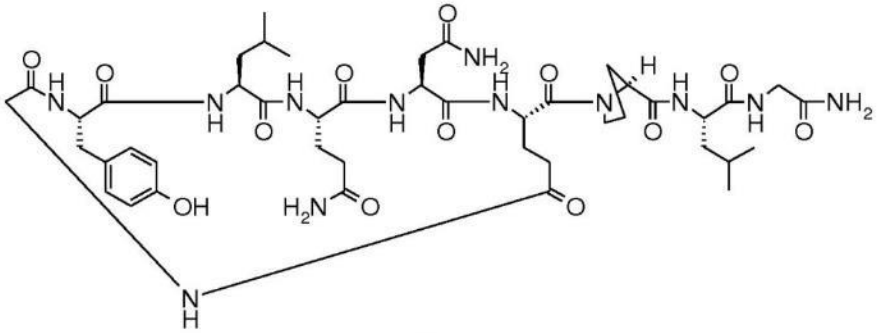


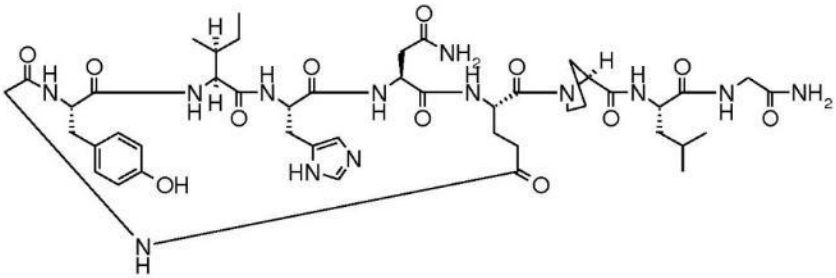


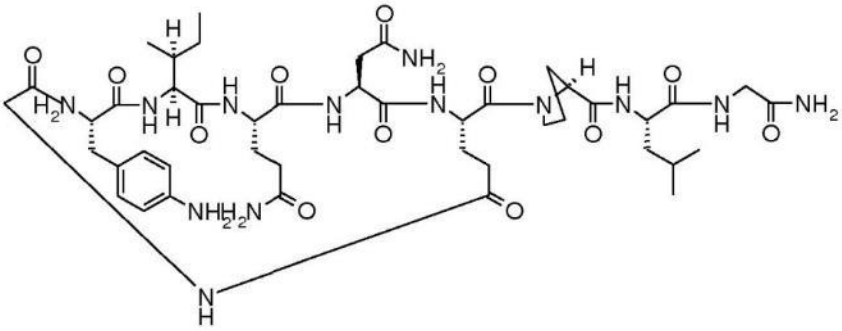


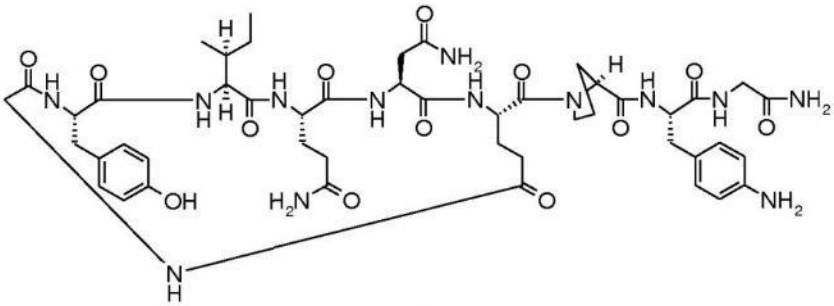


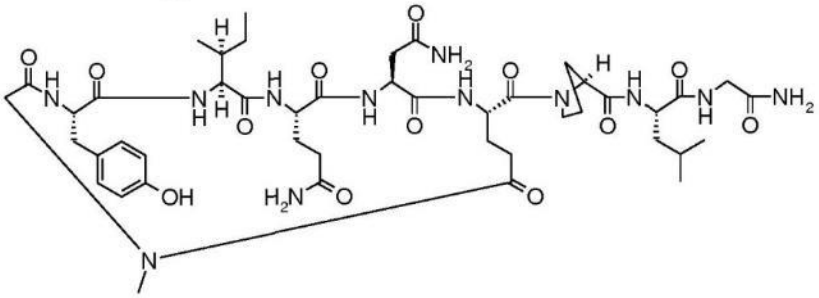


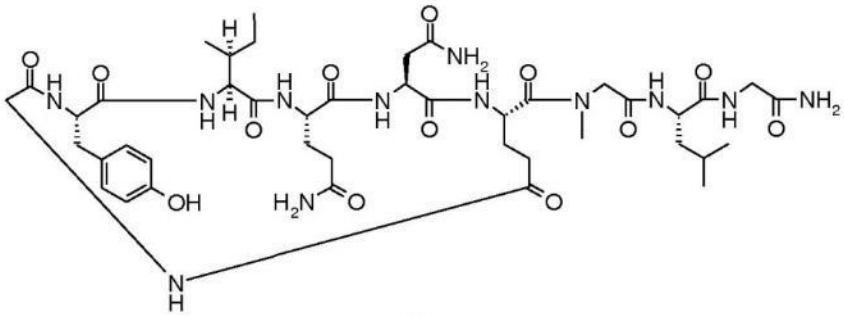


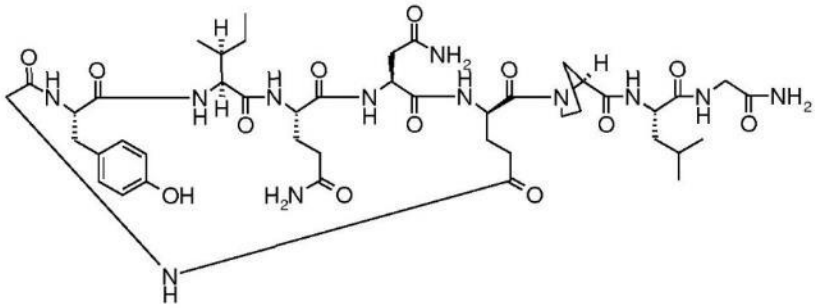


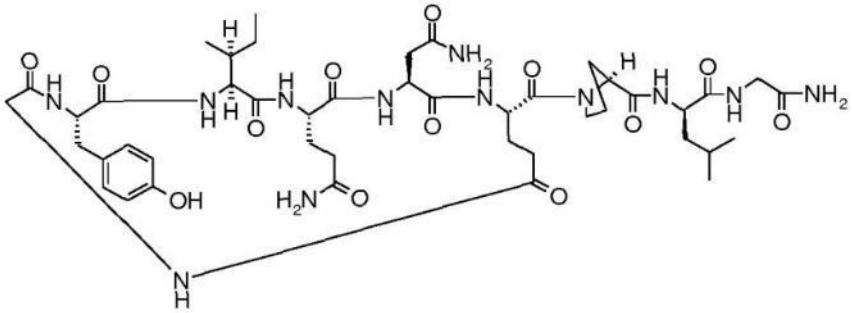


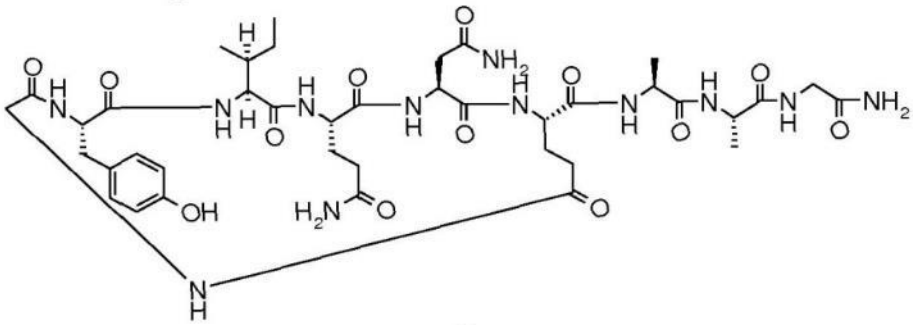


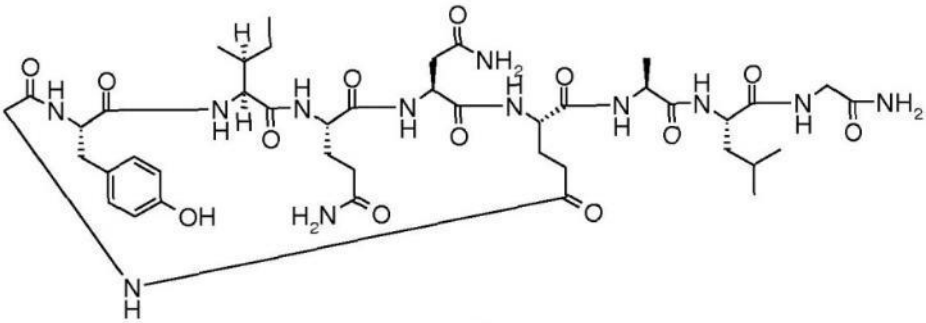


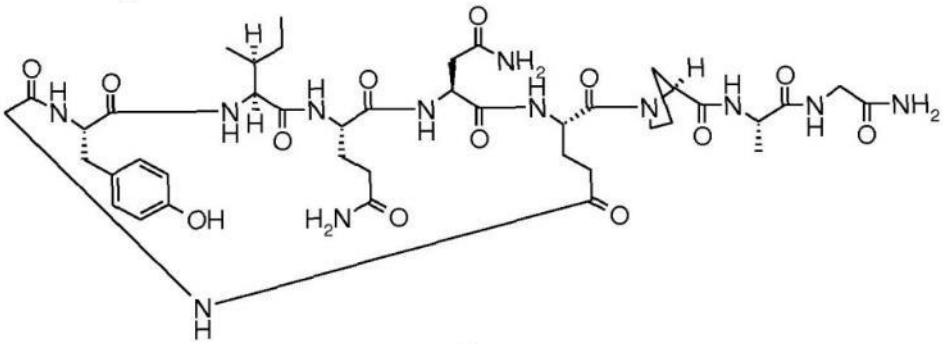


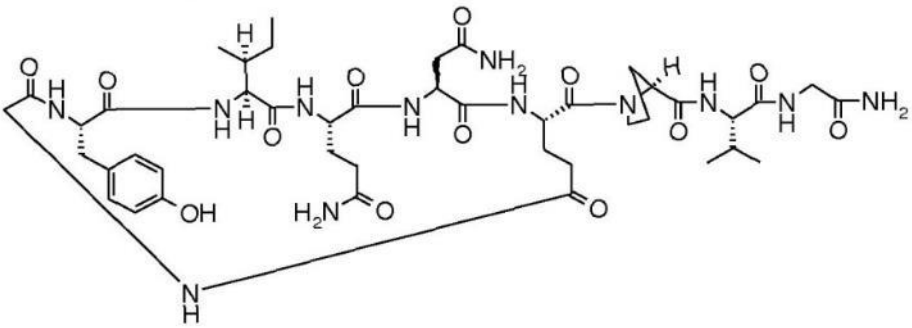


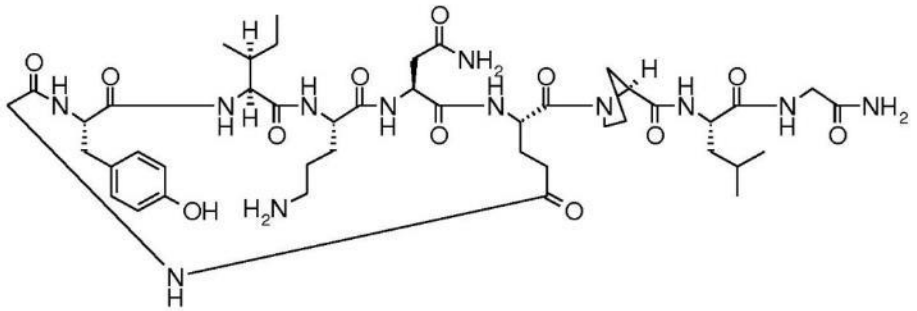


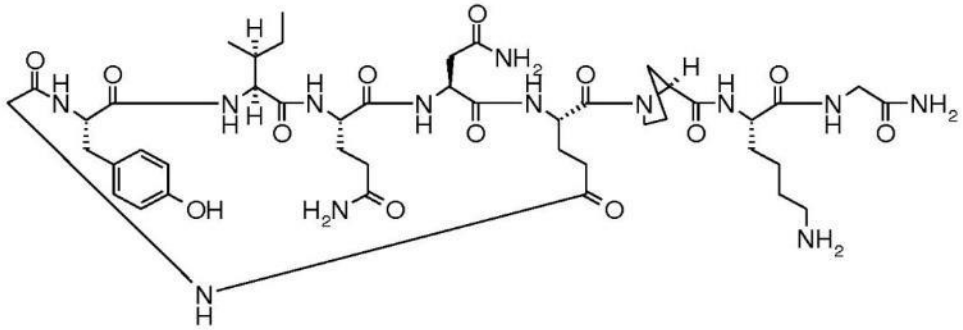


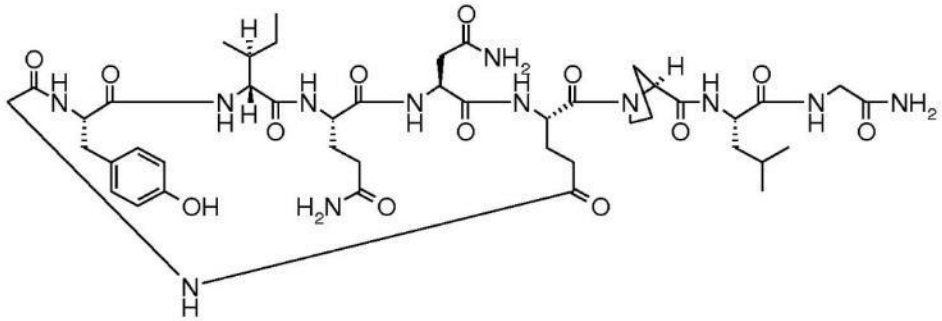


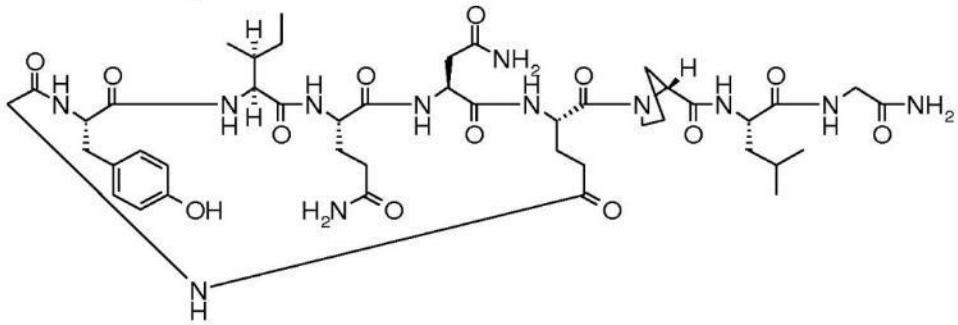


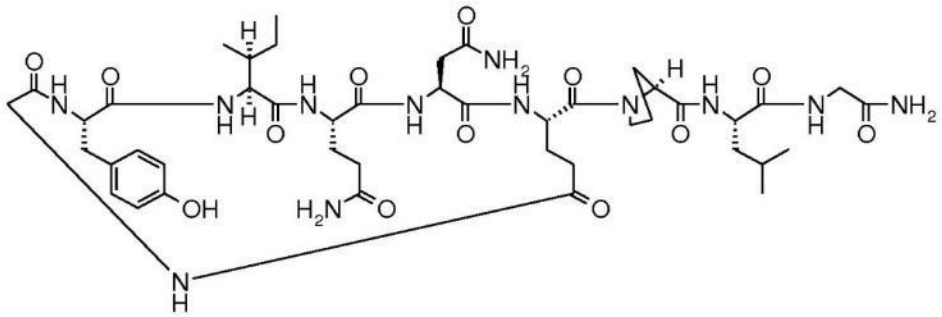


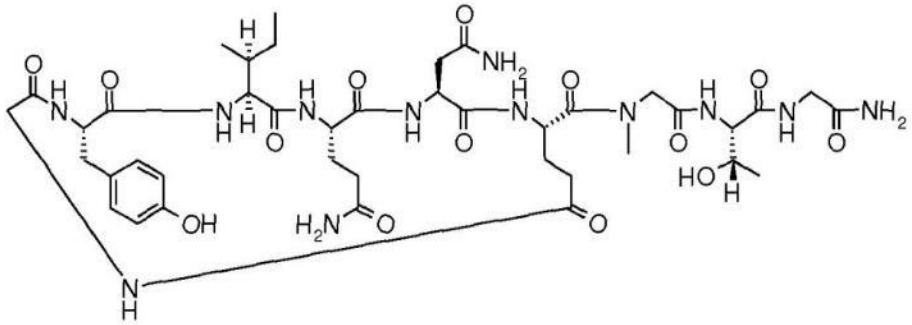


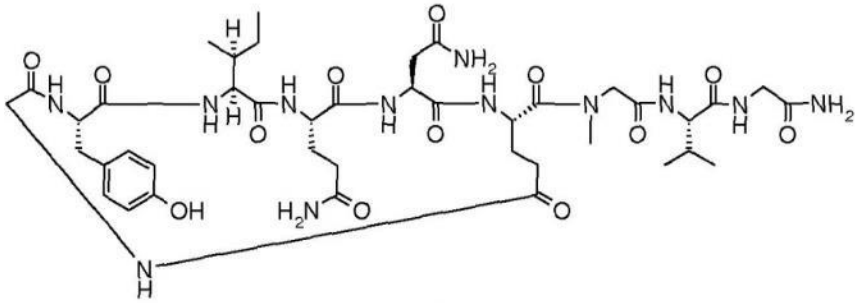


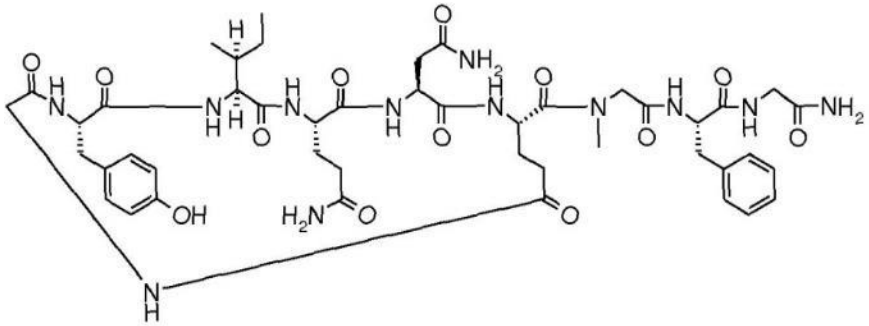


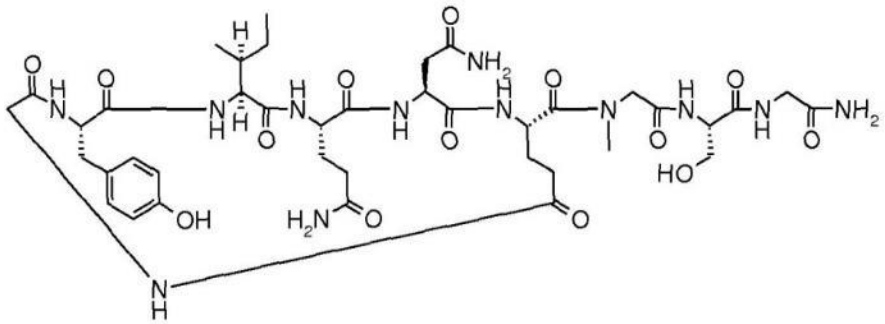


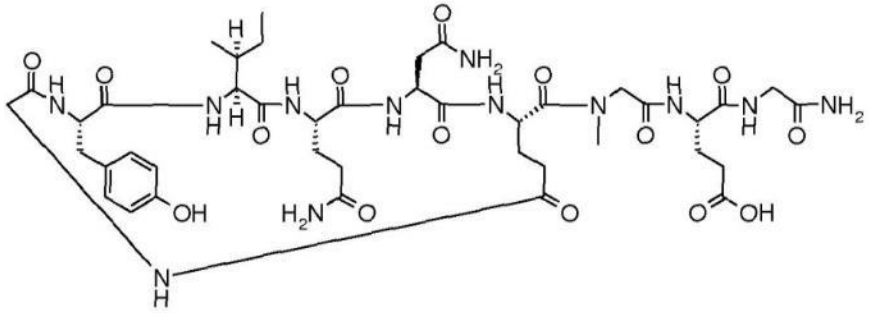


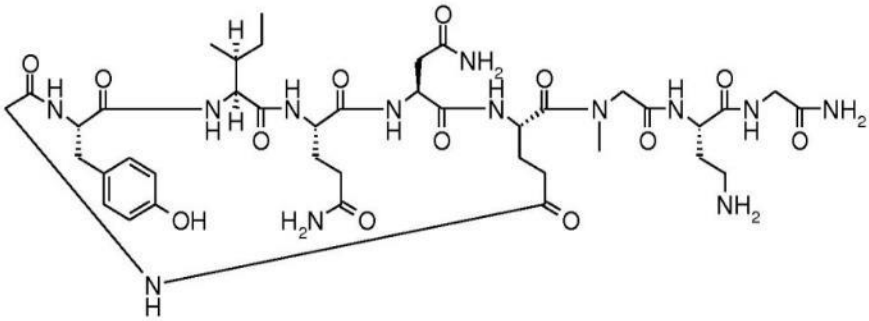


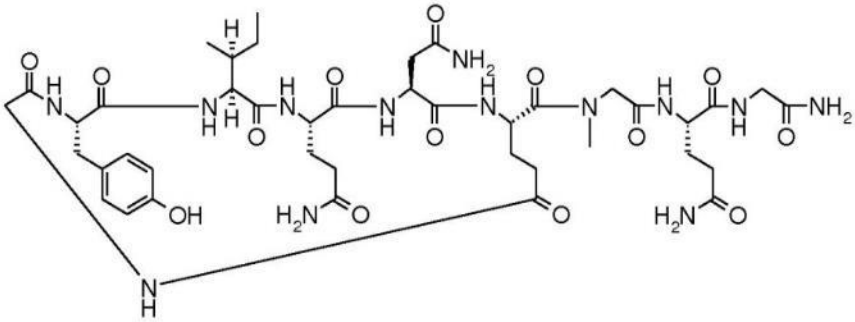


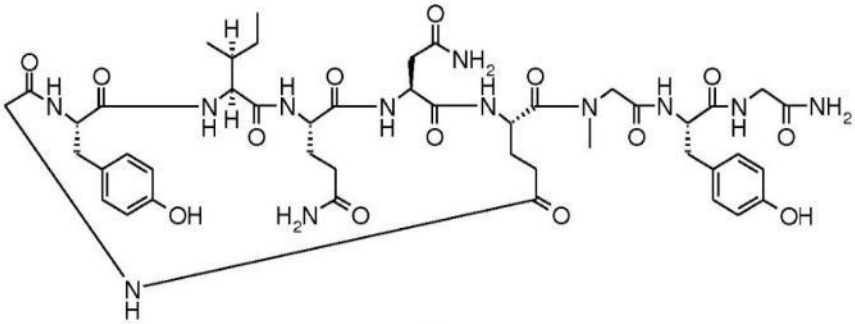


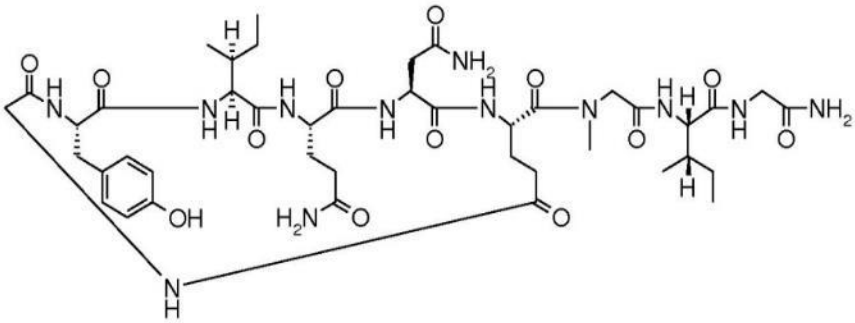


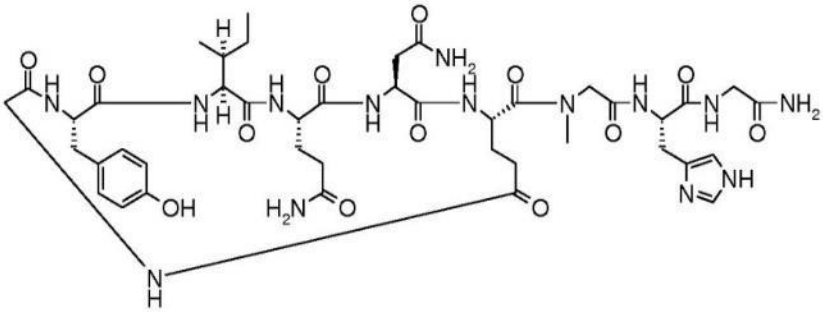


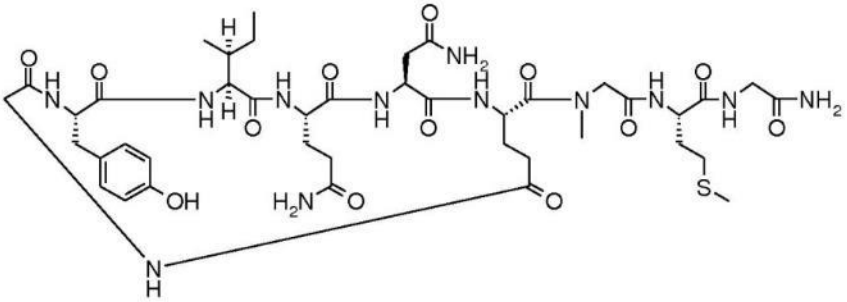


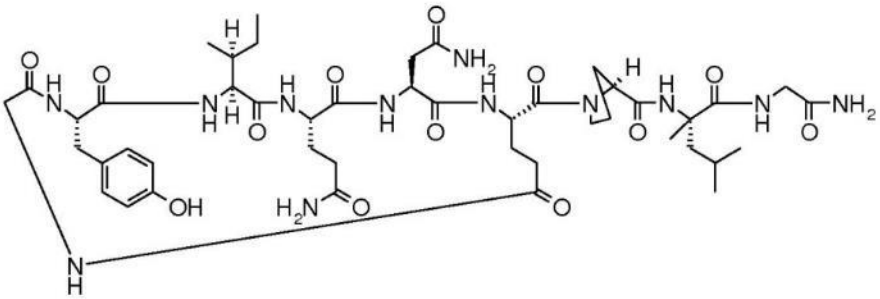


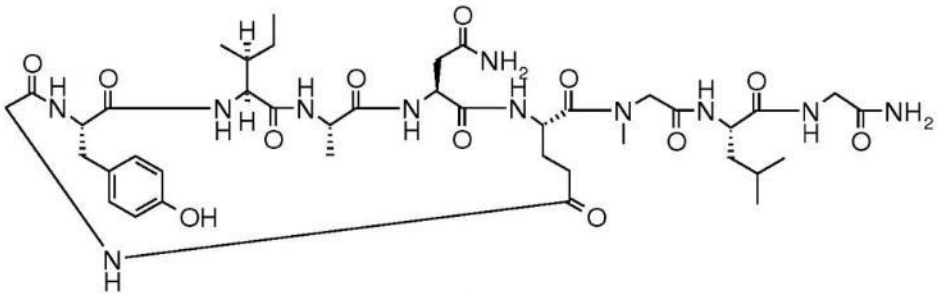


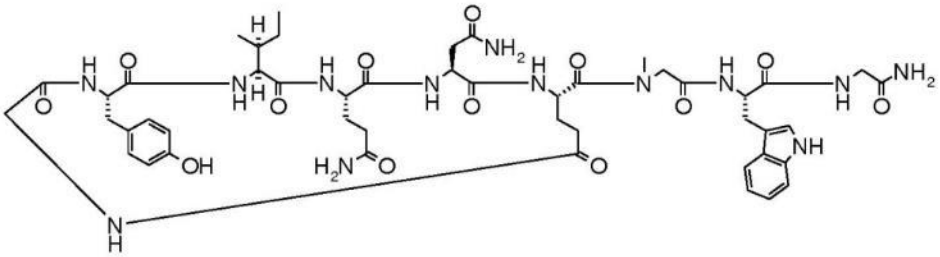


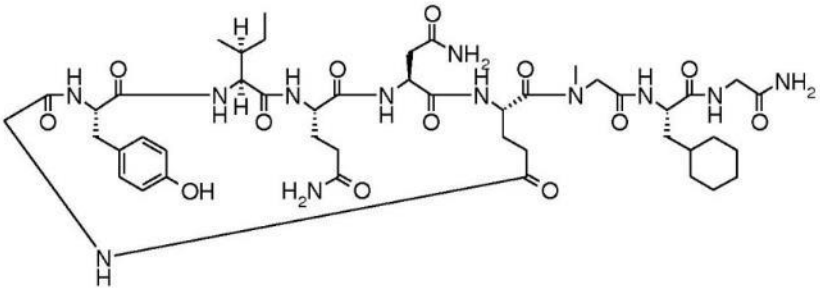


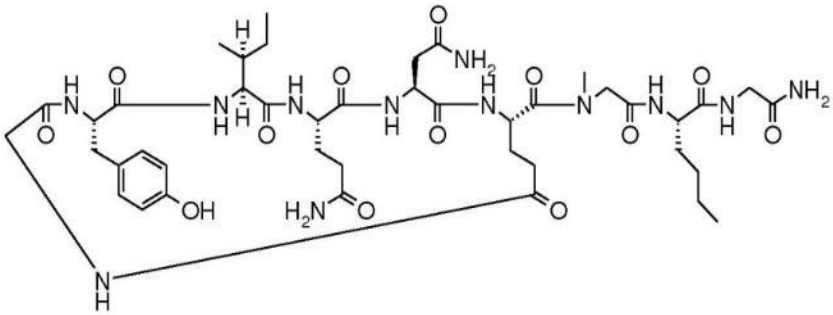


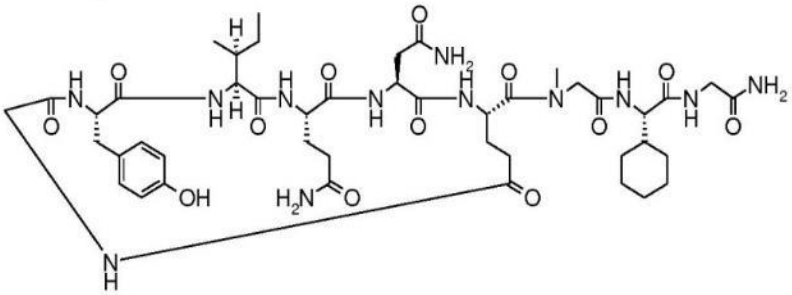


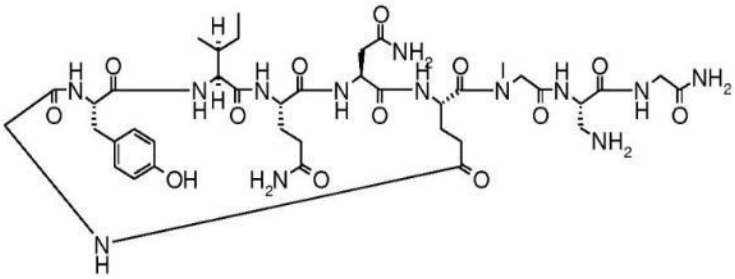


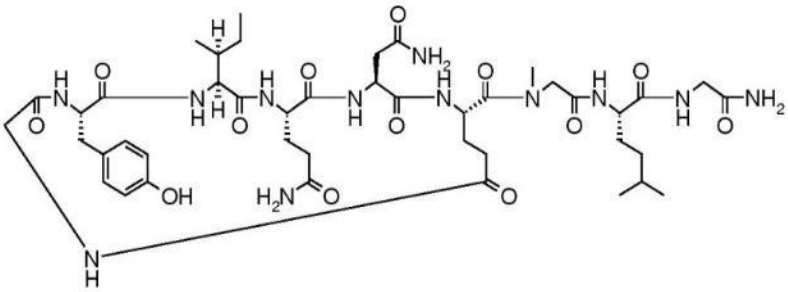


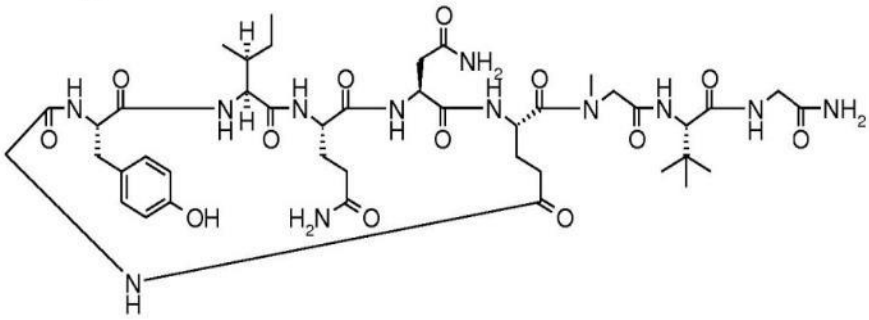


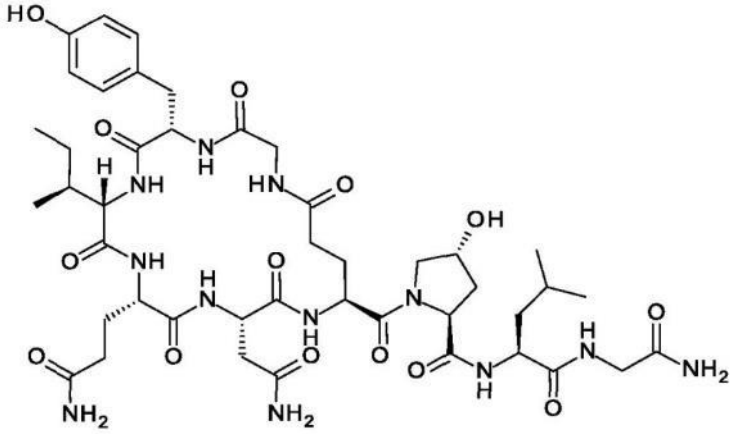


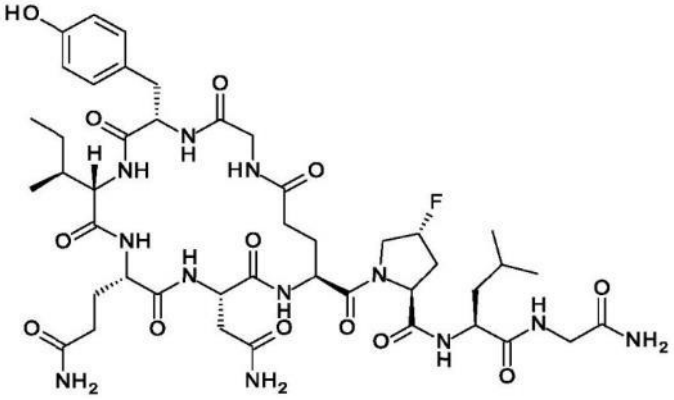


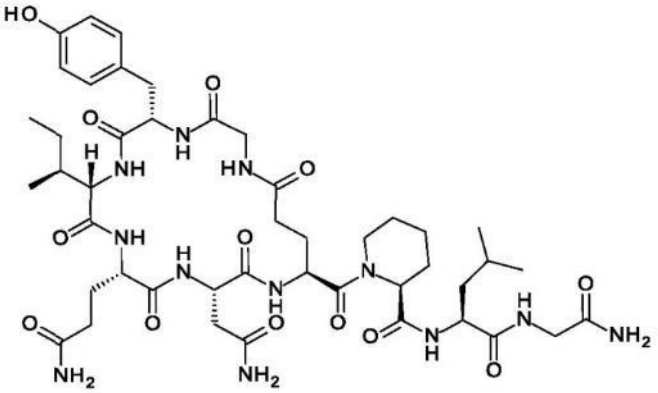


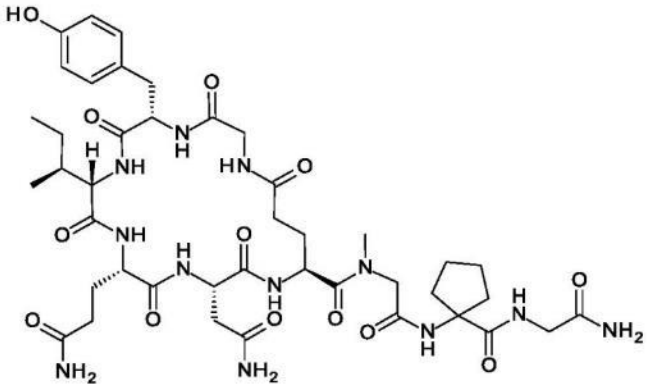


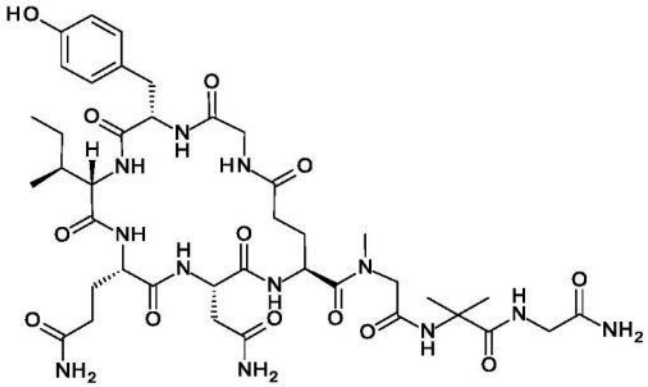


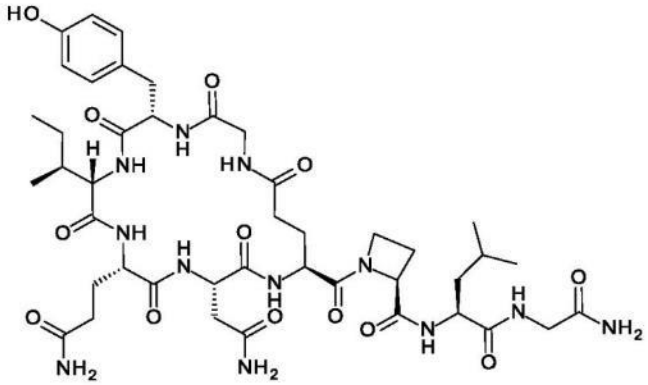


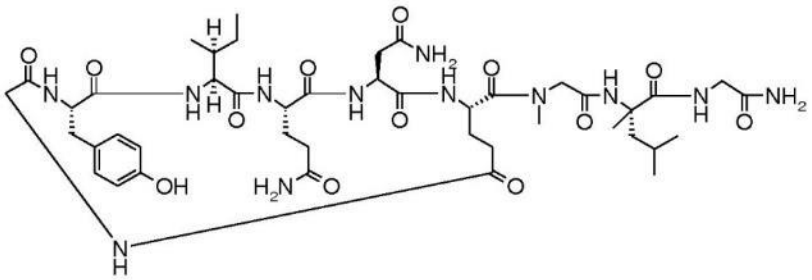


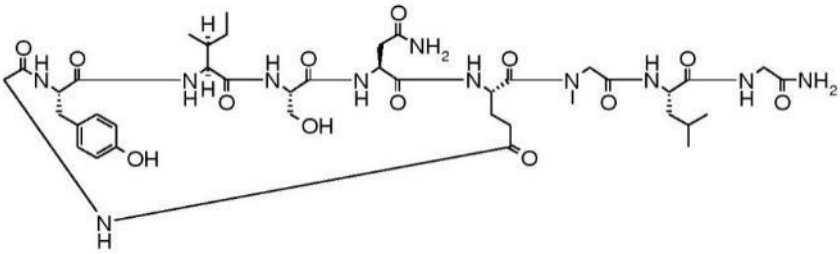


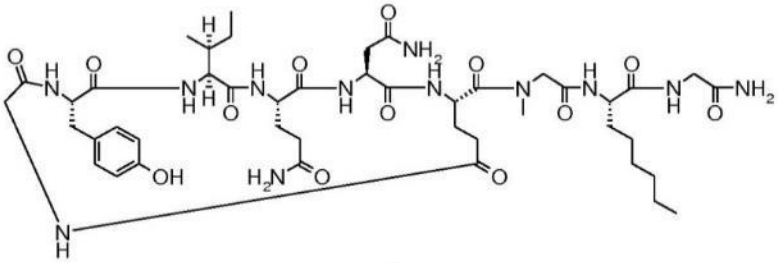


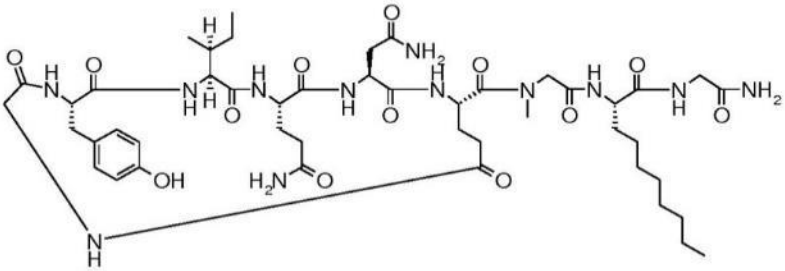




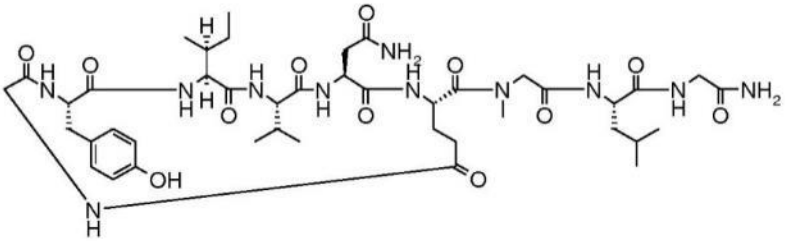








o



o a una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, a una mezcla racémica o a su correspondiente enantiómero y/o isómeros ópticos de los mismos.

Se ha descubierto que los presentes compuestos son agonistas del receptor de oxitocina, siendo dichos compuestos análogos de oxitocina que conservan la bioactividad de la oxitocina. Dichas moléculas análogas pueden actuar de una manera similar a la oxitocina endógena, incluyendo su unión al receptor de oxitocina. Los análogos de oxitocina tienen estructuras moleculares completamente nuevas.

La oxitocina es una hormona de tipo péptido cíclico de nueve aminoácidos con dos residuos de cisteína que forman un puente disulfuro entre las posiciones 1 y 6. La oxitocina humana comprende la secuencia Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly.

Los péptidos se han convertido en una clase comercialmente pertinente de fármacos que ofrecen la ventaja de una mayor especificidad y potencia y perfiles de toxicidad más bajos frente a los tradicionales fármacos de micromoléculas. Ofrecen opciones de tratamiento prometedoras para numerosas enfermedades, tales como diabetes, VIH, hepatitis, cáncer y otras, siendo cada vez más aceptados por los médicos y las patentes los medicamentos basados en péptidos. La presente invención se refiere a los agonistas peptídicos del receptor de oxitocina, que también incluyen la hormona natural oxitocina y carbetocina.

La oxitocina es un potente agente uterotónico para el control de la atonía uterina y el sangrado en exceso, usado clínicamente para inducir el parto, y ha demostrado que potencia el inicio y mantenimiento de la lactancia (Gimpl *et al*., Physiol. Rev., 81, (2001), 629-683, Ruis *et al*., BMJ, 283, (1981), 340-342). La carbetocina (1-desamino-1-carba-

2-tirosina-(O-metil)-oxitocina) también es un potente agente uterotónico usado clínicamente para el control de la atonía uterina y el sangrado en exceso.

Los agonistas peptídicos de oxitocina se pueden usar para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi, que es un trastorno genético infrecuente que afecta a un niño de cada 25.000.

La investigación adicional indica que los agonistas de oxitocina son útiles para el tratamiento de la inflamación y el dolor, incluyendo dolor abdominal y de espalda (Yang, Spine, 19, 1994, 867-71), disfunción sexual tanto en hombres (Lidberg *et al*., Pharmakopsychiat., 10, 1977, 21-25) como en mujeres (Anderson-Hunt, *et al*., BMJ, 309, 1994, 929), síndrome del intestino irritable (IBS, Louvel *et al*., Gut, 39, 1996, 741-47), estreñimiento y obstrucción digestiva (Ohlsson *et al*., Neurogastroenterol Motil., 17, 2005, 697-704), autismo (Hollander *et al*., Neuropsychopharm., 28, 2008, 193-98), estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático (TEPT) (Pitman *et al*., Psychiatry Research, 48, 107-117), ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión (Kirsch *et al*., J. Neurosci., 25, 49,11489-93, Waldherr *et al*., PNAS, 104, 2007, 16681-84), hemorragia quirúrgica o control de la hemorragia posparto (Fujimoto *et al*., Acta Obstet. Gynecol., 85, 2006, 1310-14), inducción y mantenimiento del parto (Flamm *et al*., Obstet. Gynecol., 70, 1987, 70-12), cicatrización e infección, mastitis y expulsión de la placenta y osteoporosis. Adicionalmente, los agonistas de oxitocina pueden ser útiles para el diagnóstico tanto del cáncer como de la insuficiencia placentaria.

