

La demostración de la actividad de los compuestos de la presente invención se puede lograr a través de ensayos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención, se pueden usar los siguientes ensayos.

B-1. Ensayo celular in vitro para determinar actividad del receptor de vasopresina

- 5 La identificación de agonistas y antagonistas de los receptores de vasopresina V1a y V2 de humanos, ratas y perros, así como la cuantificación de la actividad de los compuestos de la invención se realizan usando líneas celulares recombinantes. Estas líneas celulares derivan originalmente de célula epitelial de ovario de hámster (ovario de hámster chino, CHO K1, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, EUA). Estas líneas celulares de prueba expresan constitutivamente
- 10 los receptores V1a y V2 de humano, rata o perro. En el caso de receptores V1a acoplados a $G_{\alpha q}$, las células también se transfectan de forma estable con una forma modificada de fotoproteínas sensibles a calcio aequorina (V1a de humano y rata) u obelina (V1a de perro), que, después de la reconstitución con el cofactor coelenterazina, emiten luz cuando hay aumentos en las concentraciones de calcio libre [Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T, *Nature* 358, 325-327 (1992); Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES, *Gene* 153 (2), 273-274 (1995)]. Las células del receptor
- 15 de vasopresina resultantes reaccionan con estimulación de receptores V1a expresados recombinantemente por liberación intracelular de iones de calcio, que se pueden cuantificar por la luminiscencia de fotoproteína resultante. Los receptores V2 acoplados con G_s se transfectan de forma estable en líneas celulares que expresan el gen para luciferasa de luciérnaga bajo el control de un
- 20 promotor responsable de CRE. La activación de receptores V2 induce la activación del promotor de respuesta a CRE mediante aumento de cAMP, induciendo así la expresión de luciferasa de luciérnaga. La luz emitida por fotoproteínas de líneas celulares V1a, así como la luz emitida por luciferasa de luciérnaga de líneas celulares V2 corresponden a la activación o inhibición del receptor de vasopresina correspondiente. La bioluminiscencia de las líneas celulares se detecta usando un
- 25 luminómetro adecuado [Milligan G, Marshall F, Rees S, *Trends in Pharmacological Sciences* 17, 235-237 (1996)].

Procedimiento de prueba:

Líneas celulares del receptor de vasopresina V1a:

- El día previo al ensayo, las células se colocan en medio de cultivo (DMEM/F12, 2% FCS, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES, 5 μ g/ml coelenterazina) en placas de microtitulación de 384 pocillos y
- 30 se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 5% v/v CO_2 , 37°C). El día del ensayo, los compuestos de prueba en varias concentraciones se colocan durante 10 minutos en los pocillos de la placa de microtitulación antes de agregar el agonista [Arg⁸]-vasopresina en una concentración de EC_{50} . La señal de luz resultante se mide inmediatamente en un luminómetro.