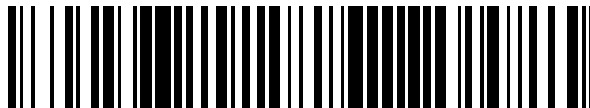


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 087**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/107** (2006.01)

**A61K 38/07** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2008** **E 08876250 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 2384334**

54 Título: **Un método para producir un péptido opioide novedoso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.08.2013**

73 Titular/es:

**ACTION FOR DEVELOPMENT OF RESEARCH SP.  
Z O.O. (100.0%)  
ul. Generala Zajaczka 28  
01-510 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**LIPKOWSKI, ANDREJ**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 421 087 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

Un método para producir un péptido opioide novedoso

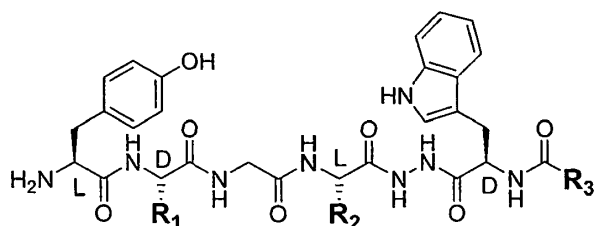
5 El objeto de la presente invención son análogos peptídicos novedosos que presentan afinidad por receptores opioides, que tienen una fórmula general mostrada en la figura 1, especialmente para su administración al sistema nervioso periférico o central en forma de un goteo, inyección o implante para el tratamiento del dolor crónico fuerte durante los estados reumatoideos o gota o neuropatías relacionadas con osteoporosis, traumatismo posquirúrgico o después de un accidente así como dolor por cáncer.

10 Una señal de dolor que surge de enfermedad o daño en los órganos se transmite al sistema nervioso central en el que genera la sensación de dolor. La magnitud del estímulo de dolor se regula mediante un sistema de receptores nociceptivos y antinociceptivos ubicados en las membranas celulares neuronales. Los receptores de taquicinina ubicados en neuronas de los sistemas nerviosos periférico y central constituyen un componente significativo de los  
15 receptores nociceptivos y desempeñan un papel principal en la transmisión de señales de dolor. Los péptidos opioides endógenos son un factor natural responsable de mitigar la señal de dolor a través de la activación de receptores antinociceptivos. Los receptores opioides también se activan a través de la administración de analgésicos opioides tales como morfina o fentanilo. Desafortunadamente, la administración de analgésicos disponibles hasta la fecha provoca una serie de efectos secundarios no deseados, tales como tolerancia y farmacodependencia. El uso  
20 de análogos peptídicos de péptidos opioides naturales con la fórmula general mostrada en la figura 1 hace posible disminuir la tolerancia y farmacodependencia. Según los resultados de experimentos en animales presentados en la Conferencia Internacional de Investigación en Narcóticos (International Narcotic Research Conference) 1989 y descritos en materiales posteriores a la conferencia, B.S. Silbert, A.W. Lipkowski, D.B. Carr, S.K. Szyfelbein, P.F. Osgood, en el capítulo "Peptides as potential nociceptive drugs.", págs. 485-488 de "Procc. Int. Narc. Res. Conf.'89", editado por R. Quirion, Alan R. Liss Inc, Nueva York, 1990, así como D. Kosson, I. Maszczyńska Bonney, D.B. Carr,  
25 E. Mayzner-Zawadzka, A.W. Lipkowski, en Antinociceptive properties of biphalin after intrathecal application in rats: a reevaluation. Pharmacological Report. vol. 57, págs. 545-549, 2005, un péptido opioide con el nombre común bifalina muestra actividad analgésica significativa. Este compuesto muestra una actividad adictiva mucho menor, tal como se describe en M. Yamazaki, T. Suzuki, M. Narita, A.W. Lipkowski, "The opioide peptide analogue biphalin induces less physical dependence than morphine", Life Science, vol. 69, págs. 1023-1028, 2001.