Además, los artículos "Intranasal Oxytocin blocks alcohol withdrawal in human subjects" (Alcohol Clin Exp Res, vol, n.º 2012) y "Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction" (Hormones and Behavior, 61, 2012, 331-339) proponen tratar la abstinencia alcohólica y las toxicomanías con un agonista de oxitocina.

La oxitocina y sus receptores existen en áreas del cerebro implicadas en los síntomas de esquizofrenia, tales como el núcleo accumbens y el hipocampo. Los agonistas del receptor de oxitocina se pueden usar para el tratamiento de autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, trastornos psiquiátricos, amnesia y enfermedades metabólicas (documento WO2012/016229).

Los objetivos de la presente invención son los compuestos novedosos descritos anteriormente y el uso de estos compuestos, sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de enfermedades del SNC relacionadas con el receptor de oxitocina, siendo dichas enfermedades autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y amnesia, abstinencia alcohólica, toxicomanías y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi.

Otros objetivos son la preparación de estos compuestos novedosos y medicamentos que los contengan.

La presente invención puede proporcionar compuestos selectivos y eficaces, que proporcionen alternativas y/o mejoras en el tratamiento de determinadas enfermedades del SNC, incluyendo autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y amnesia, abstinencia alcohólica, toxicomanías y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi.

Se ha demostrado que los presentes péptidos tienen una selectividad muy buena por los receptores de vasopresina V1a y V2 como se muestra en la tabla. Esto puede tener una gran ventaja para su uso como medicamento para evitar efectos secundarios. Estos efectos fisiológicos se pueden considerar efectos secundarios indeseables en el caso de medicamentos destinados a tratar enfermedades del sistema nervioso central. Por lo tanto, es deseable obtener medicamentos que tengan selectividad por el receptor de oxitocina frente al receptor de vasopresina.

El término "sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables" abarca sales con ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico y similares.

Se puede llevar a cabo la preparación de los compuestos de la presente invención en vías de síntesis secuenciales o convergentes. Las habilidades requeridas para llevar a cabo la reacción y purificación de los productos resultantes se conocen por los expertos en la técnica.

Los compuestos en el presente documento se sintetizaron mediante procedimientos estándar en química de péptidos en fase sólida utilizando tanto metodología con Fmoc como con Boc. Las reacciones llevadas a cabo manualmente se realizaron a temperatura ambiente, mientras que la síntesis de péptidos asistida por microondas se realizó a temperatura elevada.

Descripción de la síntesis general:

Los péptidos lineales se sintetizaron manualmente o bien usando tecnología de microondas por medio de los protocolos de síntesis en fase sólida del estado de la técnica (química con Fmoc) como se hace referencia, por ejemplo, en: Kates y Albericio, eds., "Solid Phase Synthesis: A practical guide", Marcel Decker, Nueva York, Basel,

2000. Como soporte sólido se usó una resina TentaGel-S-RAM (0,24 meq/g). Todos los Fmoc-aminoácidos se añadieron en un exceso de 10 veces después de la activación con HOBT/HBTU 1:1 (0,5 mol/l en DMF) y 4 eq. de DIPEA (2 mol/l en NMP). La escisión de Fmoc se logró con un 20 % de piperidina en DMF.

Escisión de alilo/aloc y ciclación de lactama:

La resina se trató manualmente con una solución de 20 eq. de fenilsilano en DCM y 0,05 eq. de tetraquis(trifenilfosfina)paladio durante 30 min a TA. Este procedimiento se repitió. La resina se lavó con una solución de ditiocarbamato de sodio al 0,5 % en DMF. Para la formación de lactamas en microesferas, se añadió, de nuevo, reactivo de activación a la resina y se agitó durante 8 h adicionales a TA. La finalización de la ciclación se verificó por medio de la prueba de ninhidrina. Los péptidos en bruto se trataron con reactivos de activación de péptidos estándar en DMF. La ciclación se supervisó por medio de HPLC.

Escisión:

Se añadió una mezcla de escisión de ácido trifluoroacético, triisopropilsilano y agua (95/2,5/2,5) a la resina y se agitó durante 1 h a TA. El péptido escindido se precipitó en éter frío (-18 °C). El péptido se centrifugó y el residuo se lavó dos veces con éter frío. El residuo se disolvió en agua/acetonitrilo y se liofilizó.

Purificación:

Los péptidos se purificaron usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) usando una columna Reprospher 100 C18-T (100 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 u) como fase estacionaria y agua/acetonitrilo como eluyente (gradiente de MeCN al 1-50 % durante 30 min). Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante CL/EM. Las muestras de productos puros se combinaron y se liofilizaron. Todos los péptidos se obtuvieron como polvos blancos con una pureza de un >85 %. La identificación del producto se obtuvo por medio de espectrometría de masas.

Todos los aminoácidos estándar se adquirieron de CEM. Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-DAP(aloc)-OH, Fmoc-DAB(aloc)-OH y Fmoc-SAR-OH se adquirieron de Bachem. Fmoc-β-homoprolina se adquirió de Chem-Impax. Fmoc-β-Ala-OH y succinato de mono-tBu se adquirieron de Sigma-Aldrich

La descripción detallada para la síntesis del ejemplo 6 se proporciona para ilustrar adicionalmente las condiciones de síntesis:

Síntesis de péptidos:

El péptido se sintetizó usando la tecnología de microondas de CEM con tiempos de acoplamiento de 5 minutos por aminoácido a temperatura elevada (78 ºC) y una escala de 0,25 mmol. La síntesis se lleva a cabo usando la resina TentalGel-S RAM como soporte sólido (0,24 meq/g). Todos los aminoácidos usados se disolvieron en DMF a una concentración de 0,2 mol. Se usó una mezcla de HOBT/HBTU 1:1 (0,5 mol/l) de 4 eq. y DIPEA de 4 eq. para activar los aminoácidos. La escisión de Fmoc se logró con piperidina en DMF (20 %) durante 3 min. La escisión de Fmoc se repitió.

Escisión de aloc y alilo:

La resina se trató manualmente con una solución de 20 eq. de fenilsilano y 0,05 eq. de tetraquis(trifenilfosfina)paladio en DCM (5 ml) durante 30 min a TA. Este procedimiento se repitió. La resina se lavó dos veces con una solución de ditiocarbamato de sodio al 0,5 % en DMF. La etapa de lavado se repitió con DCM.

Ciclación en microesferas:

De nuevo, se añadió reactivo de acoplamiento (4 ml de una solución 0,5 mol/l de HOBT/HBTU (1:1) y 1 ml de DIPEA (4 eq.) en DMF a la resina. La suspensión se agitó durante aproximadamente 8 h a TA. La resina se lavó dos veces con DMF y DCM. La finalización de la ciclación se verificó por medio de la prueba de ninhidrina.

Escisión de la resina:

Se añadieron 10 ml de la mezcla de escisión (TFA; TIS; agua (95/2,5/2,5)) a la resina y se agitó durante 1 h a TA. El péptido escindido se precipitó en éter frío (-18 °C). El péptido se centrifugó y los precipitados se lavaron dos veces con éter frío. El precipitado se disolvió en H_2O/acetonitrilo y se liofilizó para proporcionar 210 mg de polvo blanco.

Purificación:

El péptido en bruto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna Reprospher 100 C18-T (100 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 um). Como sistema eluyente se usó una mezcla de TFA al 0,1 %/agua/acetonitrilo con un

gradiente de acetonitrilo al 0-50 % en 0-30 min. Las fracciones se recogieron y se examinaron mediante HPLC analítica. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se liofilizaron. Se obtuvieron 7,2 mg de polvo blanco.

Todos los demás péptidos enumerados a continuación se sintetizaron en consecuencia.

Abreviaturas:

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

Gly: glicina

His(Trt): histidina protegida con tritilo

Sar: sarcosina

Glu: ácido glutámico

Asn(Trt): asparagina protegida con tritilo

Gln(Trt): glutamina protegida con tritilo

Ile: isoleucina

Tyr: tirosina

Leu: leucina

Pro: prolina

Ala: alanina

Orn: ornitina

Thr: treonina

Val: valina

Dab: ácido diaminobutírico

Dap: ácido diaminopropiónico

D-Pro: D-prolina

MeLeu: α-metil-leucina

Cha: β-ciclohexil-alanina

Nle: norleucina

Chg: ciclohexilglicina

HoLeu: homoleucina

Tle: *terc*- butil-glicina

Hyp: trans-4-hidroxi-L-prolina

FluoroPro: trans-4-fluoro-L-prolina

Hpr: homoprolina

Aib: ácido aminoisobutírico

Aze: ácido (S)-N-azetidin-2-carboxílico

Ser: serina

2AOC-OH: ácido L-aminooctanoico

2ADC-OH: ácido L-aminodecanoico

cyLeu: cicloleucina

Aloc: aliloxicarbonilo

HOBT: N-hidroxibenzotriazol

HBTU: hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio

DMF: N,N-dimetilformamida

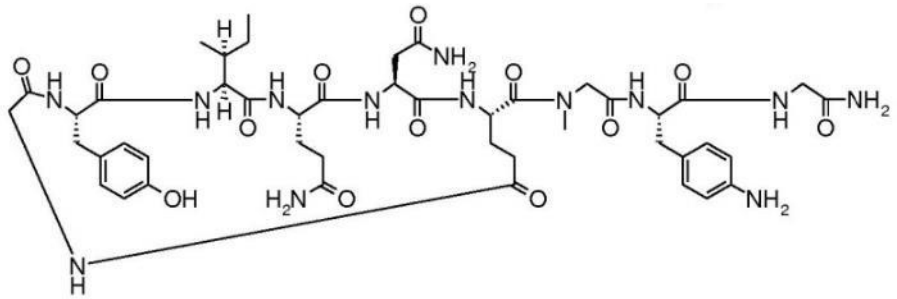
NMP: N-metilpirrolidona

DIPEA: N,N-diisopropilamina

DCM: diclorometano

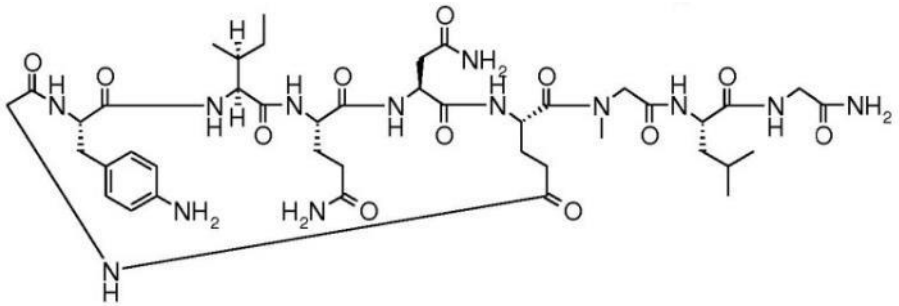
MeCN: acetonitrilo

Ejemplo 1



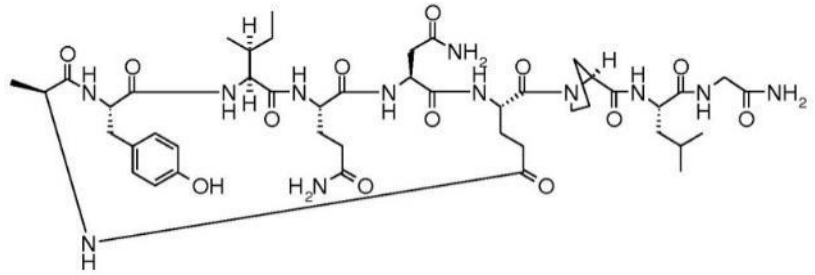
Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, FMOC-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 994,1; observada 994,9

Ejemplo 2



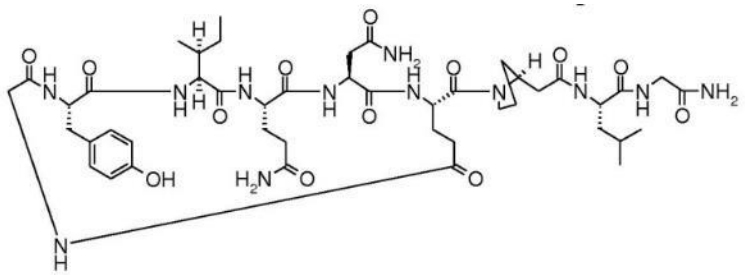
Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, FMOC-Phe(4-NHBoc)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 944,1; observada 944,4

Ejemplo 3



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, EM ($M+H^+$): esperada 985,1; observada 986,3

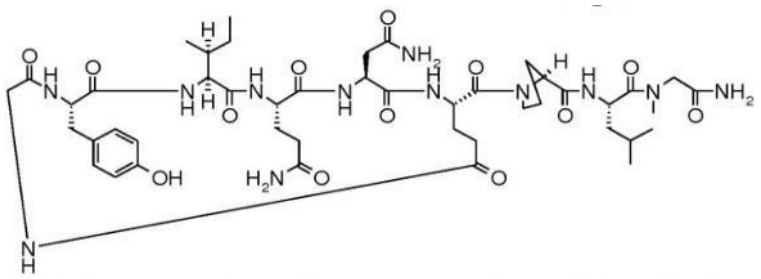
Ejemplo 4



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-β-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

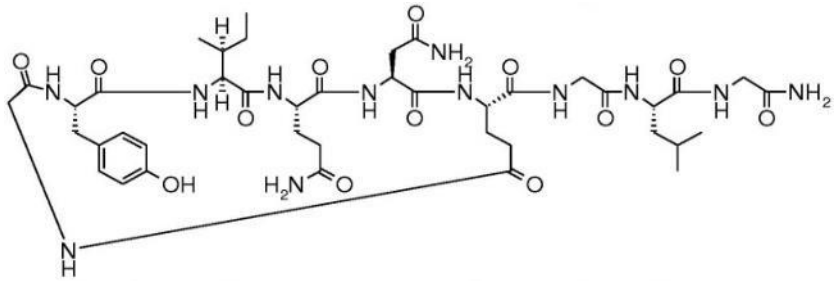
EM ($M+H^+$): esperada 984,5; observada 984,9

Ejemplo 5



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, EM ($M+H^+$): esperada 984,5; observada 984,9

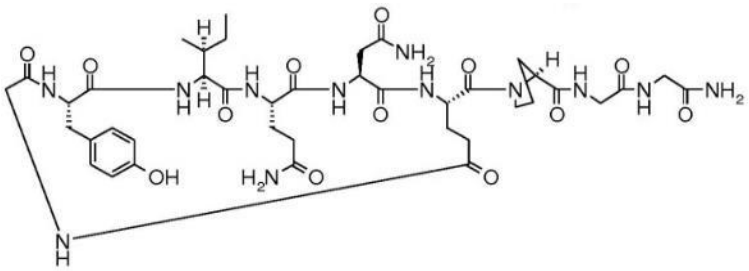
Ejemplo 6



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 931,0; observada 932,0

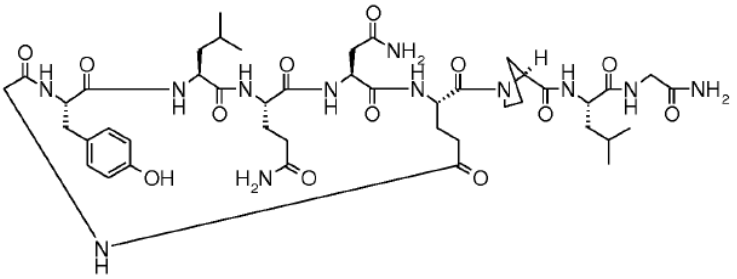
Ejemplo 7



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 914,9; observada 915,9

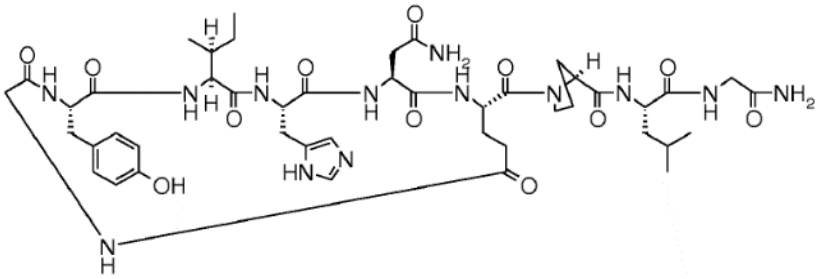
Ejemplo 8



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,5

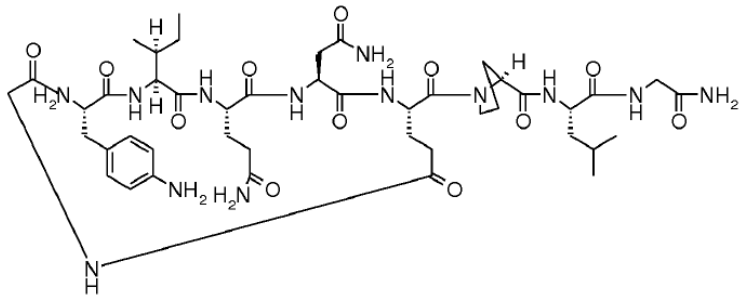
Ejemplo 9



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

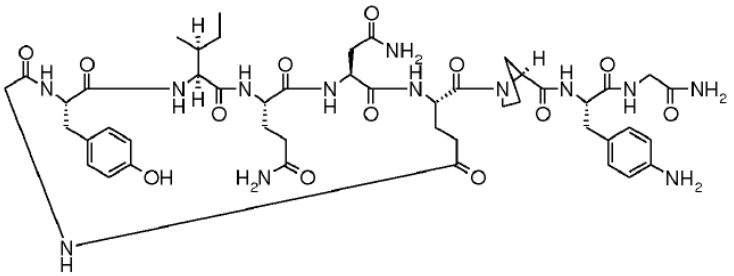
EM ($M+H^+$): esperada 980,1; observada 981,5

Ejemplo 10



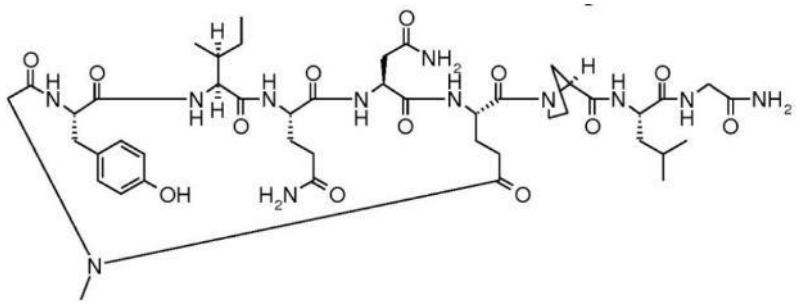
Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, FMOC-Phe(4-NHBoc)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 970,1; observada 970,8

Ejemplo 11



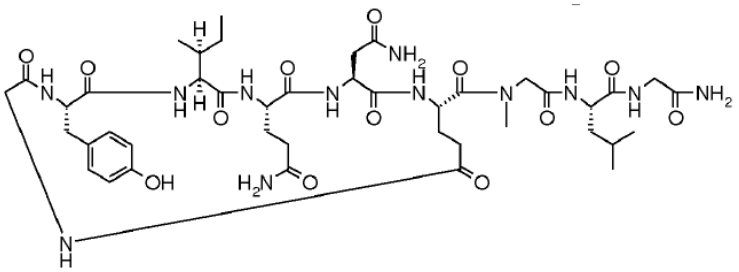
Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, FMOC-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 1020,0; observada 1021,0

Ejemplo 12



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-SAR-OH, EM ($M+H^+$): esperada 985,1; observada 985,4

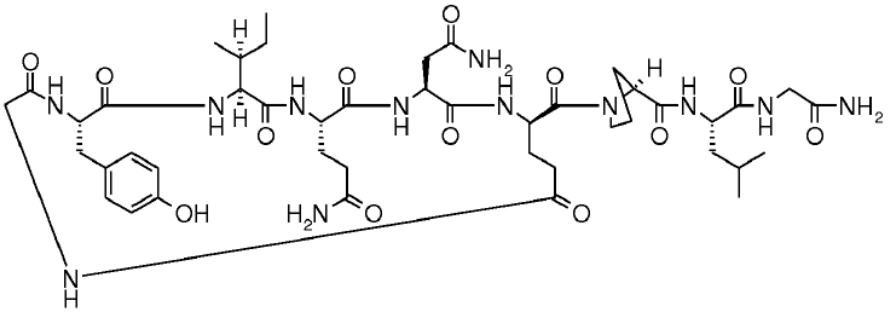
Ejemplo 13



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 945,1; observada 945,4

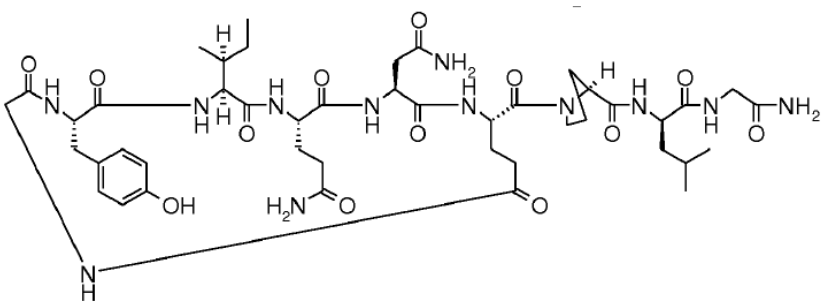
Ejemplo 14



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-D-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,5

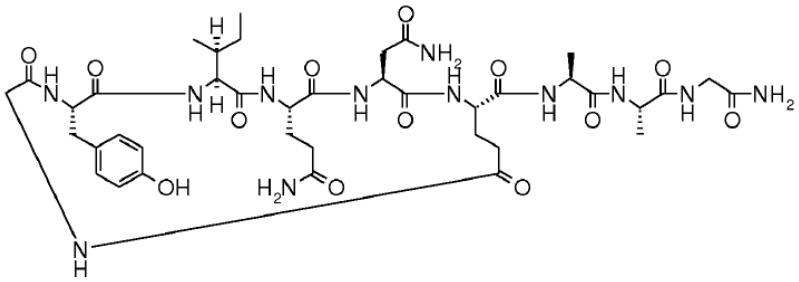
Ejemplo 15



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,3

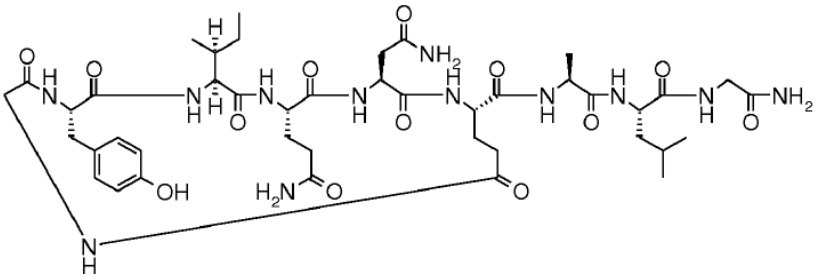
Ejemplo 16



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 902,9; observada 903,8

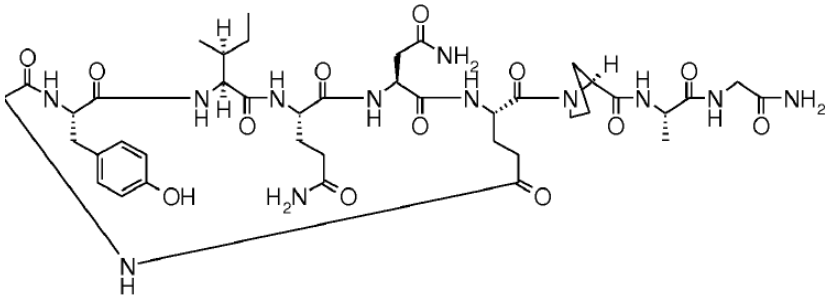
Ejemplo 17



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 944,5; observada 945,0

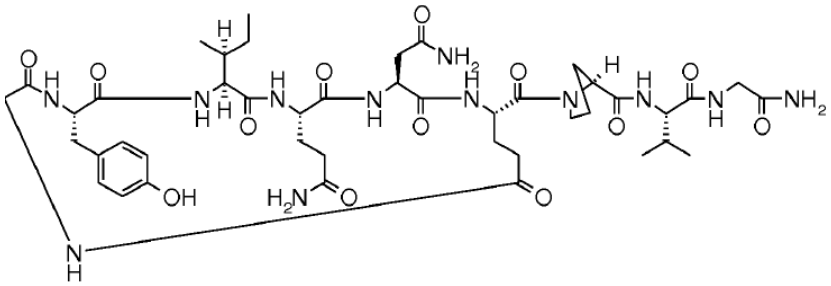
Ejemplo 18



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 928,9; observada 929,7

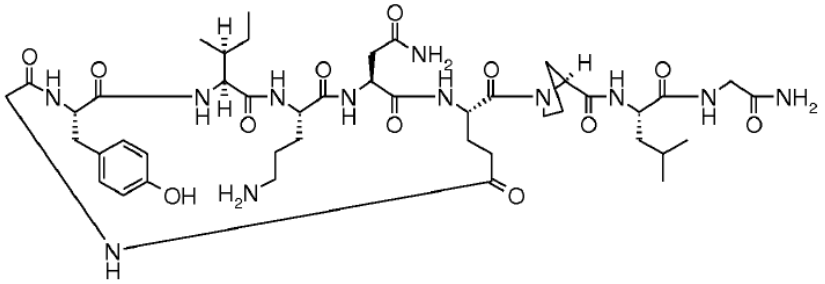
Ejemplo 19



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 957,1; observada 957,8

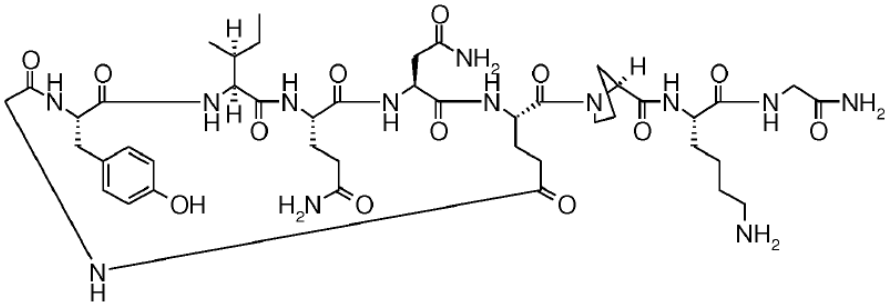
Ejemplo 20



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Om(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

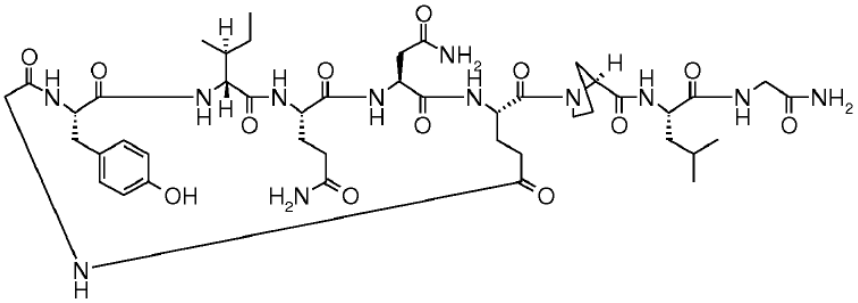
EM ($M+H^+$): esperada 957,1; observada 957,9

Ejemplo 21



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 986,1; observada 986,9

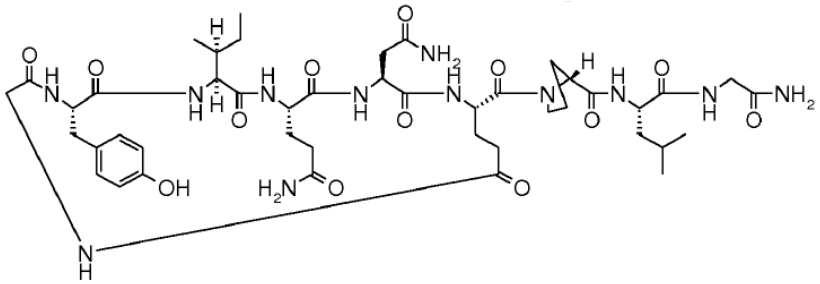
Ejemplo 22



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-D-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,5

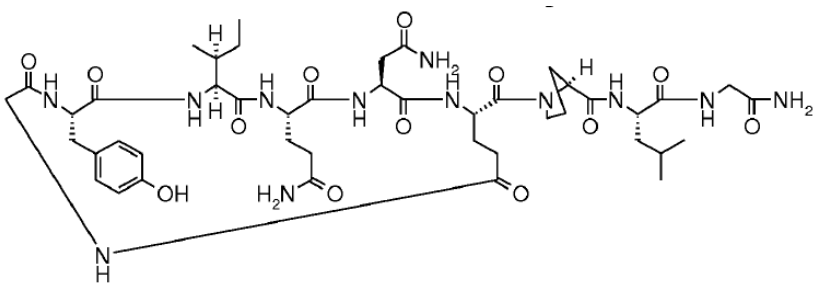
Ejemplo 23



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,5

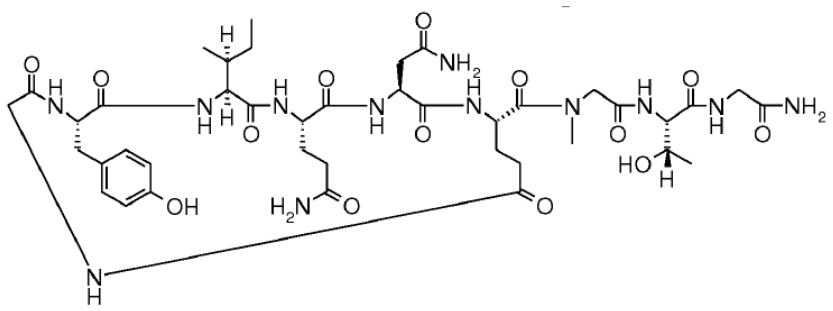
Ejemplo 24



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

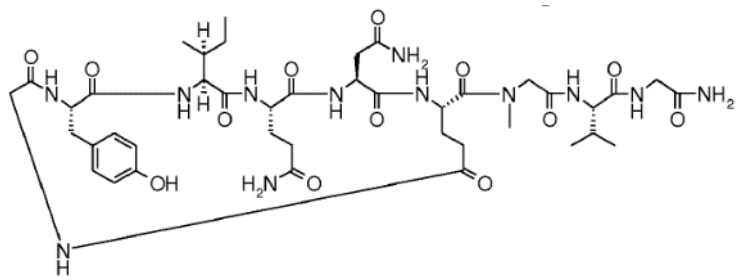
EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,8

Ejemplo 25



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 932,9; observada 933,6

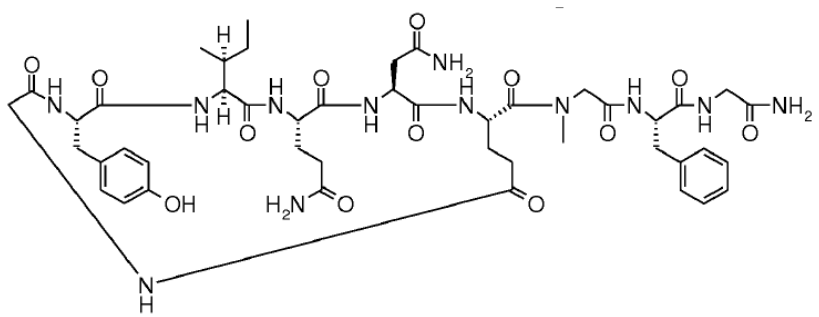
Ejemplo 26



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 931,0; observada 931,6.