Químicamente, la bifalina es un dímero de dos farmacóforos opioides tetrapeptídicos. Los estudios sobre la relación entre actividad biológica y estructura de bifalina muestran que uno de los fragmentos tetrapeptídicos puede  
35 sustituirse por un componente lipófilo peptídico o no peptídico sin cambios significativos en su afinidad por receptores opioides, tal como se describe en A.W. Lipkowski, A. Misicka, P. Davis, D. Stropova, J. Janders, M. Lachwa, F. Porreca, H.I. Yamamura, V.J. Hruby, en "Biological activity of fragments and analogues of the potent dimeric opioide peptide, biphalin.", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 9, págs. 2763-2766, 1999. Como resultado de sustituir uno de los fragmentos tetrapeptídicos de bifalina por benzoxycarbonil-L-triptófano, se produjo un compuesto con afinidad por receptores opioides comparable a bifalina, con actividad concurrente como  
40 antagonista débil de receptores de taquicinina. Como resultado, se obtuvo un compuesto con propiedades analgésicas fuertes contra el dolor inflamatorio, tal como se describe por I. Maszczyńska Bonney, S.E. Foran, J.E. Marchand, A.W. Lipkowski, D.B. Carr en "Spinal antinociceptive effects of AA501, a novel chimeric peptide with opioide receptor agonist and tachykinin receptor antagonist moieties", European Journal of Pharmacology, vol. 488, págs. 91-99, 2004.

45 De manera inesperada, se mostró que la alteración de la quiralidad del residuo de L-triptófano a un residuo de D-triptófano provoca un aumento significativo en la actividad analgésica del análogo peptídico. Al mismo tiempo, de manera inesperada, se mostró que la sustitución del grupo benzoxycarboxilo por otros fragmentos que contienen un grupo aromático conserva o aumenta su actividad analgésica.

50 Por tanto, el primer objeto de la invención es un compuesto novedoso con la fórmula general:



55 en la que:

- L, D indican una quiralidad de aminoácido apropiada;

- R<sub>1</sub> es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre: D-alanina, D-leucina, D-arginina, D-lisina, D-serina

o D-treonina,

- R<sub>2</sub> es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre L-fenilalanina o L-triptófano,

5 -CO-R<sub>3</sub> indica benciloxicarbonilo o cinamoílo, alfa-metil-4-(2-metilpropil)benzoacetilo, salicil-glicilo, benzoil-glicilo, o su sal farmacéuticamente aceptable.

Particularmente, es un compuesto seleccionado de entre:

10 - (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N"-benciloxicarbonil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato;

- (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-salicil-glicil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato;

15 - (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N"-alfa-metil-4-(2-metilpropil)benzoacetil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato.

El siguiente objeto de la invención es el uso de un compuesto según la invención en la producción de un fármaco analgésico.

20 Los análogos peptídicos novedosos con la fórmula general mostrada en la figura 1, caracterizados por una fuerte afinidad por receptores opioides así como por otros receptores implicados en la transmisión o modulación de estímulos de dolor, pueden ser de utilidad en el tratamiento del dolor, especialmente dolor crónico provocado por estados patológicos, estados posoperatorios o debido a accidentes.

25 Los fármacos que contienen un compuesto según la presente invención pueden usarse para administración periférica o para administración en el sistema nervioso central, preferiblemente en el tratamiento de dolor crónico fuerte, particularmente aquéllos provocados por inflamación. En particular, el dolor crónico e inflamación pueden inducirse por cáncer, inflamación reumatoide, gota, esclerosis múltiple, osteoporosis, neuropatías postraumáticas o posquirúrgicas o cambios después del cáncer. Los compuestos revelados en el presente documento también pueden demostrar afinidad por los receptores de taquicinina. También se observó que la actividad del compuesto administrado de manera periférica se potencia enormemente durante estados patológicos en los que se observa inflamación.

30 Un método particularmente preferible de administración de un compuesto según la presente invención es un goteo intravenoso, un implante subdérmico o intraperitoneal, y durante la administración al sistema nervioso central, un implante o goteo subaracnoideo.

40 Un compuesto según la presente invención puede administrarse independientemente, en forma de una disolución, o puede ser un componente de una disposición de múltiples componentes que contiene otros principios activos.

45 Un compuesto según la presente invención o su composición con otros fármacos o portadores puede prepararse en forma de un liofilizado estéril, que debe disolverse antes de la administración en un volumen predeterminado de solución salina fisiológica. Preferiblemente, un compuesto o su composición con otros fármacos y/o sustancias portadoras se prepara en combinación con un polímero que es un portador del principio activo.

50 Para ilustrar mejor la naturaleza de la presente invención, basándose en la actividad analgésica de los compuestos mostrados en la figura 1, los ejemplos adjuntos demuestran dicha actividad en modelos de dolor crónico en animales. Sin embargo, el alcance de la presente invención no debe limitarse al contenido de los ejemplos a continuación. La figura 1 representa la fórmula general de los compuestos que son el objeto de la solicitud de patente, en la que L, D indican las quiralidades de los residuos de aminoácido, R<sub>1</sub> indica las cadenas laterales de D-alanina o D-leucina o D-arginina o D-lisina o D-serina o D-treonina, R<sub>2</sub> indica cadenas laterales de L-fenilalanina o L-triptófano, y -CO-R<sub>3</sub> indica benciloxicarbonilo o cinamoílo, alfa-metil-4-(2-metilpropil)benzoacetilo, salicil-glicilo, benzoil-glicilo.