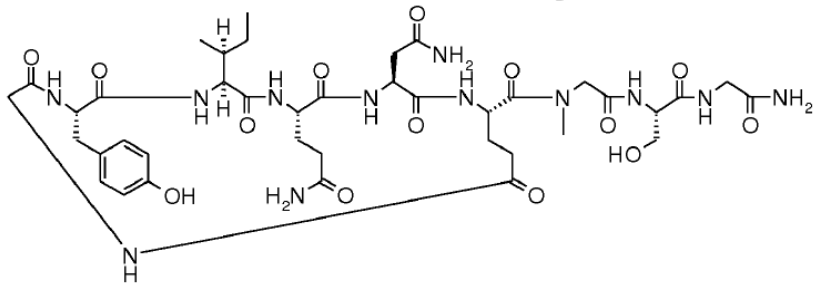
Ejemplo 27



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

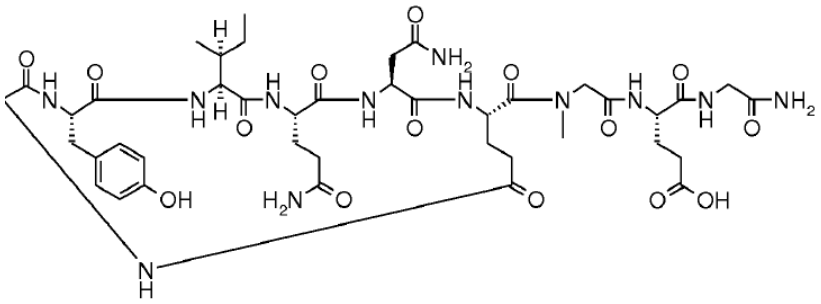
EM ($M+H^+$): esperada 979,0; observada 979,5

Ejemplo 28



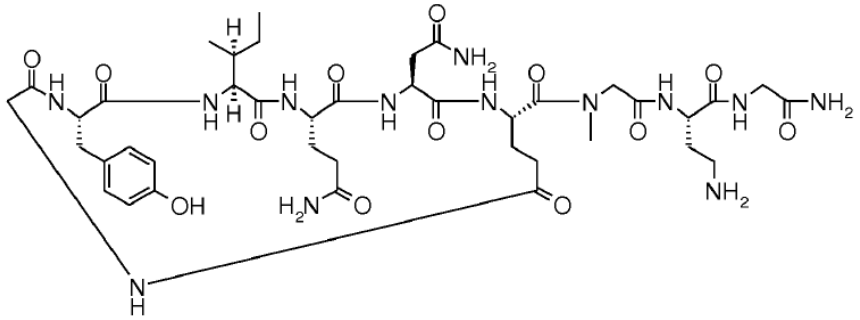
Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 918,9; observada 919,7

Ejemplo 29



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, EM ($M+H^+$): esperada 960,9; observada 962,1

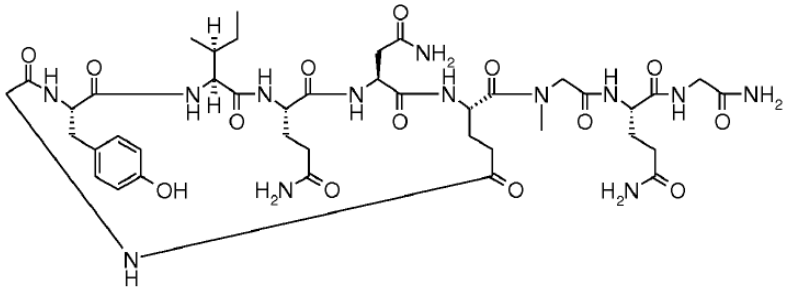
Ejemplo 30



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 932,0; observada 932,6

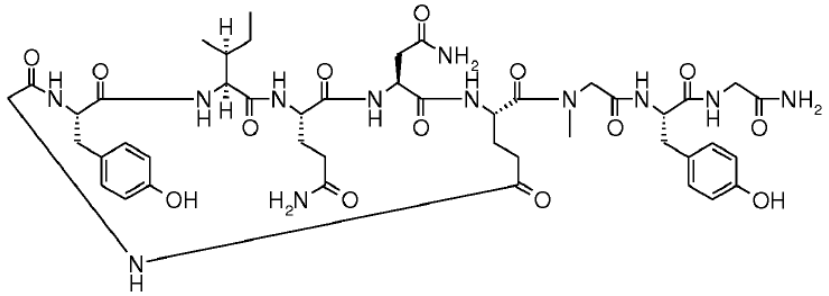
Ejemplo 31



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 960,0; observada 960,9

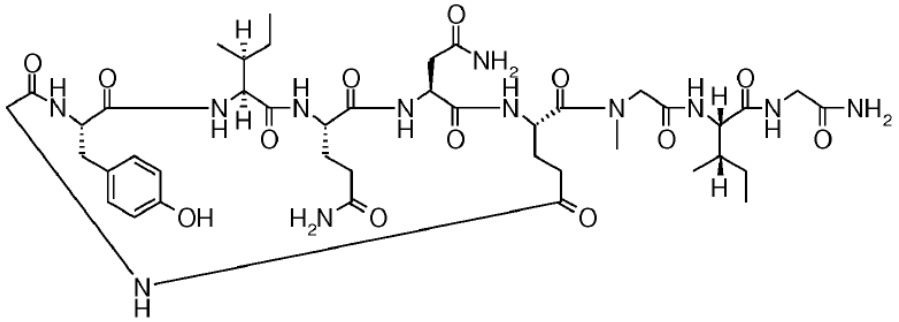
Ejemplo 32



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 995,0; observada 996,0

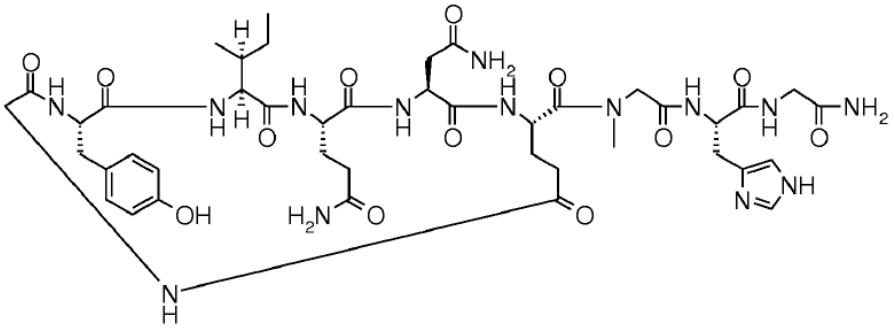
Ejemplo 33



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 945,0; observada 945,0

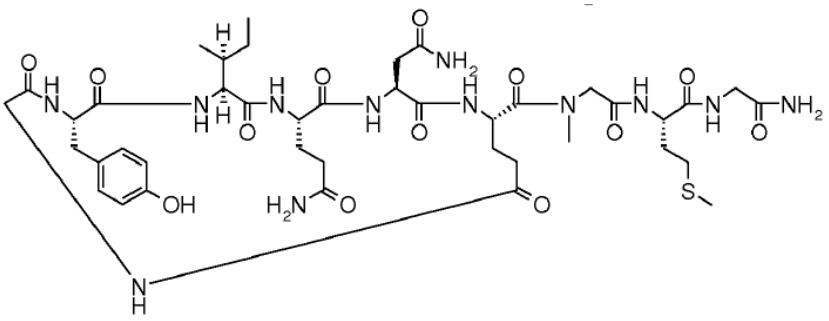
Ejemplo 34



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 969,0; observada 969,7

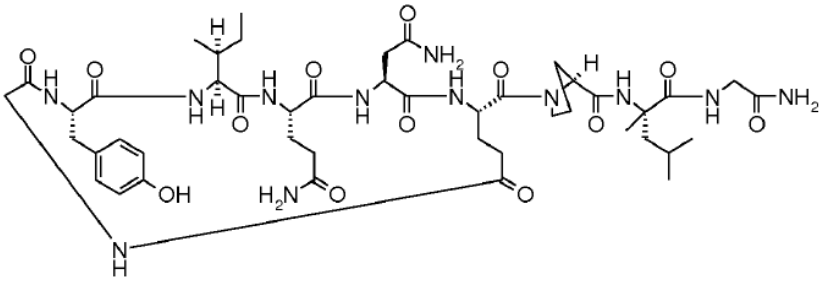
Ejemplo 35



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 995,0; observada 996,0

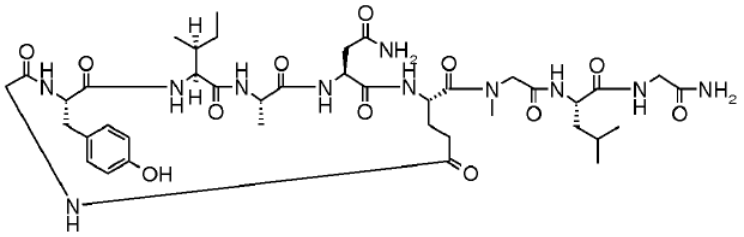
Ejemplo 36



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 955,1; observada 985,1

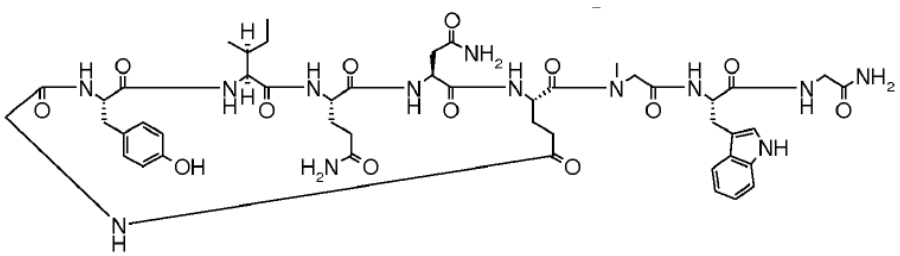
Ejemplo 37



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 888,0; observada 888,6

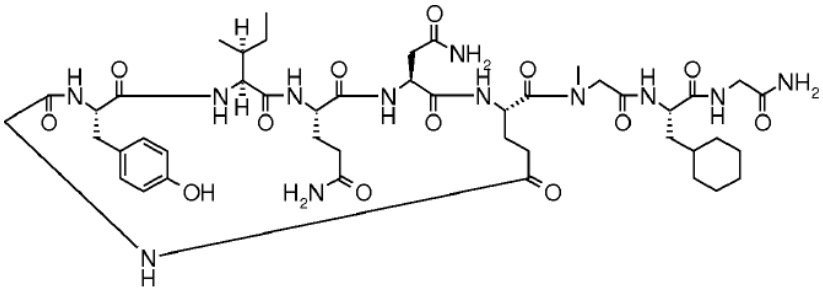
Ejemplo 38



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 1018,1; observada 1018,8

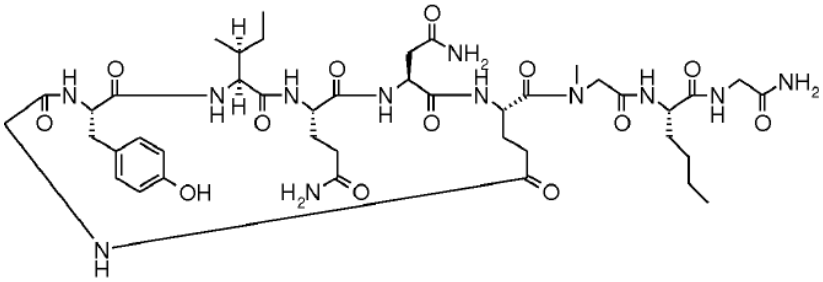
Ejemplo 39



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 985,1; observada 985,6

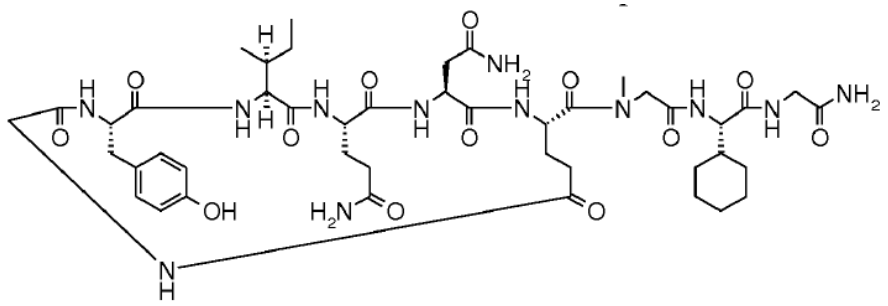
Ejemplo 40



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 945,0; observada 945,5

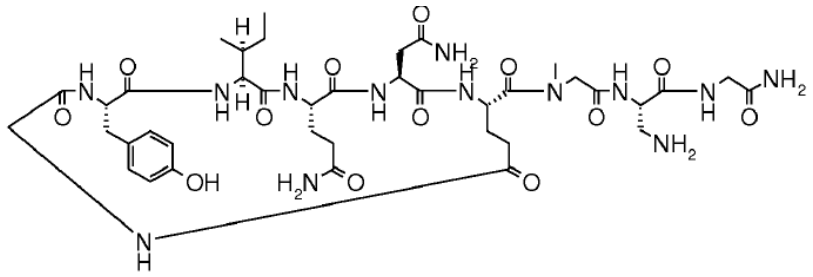
Ejemplo 41



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Chg-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 971,1; observada 971,9

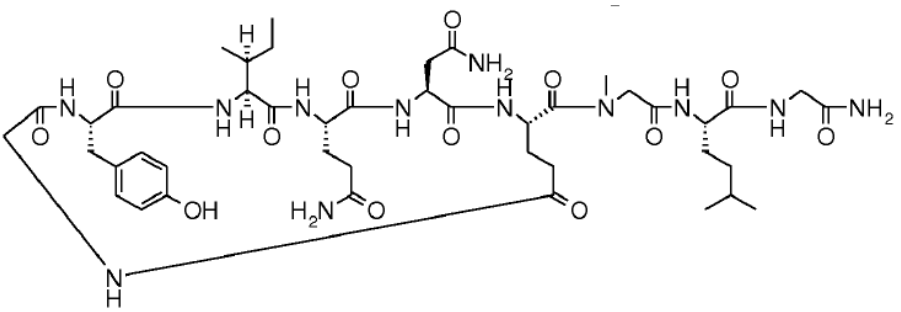
Ejemplo 42



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dap-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 918,0; observada 918,7

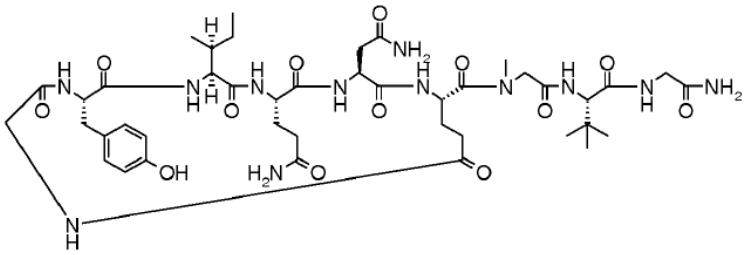
Ejemplo 43



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-HoLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 959,1; observada 959,9

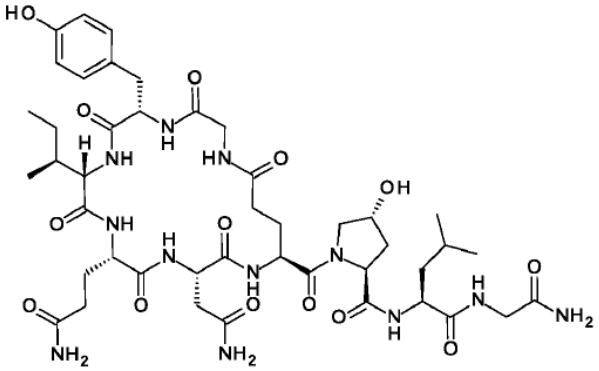
Ejemplo 44



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tle-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 945,0; observada 944,7

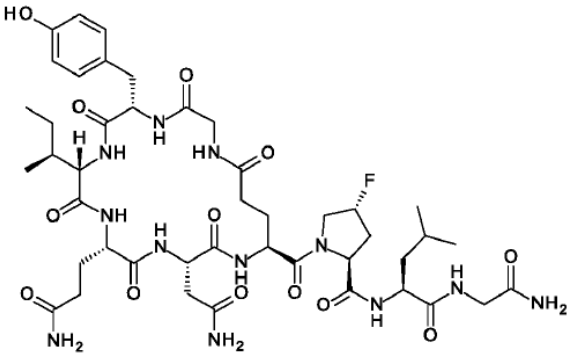
Ejemplo 45



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Hyp-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 987,1; observada 988,0

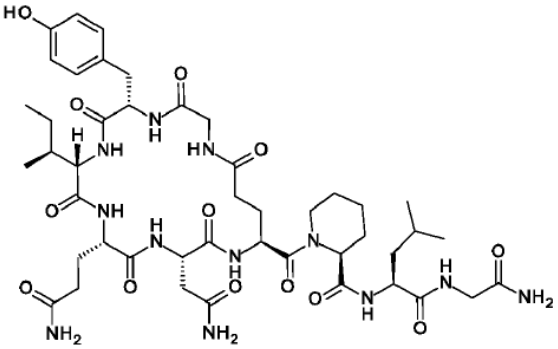
Ejemplo 46



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-FluoroPro-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 989,1; observada 989,3

Ejemplo 47

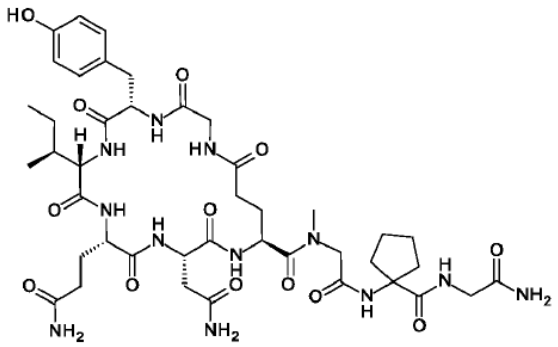


Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Hpr-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-

Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 985,1; observada 985,1

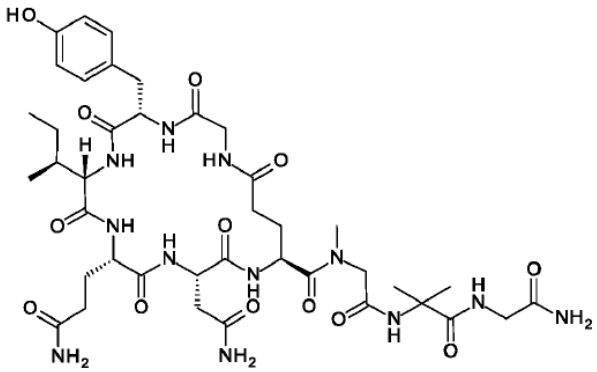
Ejemplo 48



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-cyLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 943,0; observada 943,1

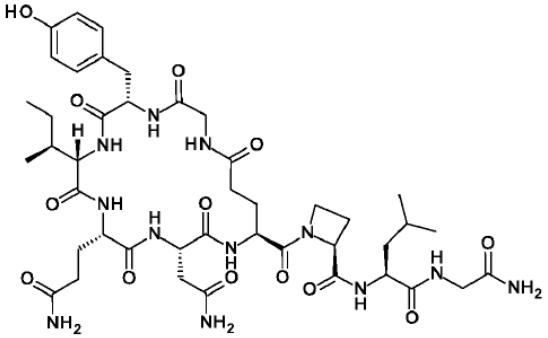
Ejemplo 49



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 917,0; observada 917,8

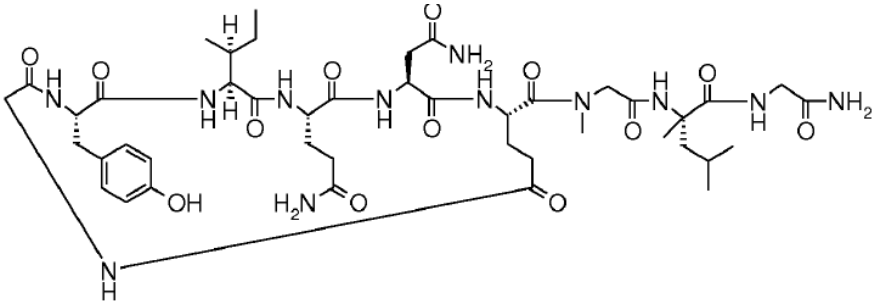
Ejemplo 50



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aze-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 957,0; observada 957,1

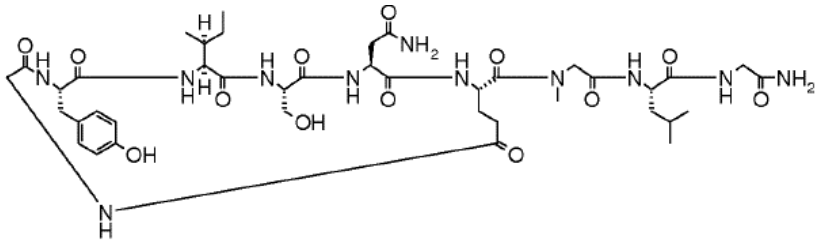
Ejemplo 51



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 959,1; observada 959,7

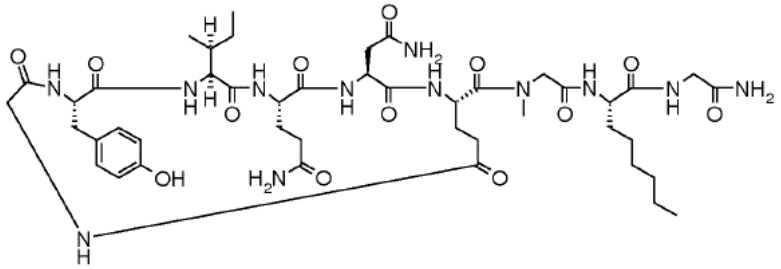
Ejemplo 52



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 903,0; observada 903,2

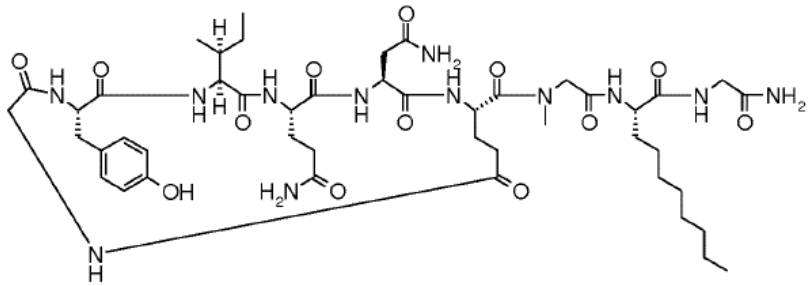
Ejemplo 53



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2AOC-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 973,0; observada 973,5

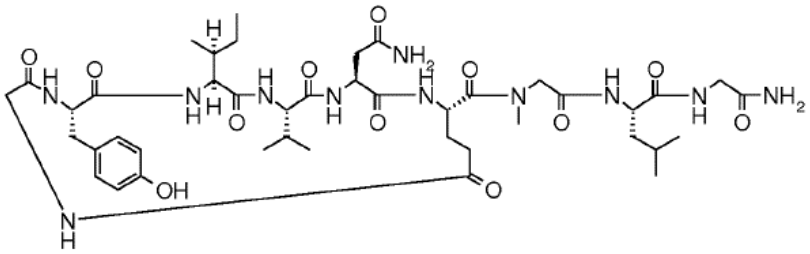
Ejemplo 54



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2ADC-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 1001,1; observada 1000,5

Ejemplo 55



Se usaron los siguientes aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(alil)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH

EM ($M+H^+$): esperada 916,0; observada 917,2

Material y procedimientos

Cultivo de células y producción de clones estables

Se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con plásmidos de expresión que codificaban el receptor V1a humano, el de oxitocina (OTR) humana o bien el V2 humano, el último en combinación con la proteína Gqs5 G quimérica para redirigir la señal al flujo de calcio. Las células estables se clonaron mediante dilución limitante para proporcionar líneas de células monoclonales que expresaban receptores V1a humano, V2 humano + Gqs5 o bien de OTR humana y se seleccionaron basándose en las respuestas funcionales detectadas en un lector de placas de formación de imágenes fluorométricas (FLIPR) que detectaba el flujo de calcio en la célula después de la activación del receptor. Las líneas de células estables se cultivaron en mezcla de nutrientes F-12 K (Kaighns Modification), que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS), penicilina-estreptomicina al 1 %, L-glutamato al 1 %, 200 ug/ml de geneticina a 37 °C en una estufa de incubación con un 10 % de CO_2 a un 95 % de humedad.

Ensayos de flujo de calcio que usan formación de imágenes fluorescentes (lector de placas de formación de imágenes fluorométricas, FLIPR)

En la tarde anterior al ensayo, las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas negras de 96 pocillos con fondos transparentes para permitir la inspección de las células y las mediciones de fluorescencia desde el fondo de cada pocillo. La densidad de las células era suficiente para proporcionar una monocapa confluente al día siguiente. Se preparó una solución salina equilibrada de Hank nueva, sin rojo de fenol, que contenía HEPES 20 mM (pH 7,3) y probenecid 2,5 mM (tampón de ensayo), para cada experimento. Las diluciones de los compuestos se prepararon usando una estación de trabajo con automatización de laboratorio Beckman Biomek 2000, en tampón de ensayo que contenía DMSO al 1 %. El tampón de carga de colorante consistía en una concentración final de Fluo-4-AM 2 µM (disuelto en DMSO y ácido plurónico) en tampón de ensayo. El medio de cultivo existente se eliminó de los pocillos y se añadieron 100 µl del tampón de carga de colorante a cada pocillo y se incubó durante aproximadamente 60 min a 37 °C en una estufa de incubación con un 5 % de CO_2 a un 95 % de humedad. Una vez cargadas con colorante, las células se lavaron exhaustivamente en un lavador de células Embla con el tampón de ensayo para eliminar cualquier colorante no incorporado. Exactamente se dejaron 100 µl de tampón de ensayo en cada pocillo.

Cada placa de 96 pocillos que contenía células cargadas con colorante se dispuso en la máquina FLIPR y se ajustó

la intensidad del láser a un nivel adecuado para detectar una fluorescencia basal baja. Para someter a prueba los compuestos como agonistas, se añadieron 25 µl de compuesto diluido a la placa 10 segundos en las mediciones fluorescentes y se registró la respuesta fluorescente durante 5 minutos. Los datos de fluorescencia se normalizaron a la dosis-respuesta del agonista endógeno al completo ajustada a un 100 % para la respuesta máxima y un 0 % para la mínima. Cada curva de concentración-respuesta del agonista se construyó usando una ecuación logística de cuatro parámetros con Microsoft Excel XLFit como sigue: Y = Mínimo + ((Máximo - Mínimo) / (1 + $10^{(LogCE50-X)nH}$)), en la que y es el % de fluorescencia normalizada, mínimo es el mínimo y, máximo es el máximo y, $logCE_{50}$ es el log_{10} de la concentración que produce un 50 % de la fluorescencia máxima inducida, x es el log_{10} de la concentración del compuesto agonista y H es la pendiente de la curva (el coeficiente de Hill). El valor máximo proporciona la eficacia del compuesto de prueba agonista en porcentaje. La concentración de agonista que produjo una respuesta semimáxima se representa mediante el valor de CE_{50}, cuyo logaritmo proporcionó el valor de pCE_{50}.

Se pueden proporcionar la siguiente CE_{50} (nM) y eficacia (%) para los péptidos específicos, junto con los datos comparativos para hV1a y hV2:

Ej.	CE_{50} (nM)/eficacia (%) para hOT	CE_{50} (nM) para hV1a	CE_{50} (nM)/eficacia (%) para hV2	Ej.	CE_{50} (nM)/eficacia (%) para hOT	CE_{50} (nM)/eficacia (%) para hV1a	CE_{50} (nM) eficacia (%) para hV2
1	10/111	>27000	4800/107	29	32/130	>10000	10682/39
2	9/112	>27000	7906/74	30	6/119	>10000	142/104
3	4/94			31	9/131	>10000	2708/91
4	31/102			32	4/119	>10000	1985/106
5	181/108			33	2/119	>27000	3821/101
6	11/95	>27000		34	10/136	>10000	145/120
7	124/87			35	3/111	>10000	1672/104
8	100/92			36	41/138		
9	118/93			37	4/137		
10	17/91	>2700		38	1/126		
11	11/94	>27000		39	0,4/122	>27000	3707/111
12	48/82			40	0,4/124	>27000	2194/117
13	0,2/111	>27000	5110/97	41	69/117		
14	250/92			42	1/119		
15	52/102	>12000		43	26/124		
16	30/105	>12000		44	0,5/117	>27000	1230/112
17	45/92	>12000		45	0,6/113	>27000	3806/91
18	24/91	>12000		46	10/104		
19	1,5/122	127/33		47	1,5/111		
20	40	>12000		48	3,6/108		
21	12/105	32/55		49	5,9/97		
22	98/116			50	3,6/99	>27000	
23	88/64			51	13/97	>27000	
24	2,2/152	>27000	2505/98	52	4,3/121		
25	3/125	>10000	3823/103	53	1,1/127		
26	2/124	>10000	2624/102	54	0,8/134		
27	5/128	>10000	1498/101	55	20/104		
28	5/122	>10000	4173/87				

Los compuestos y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos se pueden usar como medicamentos, por ejemplo, en forma de preparaciones farmacéuticas. Las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar preferentemente por vía transdérmica, intranasal, subcutánea o intravenosa (i.v.).

Transdérmica es una vía de administración en la que los ingredientes activos se administran a través de la piel para su distribución sistemática. Los ejemplos incluyen parches transdérmicos, usados para la administración de medicamentos, e implantes transdérmicos, usados con fines médicos o estéticos.

La administración nasal se puede usar para administrar fármacos para obtener efectos locales o bien sistémicos, las

pulverizaciones nasales para obtener un efecto local son bastante comunes. Los fármacos peptídicos se pueden administrar como pulverizaciones nasales para evitar la degradación del fármaco después de la administración oral.

Las inyecciones subcutáneas también son comunes para la administración de fármacos peptídicos. Una inyección intramuscular es la inyección de una sustancia directamente en el músculo. Es uno de varios procedimientos alternativos para la administración de medicinas. A menudo se usa para formas particulares de medicinas que se administran en pequeñas cantidades. Las inyecciones se deben administrar por debajo de la piel.

La vía intravenosa es la infusión de sustancias líquidas directamente en una vena. En comparación con otras vías de administración, la vía intravenosa es la forma más rápida de administrar líquidos y medicinas en el cuerpo.

Además, las preparaciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. Aún así, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

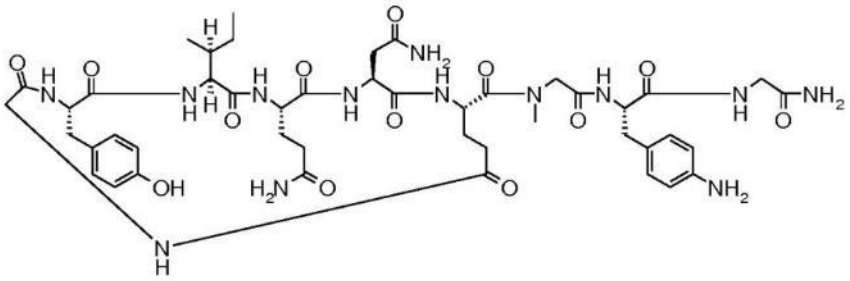
Los medicamentos que contienen un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo terapéuticamente inerte también son un objetivo de la presente invención, como lo es un procedimiento para su producción, que comprenda ofrecer uno o más compuestos y/o sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y, si se desea, una o más de otras sustancias terapéuticamente valiosas, en una forma de administración galénica junto con uno o más vehículos terapéuticamente inertes.

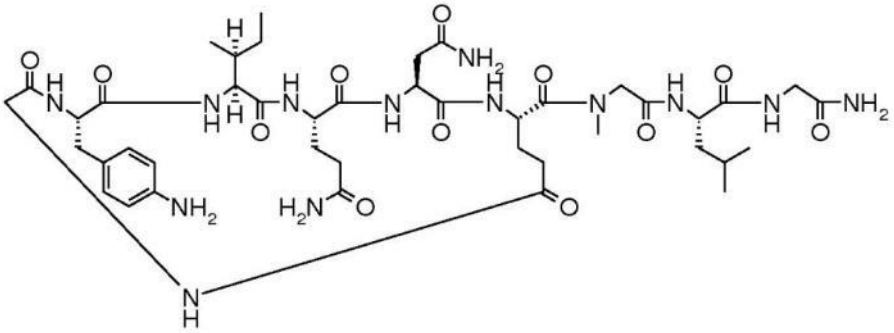
Las indicaciones más preferentes de acuerdo con la presente invención son las que incluyen trastornos del sistema nervioso central, por ejemplo, el tratamiento o la prevención de autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y amnesia, abstinencia alcohólica, toxicomanías y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi.

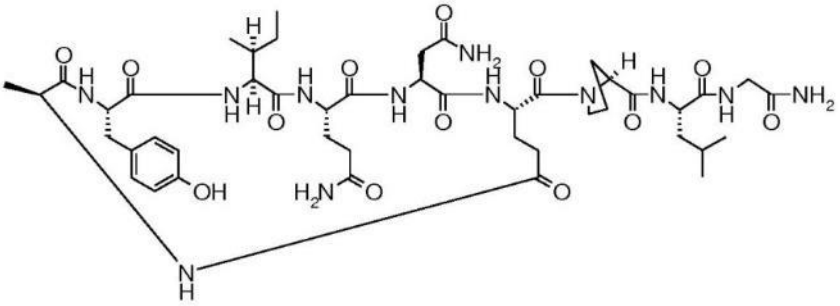
La dosificación puede variar en límites amplios y, por supuesto, se tiene que ajustar a los requisitos individuales en cada caso particular. La dosificación para adultos puede variar desde aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg por día de un compuesto o de la cantidad correspondiente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se puede administrar la dosificación diaria como una dosis única o en dosis divididas y, además, también se puede sobrepasar el límite superior cuando se considere que resulta indicado.