### 55 Ejemplo I

60 Se disolvieron T-butiloxicarbonil-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanina (Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe) (10 mmoles) y (benciloxicarbonil-D-triptofanil)hidrazida (Cbz-D-Trp-NHNH<sub>2</sub>) (10 mmoles) así como hidroxiiimida del ácido succínico (HO-Su) (12 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (40 cm<sup>3</sup>). Tras enfriar hasta 0-5°C, se complementó la mezcla de reacción con dicitlohexilcarboxiimida (10 mmoles). Se agitó la reacción durante 1 hora a una temperatura de 5°C y entonces durante 12 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Luego, se separó por filtración la dicitlohexilurea (DCU) precipitada y se aclaró dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de DMF. Se combinó el filtrado con 100 cm<sup>3</sup> de carbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>) ácido al 5%. Se separó por filtración la Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNH-(Cbz-D-Trp-) precipitada y se aclaró dos veces con 10 cm<sup>3</sup> de KHCO<sub>3</sub> al 5%, y entonces dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de agua. Se secó el precipitado, y se pulverizó la sustancia resultante y se añadió a 50 cm<sup>3</sup> de una mezcla (1:1) de ácido clorhídrico concentrado y

etanol. Durante la reacción, se libera CO<sub>2</sub> y se disuelve el producto de reacción. Tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se eliminaron mediante evaporación a presión reducida el etanol y el ácido clorhídrico. Se recristalizó el precipitado de producto bruto restante a través de disolución en etanol y precipitación con acetato de etilo. Esto dio como resultado un producto, cuyo análisis elemental así como el espectro de masas corresponden a hidrato de cloral.(N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-benzoxicarbonil-D-triptofanil)hidrazida [HCl.Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNNH-(CBz-D-Trp-)]. Se obtuvieron 7,5 mmoles de producto. Se indujo inflamación en ratones a través de la aplicación de adyuvante de Freund en la extremidad. Se observó una inflamación progresiva tras dos días. Tras una semana, se examinaron los efectos analgésicos sobre el dolor agudo del análogo peptídico HCl.Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNNH-(CBz-D-Trp-) por medio de la inmersión de la cola en agua a 55°C. La inyección intravenosa del análogo peptídico a una tasa de 20 mg/kg mitigó completamente la reacción de dolor en ratones con inflamación.

### Ejemplo II

Se disolvieron T-butiloxicarbonil-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanina (Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe) (10 mmoles) y salicil-glicil-D-triptofanilo (Salic-Gly-D-Trp-NHNNH<sub>2</sub>) (10 mmoles) así como hidroxiiimida del ácido succínico (HO-Su) (12 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (40 cm<sup>3</sup>). Tras enfriar hasta 0-5°C, se complementó la mezcla de reacción con dicitclohexilcarboxiimida (10 mmoles). Se agitó la reacción durante 1 hora a una temperatura de 5°C y entonces durante 12 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Luego, se eliminó mediante drenaje la dicitclohexilurea (DCU) precipitada y se aclaró dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de DMF. Se mezcló el filtrado con 100 cm<sup>3</sup> de carbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>) ácido al 5%. Se separó por filtración la Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNNH-(Salic-Gly-D-Trp-) precipitada, se aclaró dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de KHCO<sub>3</sub> al 5% y entonces dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de agua. Se secó el precipitado y se pulverizó y entonces se añadió a 50 cm<sup>3</sup> de una mezcla (1:1) de ácido clorhídrico concentrado/etanol. Durante la reacción, se libera CO<sub>2</sub> y se disuelve el producto de reacción. Tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se eliminaron mediante evaporación a presión reducida el etanol y el ácido clorhídrico. Se recristalizó el precipitado de producto bruto restante a través de disolución en etanol y precipitación con acetato de etilo. Esto dio como resultado un producto, cuyo análisis elemental así como el espectro de masas corresponden a hidrato de cloral.(N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-salicil-glicil-D-triptofanil)hidrazida [HCl.Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNNH-(Salic-Gly-D-Trp-)]. Se obtuvieron 7,1 mmoles de producto.

En un modelo de metástasis animal, se indujo inflamación administrando aproximadamente un millón de células de melanoma murino en la extremidad posterior. Tras dos días, se observó una inflamación progresiva, producida por el crecimiento tumoral. Tras dos semanas de desarrollo del tumor, se examinó la actividad analgésica de (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-salicil-glicil-D-triptofanil)hidrazida contra el dolor agudo provocado por inmersión de la cola en agua calentada hasta 55°C. La inyección intraperitoneal del análogo peptídico a una tasa de 30 mg/kg mitigó completamente la reacción de dolor en ratones con inflamación.

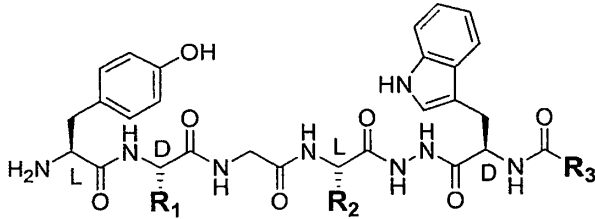
### Ejemplo III

Se disolvieron t-butiloxicarbonil-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanina (10 mmoles) y (alfa-metil-4-(2-metilpropil)bencenoacetil-D-triptofanil)hidrazida (10 mmoles) así como hidroxiiimida del ácido succínico (HO-Su) (12 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (40 cm<sup>3</sup>). Tras enfriar hasta 0-5°C, se añadió dicitclohexilcarboxiimida (10 mmoles) a la mezcla de reacción. Se agitó la reacción durante 1 hora a una temperatura de 5°C y entonces durante 12 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Luego, se eliminó mediante drenaje la dicitclohexilurea (DCU) precipitada y se aclaró dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de DMF. Se mezcló el filtrado con 100 cm<sup>3</sup> de carbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>) ácido al 5%. Se separó el precipitado por filtración, se aclaró dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de KHCO<sub>3</sub> al 5%, y entonces dos veces en 10 cm<sup>3</sup> de agua. Se secó el precipitado y se pulverizó y entonces se añadió a 50 cm<sup>3</sup> de una mezcla (1:1) de ácido clorhídrico concentrado/etanol. Durante la reacción, se libera CO<sub>2</sub> y se disuelve el producto de reacción. Tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se eliminaron mediante evaporación a presión reducida el etanol y el ácido clorhídrico. Se recristalizó el precipitado de producto bruto restante a través de disolución en etanol y precipitación con acetato de etilo. Esto dio como resultado un producto, cuyo análisis elemental así como el espectro de masas corresponden a hidrato de cloral.(N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-salicil-glicil-D-triptofanil)hidrazida [HCl.Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NHNNH-(Salic-Gly-D-Trp-)]. Se obtuvieron 8,2 mmoles de producto.

Dos días antes de los experimentos, se les implantaron a las ratas cánulas en la cavidad subaracnoidea. Durante el experimento, se examinó la actividad analgésica administrando el análogo peptídico (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-alfa-metil-4-(2-metilpropil)bencenoacetil-D-triptofanil)hidrazida. Una dosis de 5 mg del análogo provoca una eliminación completa de la sensibilidad al dolor térmico durante 1 hora.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto con la fórmula general:



5

en la que:

- 10 - L, D indican una quiralidad de aminoácido apropiada,
- R<sub>1</sub> es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre: D-alanina, D-leucina, D-arginina, D-lisina, D-serina o D-treonina,
- 15 - R<sub>2</sub> es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre L-fenilalanina o L-triptófano,
- -CO-R<sub>3</sub> indica benciloxycarbonilo o cinamoílo, alfa-metil-4-(2-metilpropil)benzoacetilo, salicil-glicilo, benzoil-glicilo, o su sal farmacéuticamente aceptable.

20 2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque es un compuesto seleccionado de entre:

- (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N"-benciloxycarbonil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato;
- 25 - (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N'-salicil-glicil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato;
- (N'-tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil, N"-alfa-metil-4-(2-metilpropil)benzoacetil-D-triptofanil)hidrazida o su sal, particularmente clorhidrato.

3. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en la producción de un fármaco analgésico.

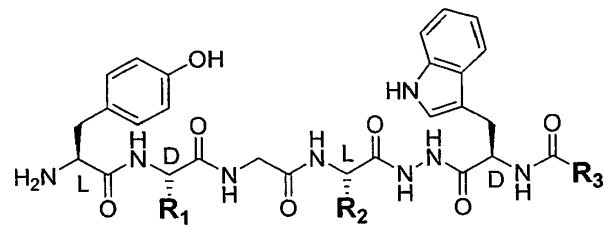


Fig.1