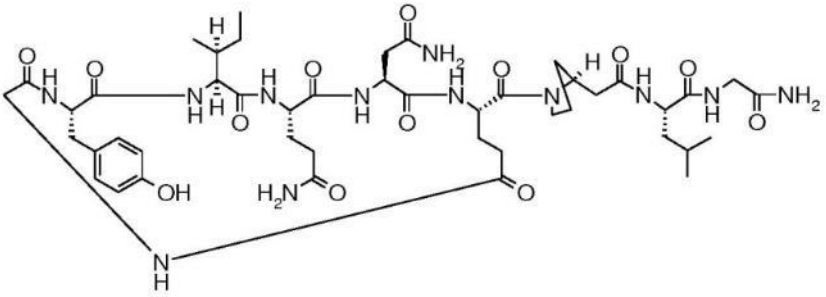
REIVINDICACIONES

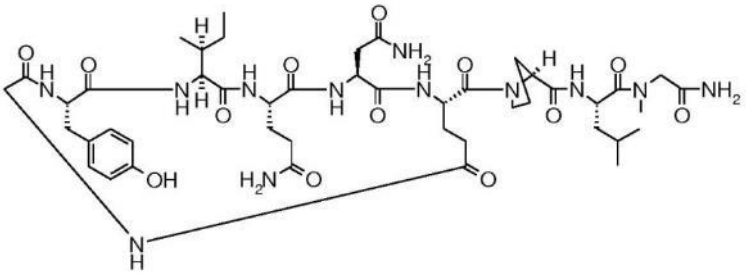
1. Un compuesto, en el que el compuesto es

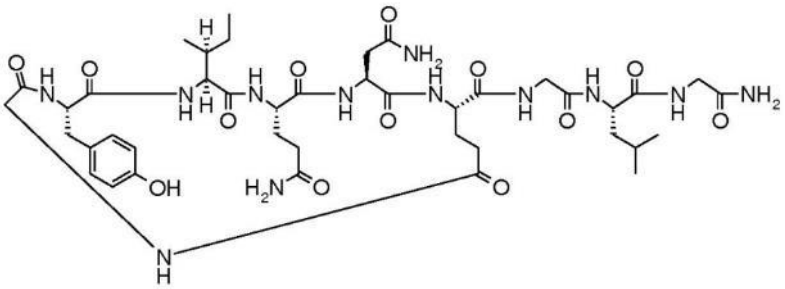


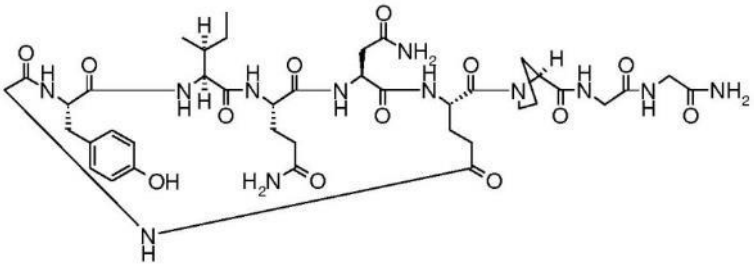


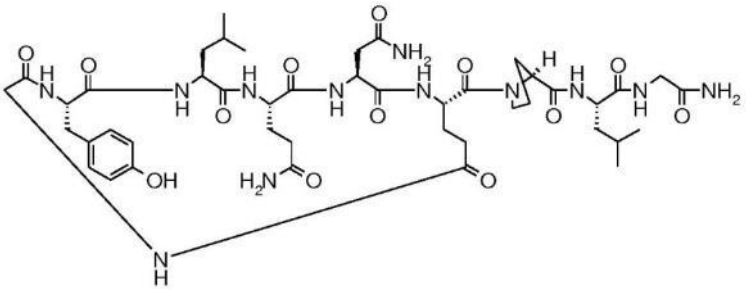


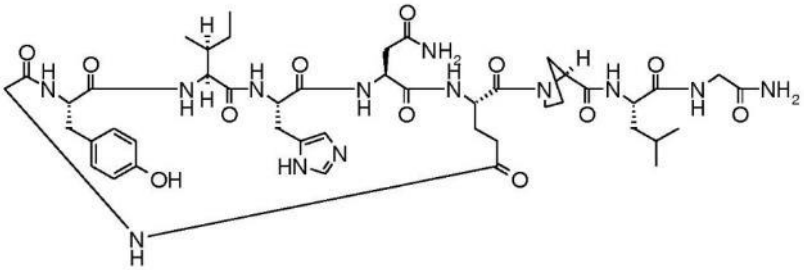


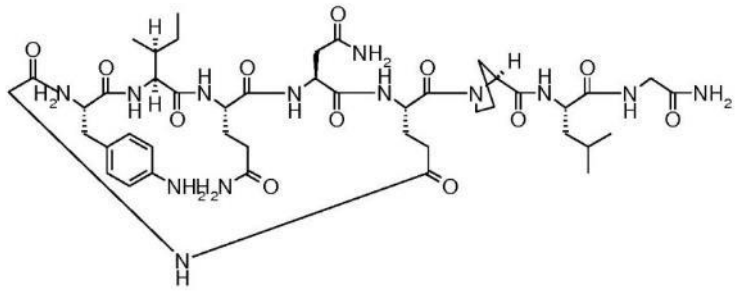


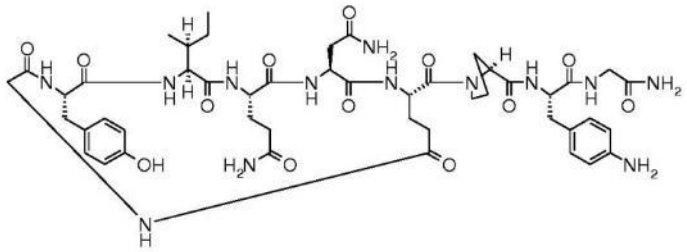


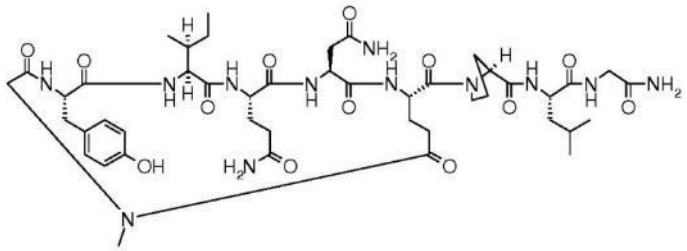


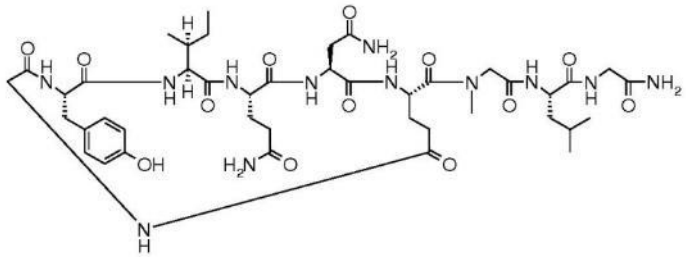


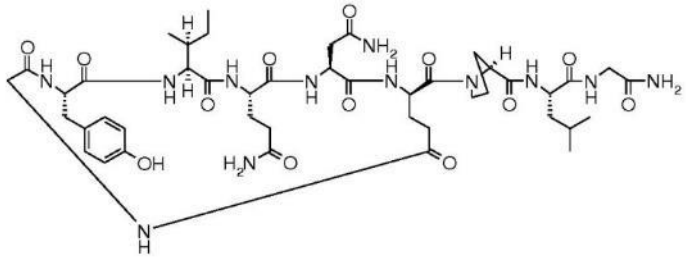


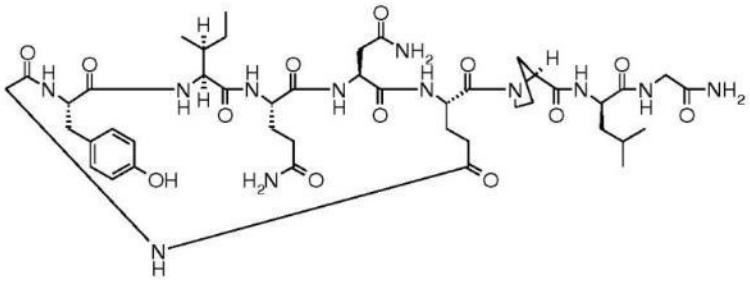


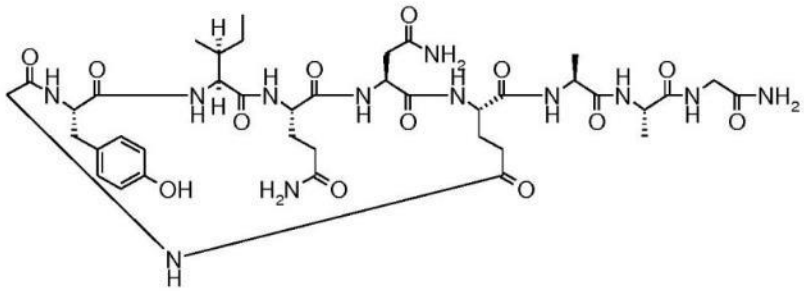


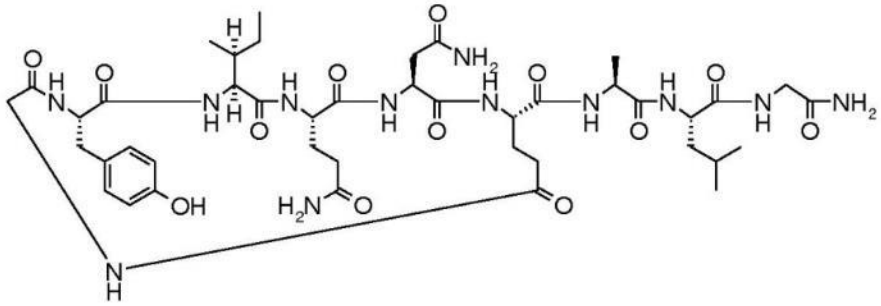


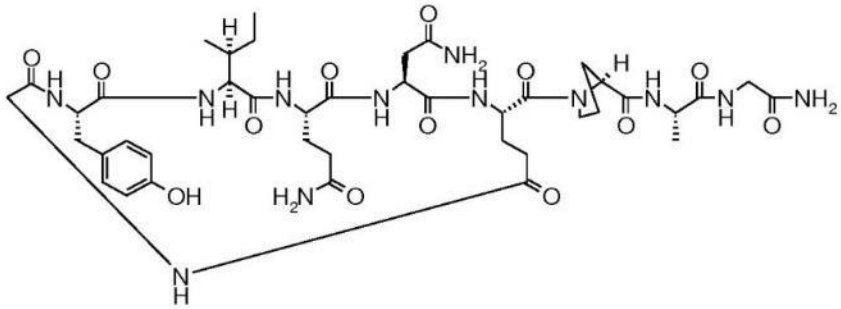


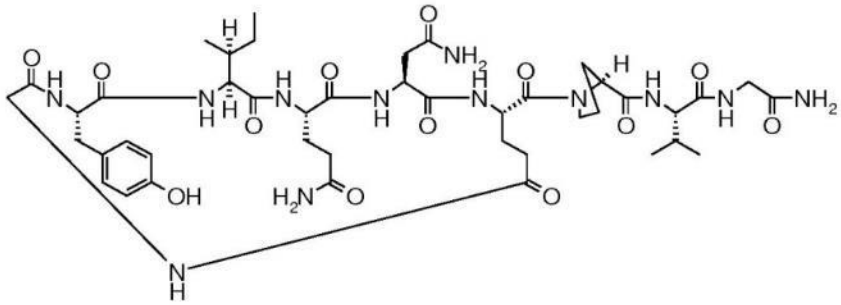


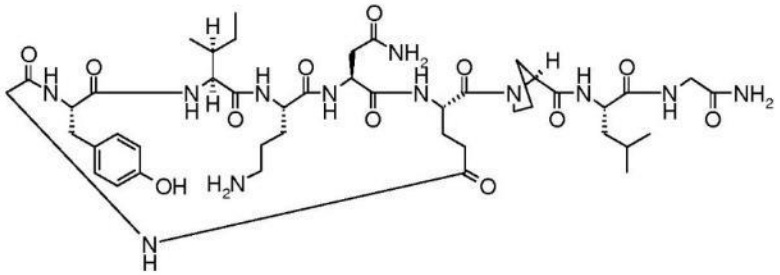


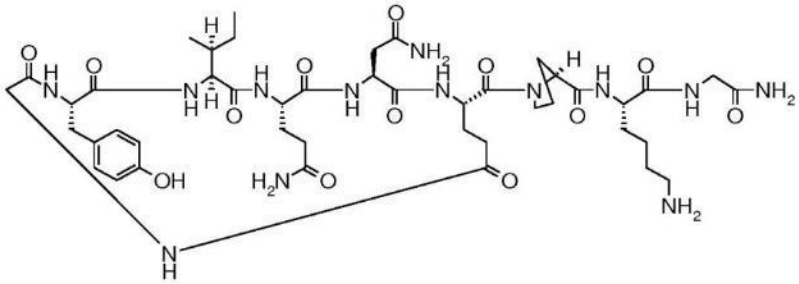


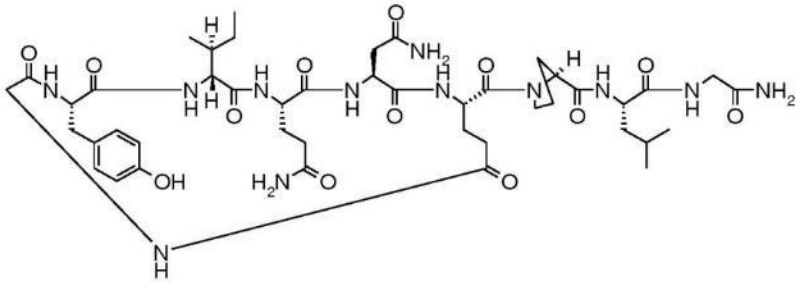


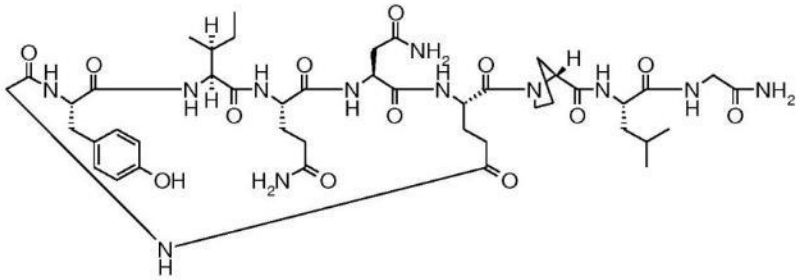


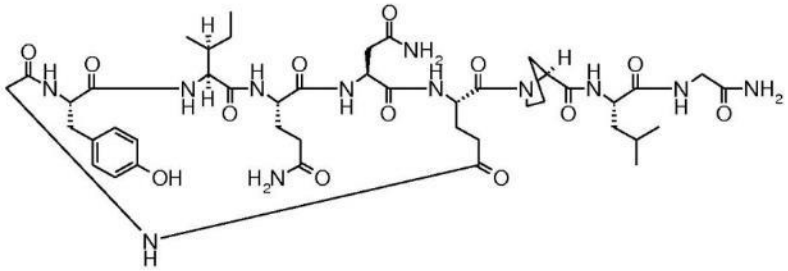


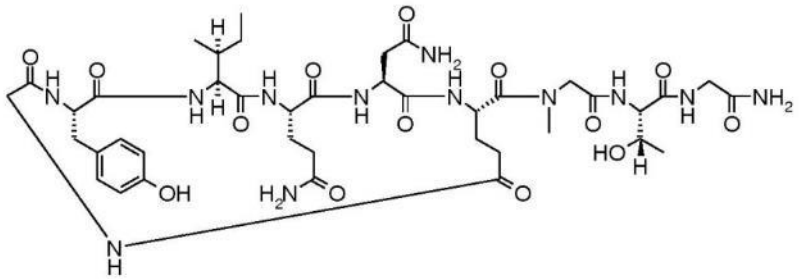


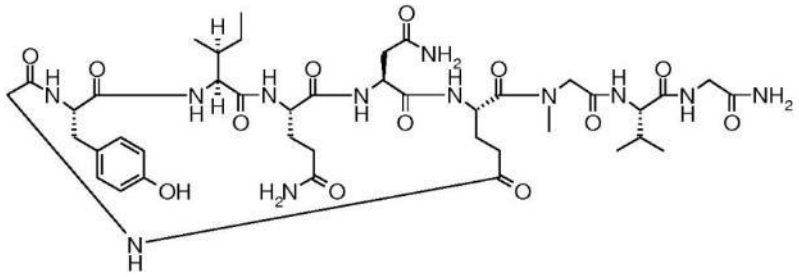


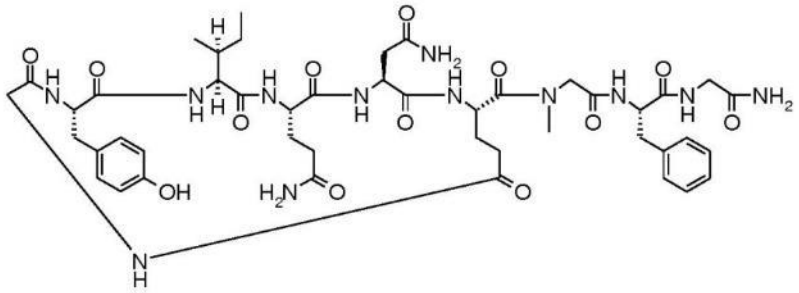


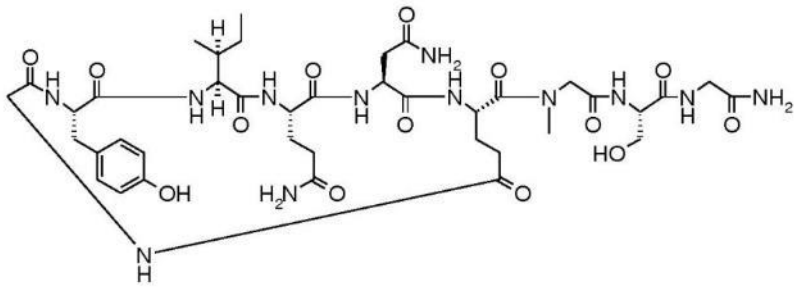


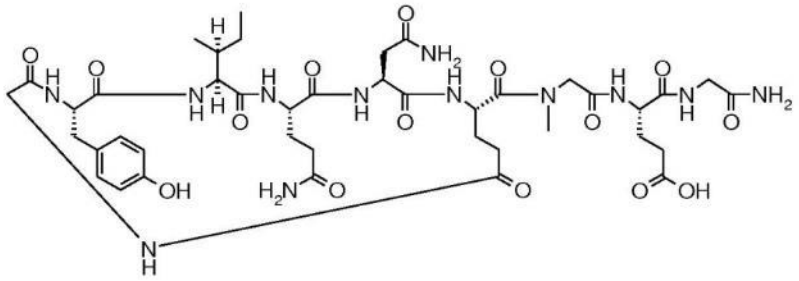


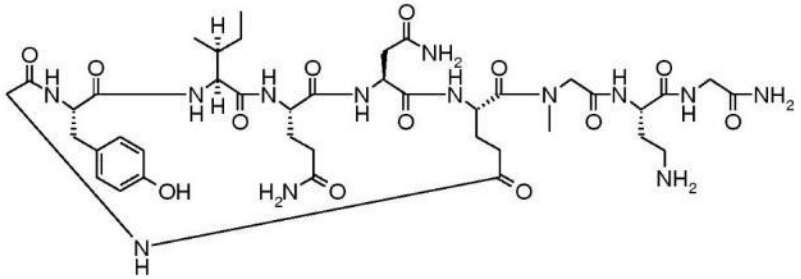


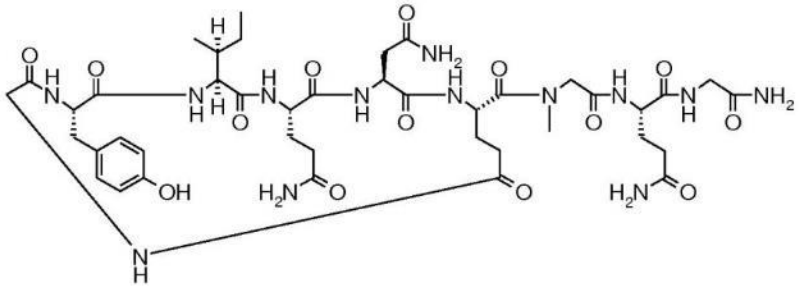


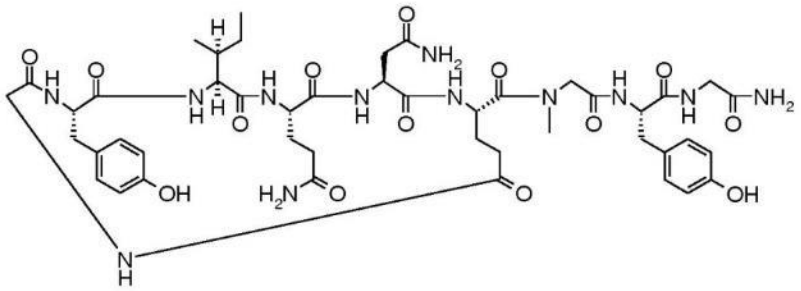


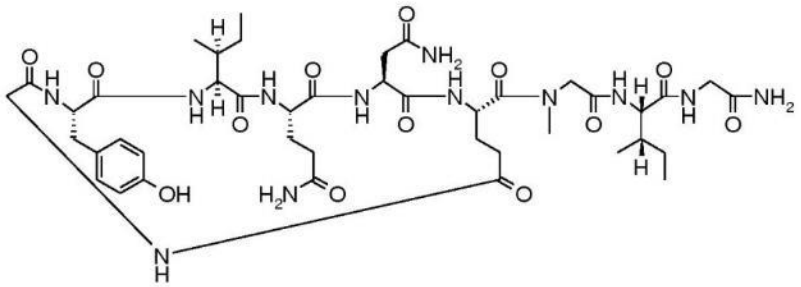


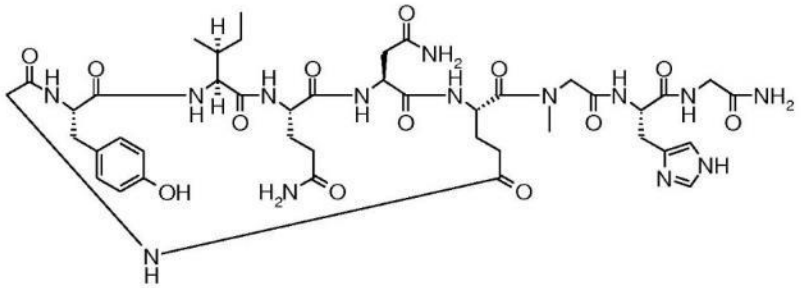


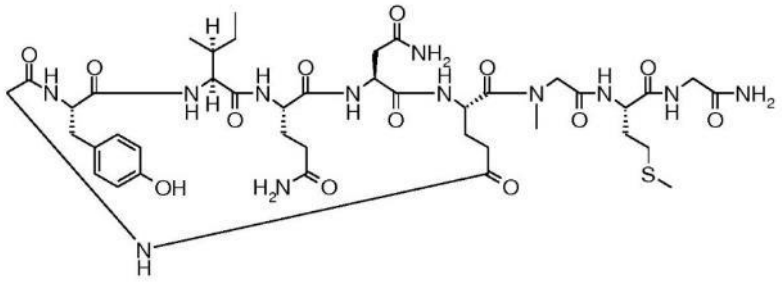


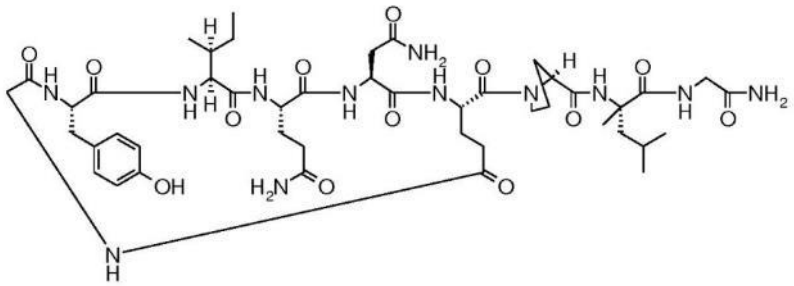


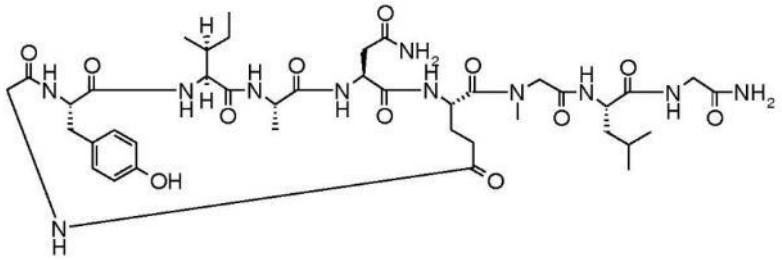


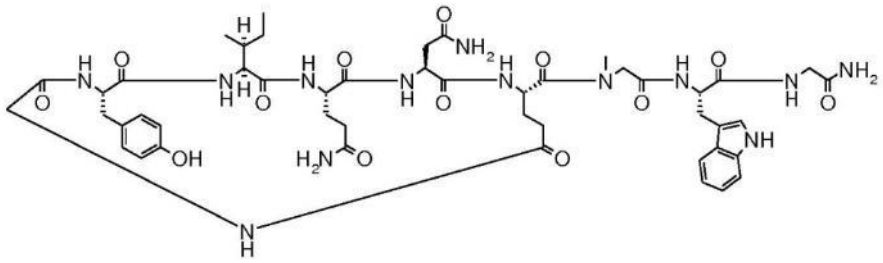


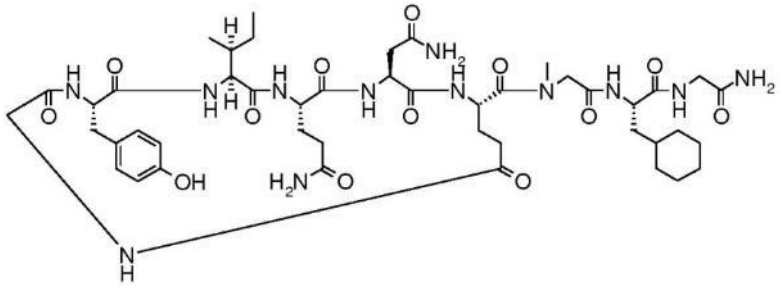


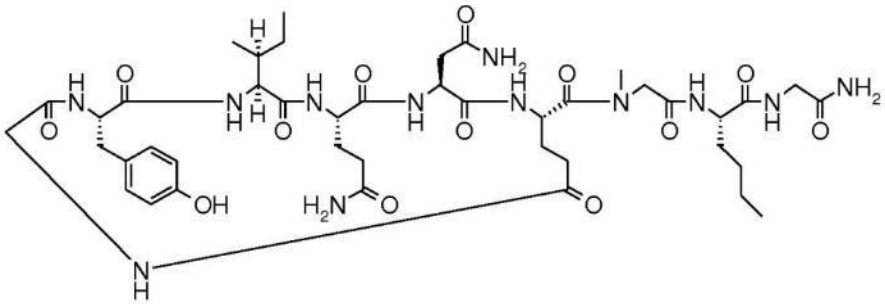


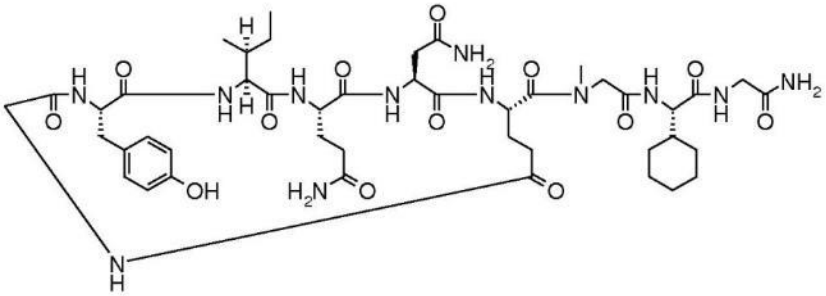


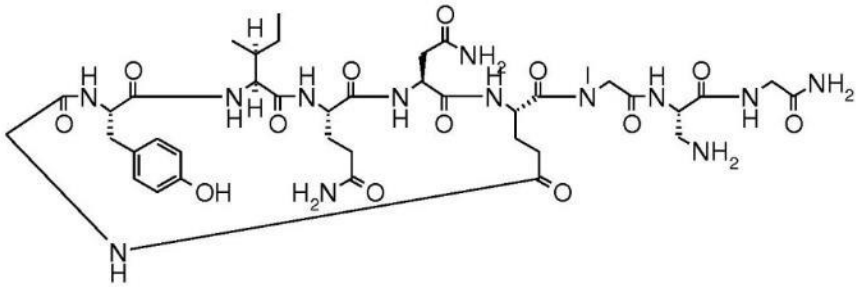


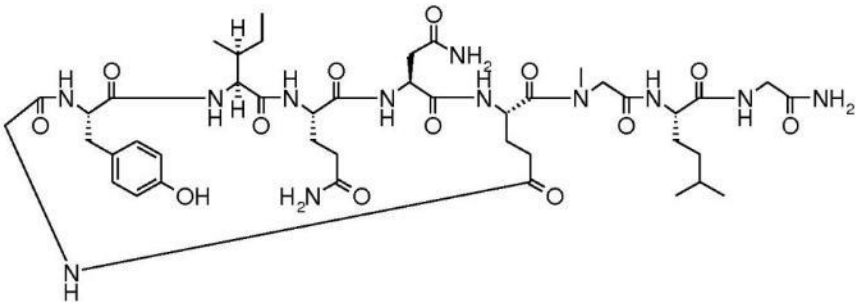


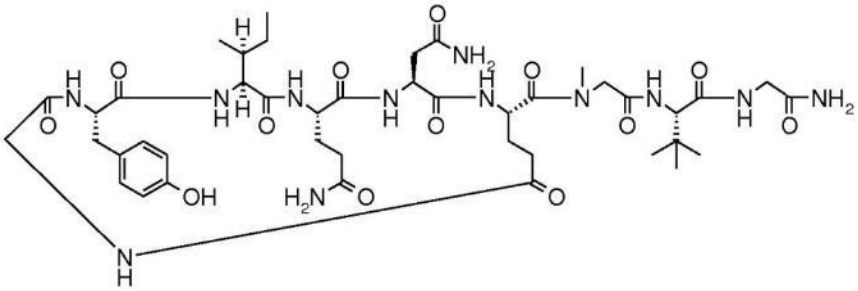


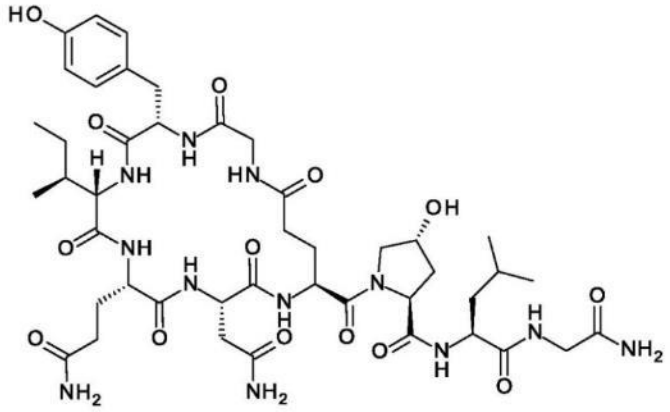


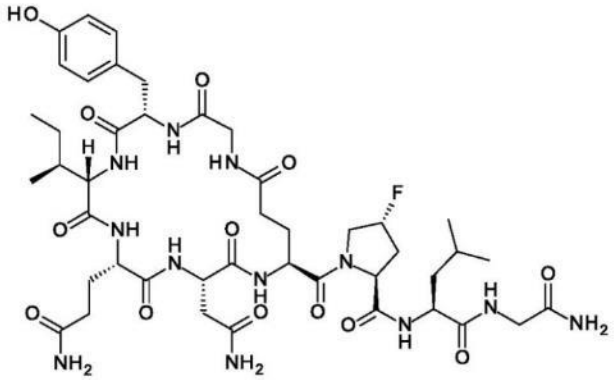


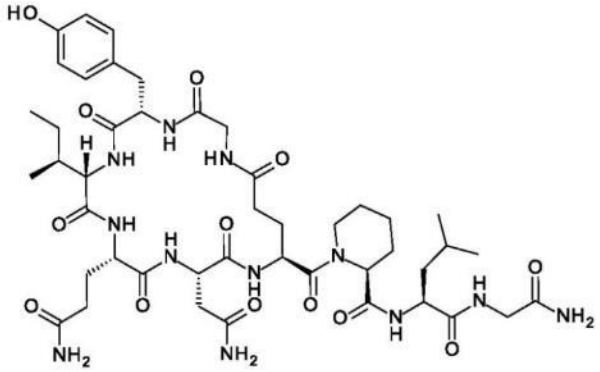


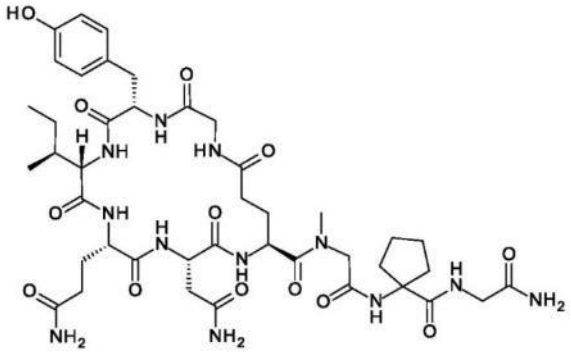


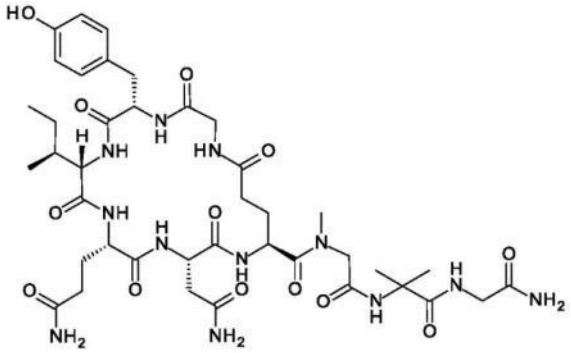


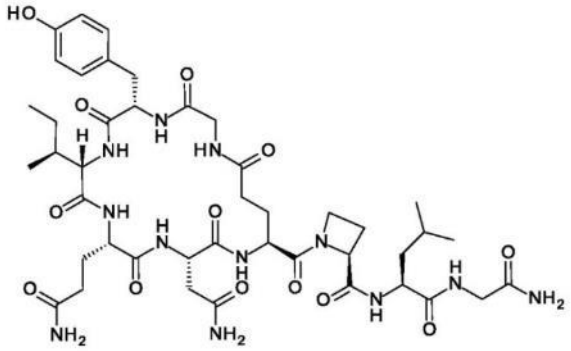


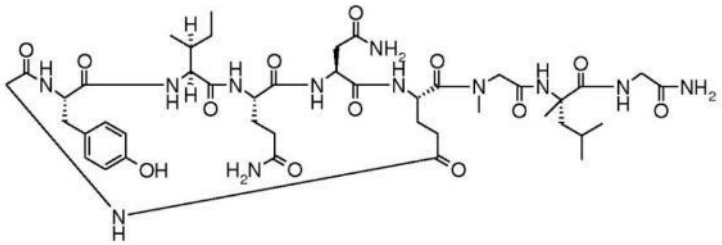


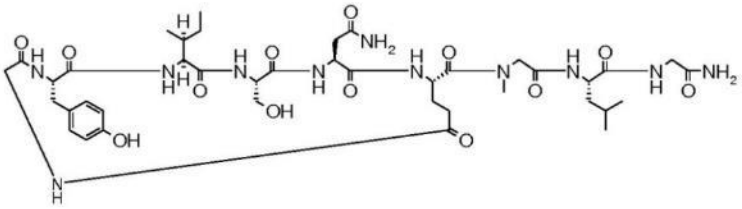


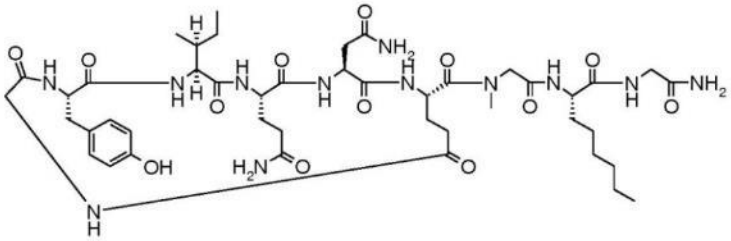


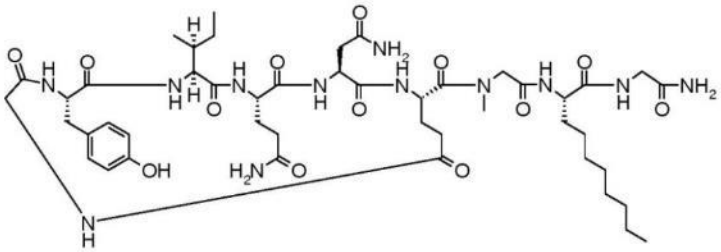


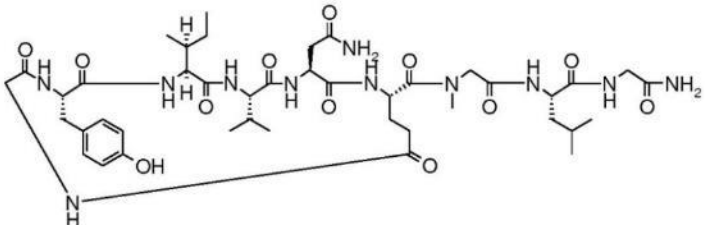












2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y amnesia, abstinencia alcohólica, toxicomanías y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como sustancia activa terapéutica.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como sustancia activa terapéutica en el tratamiento de autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés postraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y amnesia, abstinencia alcohólica, toxicomanías y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi.