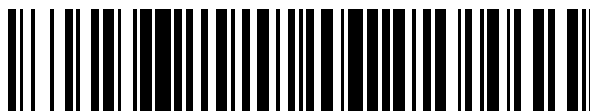


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 125**

51 Int. Cl.:

C07K 14/665 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2009 E 09747877 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2344529**

54 Título: **Nuevos compuestos octapeptídicos derivados de la somatostatina y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

30.09.2008 EP 08290917

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

21.10.2013

73 Titular/es:

**IPSEN PHARMA S.A.S. (33.3%)
65, Quai Georges Gorse
92100 Boulogne-Billancourt , FR;
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PATERNOSTRE, MARIE-THÉRÈSE;
CINTRAT, JEAN-CHRISTOPHE;
VALERY, CÉLINE;
ROUX, STÉPHANE;
ROUSSEAU, BERNARD;
IJSELSTIJN, MAARTEN;
CHERIF-CHEIKH, ROLAND y
ARTZNER, FRANCK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 125 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

Nuevos compuestos octapeptídicos derivados de la somatostatina y su uso terapéutico.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos octapeptídicos. Estos productos que tienen una buena afinidad por ciertos subtipos de receptores de la somatostatina, son particularmente interesantes para tratar los estados patológicos o las enfermedades en las que está(n) implicado(s) uno (o varios) de los receptores de la somatostatina. Estos compuestos presentan por otro lado propiedades fisicoquímicas que permiten considerarlos para soluciones diversas de formulación de medicamentos, por ejemplo como soporte farmacéuticamente aceptable. La invención se refiere igualmente a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos productos y a su utilización para la preparación de un medicamento.

La somatostatina (SST) es un tetradecapéptido cíclico que se aisló por primera vez del hipotálamo como sustancia inhibidora de la hormona del crecimiento (Brazeau P. et al., *Science* 1973, 179, 77-79). Interviene también como neurotransmisor en el cerebro (Reisine T. et al., *Neuroscience* 1995, 67, 777-790; Reisine et al., *Endocrinology* 1995, 16, 427-442). La heterogeneidad de las funciones biológicas de la somatostatina, y las relaciones estructura-actividad de sus análogos peptídicos, han conducido al descubrimiento de 5 subtipos de receptores unidos a la membrana (Yamada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 251-255, 1992; Raynor, K. et al, *Mol. Pharmacol.*, 44, 385-392, 1993). La clonación molecular ha permitido mostrar que la bioactividad de la somatostatina depende directamente de estos cinco subtipos de receptores.

Los papeles funcionales de estos receptores se están estudiando en la actualidad de forma activa. La activación preferente de los subtipos 2 y 5 se ha asociado a la supresión, en los adenomas secretores de estas hormonas, de la hormona de crecimiento GH (acromegalia), de la hormona TSH y de la prolactina; pero el papel preciso de cada subtipo queda por determinar.

Entre los trastornos patológicos asociados a la somatostatina (Moreau J. P. et al., *Life Sciences*, 1987, 40, 419; Harris A.G. et al., *The European Journal of Medicine*, 1993, 2, 97-105), se pueden citar por ejemplo: acromegalia, adenomas hipofisarios, enfermedad de Cushing, gonadotropinomas y prolactinomas, efectos secundarios catabólicos de los glucocorticoides, diabetes, retinopatía diabética, nefropatía diabética, hipertiroidismo, gigantismo, tumores endocrinos gastroenteropancreáticos incluyendo el síndrome carcinoide, VIPoma, insulinoma, nesidioblastosis, l'hiperinsulinemia, glucagonoma, gastrinoma y síndrome de Zollinger-Ellison, GRFoma así como hemorragia aguda de varices esofágicas, reflujo gastroesofágico, reflujo gastroduodenal, pancreatitis, fístulas enterocutáneas y pancreáticas, y también diarreas, diarreas refractarias del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, diarrea crónica secretora, diarrea asociada con el síndrome del intestino irritable, problemas relacionados con el péptido liberador de gastrina, patologías secundarias a los injertos intestinales, hipertensión portal así como hemorragias de varices en enfermos con cirrosis, hemorragia gastrointestinal, hemorragia de úlcera gastroduodenal, enfermedad de Crohn, esclerosis sistémicas, síndrome de evacuación gástrica rápida, síndrome del intestino corto, hipotensión, esclerodermia y carcinoma tiroideo medular, enfermedades relacionadas con la hiperproliferación celular como los cánceres y más particularmente el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de tiroides así como cáncer pancreático y cáncer colorrectal, fibrosis y más particularmente fibrosis de riñón, fibrosis de hígado, fibrosis de pulmón, fibrosis de la piel, también fibrosis del sistema nervioso central así como la de la nariz y la fibrosis inducida por quimioterapia, y otras áreas terapéuticas como, por ejemplo, las cefaleas comprendidas las cefaleas asociadas a tumores hipofisarios, dolores, ataques de pánico, quimioterapia, cicatrización de heridas, insuficiencia renal resultante de retraso en el crecimiento, obesidad y retraso de crecimiento relacionado con la obesidad, retraso de crecimiento uterino, displasia del esqueleto, síndrome de Noonan, síndrome de la apnea del sueño, enfermedad de Graves, enfermedad del ovario poliquístico, pseudoquistes pancreáticos y ascitis, leucemia, meningioma, caquexia cancerosa, inhibición de *H. pylori*, psoriasis así como la enfermedad de Alzheimer. Igualmente se puede citar la osteoporosis.

Hoy en día, se dirige una atención creciente a los péptidos que tienen afinidad por los receptores de la somatostatina. Así, se ha estudiado mucho la lanreótida para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la hormona del crecimiento (Cendros JM, Peraire C, Trocóniz IF, Obach R. *Pharmacokinetics and population pharmacodynamic analysis of lanreotide Autogel*. *Metabolism*. 2005 Oct, 54(10), 1276-81).

Se han descrito derivados de lanreótida que contienen sustituciones al nivel del aminoácido AA4 en *Biophysical Journal* 94(5), páginas 1782-1785 (2008) y el en *Journal of Peptide Sciences* 14(1), páginas 66-75 (2008).

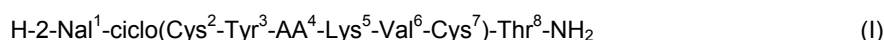
La necesidad de encontrar alternativas a las soluciones existentes constituye así pues un objetivo principal. La presente invención se inscribe en este ámbito.

La solicitante propone así pues nuevos compuestos octapeptídicos que poseen una buena afinidad por los receptores de la somatostatina y/o propiedades fisicoquímicas que permiten considerar soluciones diversas de formulación de medicamentos.

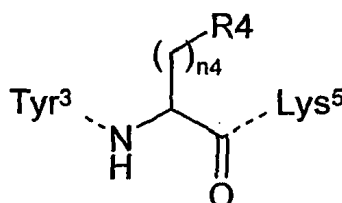
Los compuestos conforme a la invención presentan numerosas ventajas, en particular, una al menos de las características siguientes:

- su afinidad por los receptores de la somatostatina,
- su reología que permite gamas de viscosidades asociadas relacionadas con el confort de inyección,
- su aptitud para ser utilizados como soporte de formulación,
- su capacidad de autoensamblaje en forma de nanotubos de diámetros variables y monodispersos,
- 5 • su capacidad de autoensamblaje en forma de fibras,
- sus grados diversos de solubilidad en agua.

La presente invención tiene así pues por objeto un compuesto octapeptídico de fórmula general (I)

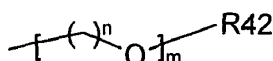


en la que AA⁴ representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos Tyr³ y Lys⁵ conforme a la fórmula



en la que n₄ representa un número entero de 0 a 3 y R₄ representa un átomo de hidrógeno, un radical de alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo y heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre arilazo, halo, nitro, hidroxilo, arilo, OR₄₁;

R₄₁ representa un radical



en el que R₄₂ representa un radical de alquilo o un átomo de hidrógeno, n es un número entero de 2 a 4, y m es un número entero de 1 a 4;

entendiéndose que todos los aminoácidos pueden tener la configuración D o L,

con exclusión de los compuestos H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-piridil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ y de sus sales,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

Conforme a la presente invención, se entiende por radical de aminoácido, el radical que forma un aminoácido unido por sus funciones de amina y ácido en enlaces peptídicos. Así, un radical de aminoácido con R como cadena lateral, tendrá por radical el radical de fórmula -NH-CH(R)-C(O)-.

Conforme a la presente invención, los aminoácidos representados por su código de tres letras en una fórmula general, o como tales, o incluso como radicales, pueden tener la configuración D o L, si no se especifica nada.

Por otro lado, según la presente invención y conforme a la convención, la denominación de los péptidos ejemplificados por su secuencia de aminoácidos representados por su código de tres letras, menciona los aminoácidos de configuración L sin especificar nada, mientras que los aminoácidos D se indican explícitamente con la letra D precediendo el código de tres letras del aminoácido considerado.

En el sentido de la presente invención, se entiende por alquilo, cuando no se precisa más, un radical de alquilo lineal o ramificado con de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo, y preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono.

Por cicloalquilo, se entiende un radical cíclico que comprende de 3 a 7 átomos de carbono unidos entre ellos por dos enlaces sencillos, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. Este radical está sustituido eventualmente con un radical alquílico tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, el radical cicloalquílico comprende entre 4 y 6 eslabones de metileno, tal como ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. Muy preferentemente, el radical cicloalquílico representa un radical ciclohexílico.

Por arilo, se entiende un sistema carbocíclico insaturado que comprende al menos un ciclo aromático, y preferentemente un radical elegido entre fenilo, naftilo, antrilo (o antraceno) y fluorenilo.

Por arilazo, en el sentido de la presente invención, se entiende un radical de fórmula aril-N=N, en el que el radical arílico es tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, el radical arilazo representa el radical fenilazo.

5 Por heteroarilo, en el sentido de la presente invención, se entiende un ciclo insaturado aromático que comprende uno o varios heteroátomos iguales o diferentes, elegidos entre N, O y S, tales como los radicales de piridinilo, pirimidinilo, furilo, tienilo, benzotienilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo y muy particularmente tienilo, benzotienilo e imidazolilo.

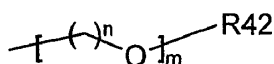
10 Conforme a la presente invención, la expresión sal farmacéuticamente aceptable define sales de adición de ácidos inorgánicos tales como hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, fosfato, difosfato y nitrato, o ácidos orgánicos tales como acetato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato y estearato. Para otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, se puede recurrir a la referencia "Salt selection for basic drugs", Int. J. Pharm. (1986), 33, 201-217.

15 Conforme a la presente invención, los aminoácidos representan los aminoácidos conocidos por el especialista en la técnica de configuración D o L, representados en la presente memoria conforme a su nomenclatura habitual, y los análogos sintéticos modificados en las cadenas laterales de dichos aminoácidos entre los que:

- β -(3-benzotienil)-Ala, β -(2-tienil)-Ala, β -(1-naftil)-Ala, β -(2-naftil)-Ala o 2-Nal, β -(9-antril)-Ala, β -(2-fluorenil)-Ala representan una alanina sustituida en β , respectivamente con un radical de benzotienilo en su posición 3, tienilo en su posición 3, naftilo en su posición 1, naftilo en su posición 2, antrilo en su posición 9, y fluorenilo en su posición 2;
- Ph-Gly o Phg representa una glicina sustituida con un radical de fenilo;
- Homo-Phe u Homophe representa una fenilalanina en la que la cadena lateral está prolongada con un eslabón de metileno; y,
- *p*-Br-Phe, *p*-F-Phe, *p*-Nitro-Phe, *p*-Ph-Phe; *p*-O-2-(2-metoxietoxi)etoxi-Phe, *m*-Br-Phe, *m*-F-Phe, *o*-Br-Phe, *o*-F-Phe, 3,5-diF-Phe representan una fenilalanina en la que el núcleo de fenilo está sustituido en para con un átomo de bromo, de flúor, un radical nitro, fenilo y O-2-(2-metoxietoxi)etoxi, en meta con un átomo de bromo y de flúor, en orto con un átomo de bromo y de flúor y en las posiciones 3 y 5 con dos átomos de flúor.

30 Preferentemente, la invención tiene más particularmente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que n_4 representa un número entero de 0 a 2 y R4 representa un radical de alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo o heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre arilazo, halo, nitro, hidroxilo, arilo y OR41;

R41 representa un radical



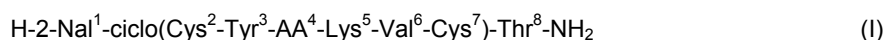
35 en el que R42 representa un radical de alquilo, n y m representan 2.

Muy preferentemente, la invención tiene por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que n_4 representa 0 o 1 y R4 representa un átomo de hidrógeno, o un radical alquilico.

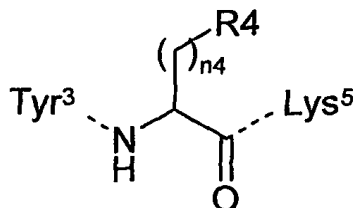
Igualmente, de manera muy preferente, la invención tiene por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que n_4 representa 0 y R4 representa un radical alquilico.

40 De manera aún más preferente, la invención tiene por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que el radical alquilico representa el radical metilo.

La presente invención tiene igualmente por objeto un compuesto octapeptídico de fórmula general (I)

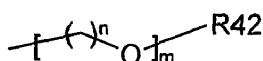


en la que AA⁴ representa un aminoácido de fórmula



en la que n₄ representa un número entero de 0 a 3 y R⁴ representa un átomo de hidrógeno, un radical de alquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo o heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre halo, nitro, hidroxilo, arilo y OR⁴¹;

R⁴¹ representa un radical



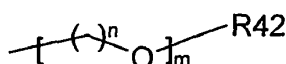
en el que R⁴² representa un radical de alquilo o un átomo de hidrógeno, n es un número entero de 2 a 4, y m es un número entero de 1 a 4;

entendiéndose que todos los aminoácidos pueden tener la configuración D o L,

con exclusión de los compuestos H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-piridil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ y de sus sales,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

Preferentemente, la invención tiene más particularmente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que n₄ representa un número entero de 0 a 2, y R⁴ representa un radical de alquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo y heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre halo, nitro, hidroxilo, arilo y OR⁴¹; y R⁴¹ representa un radical



en el que R⁴² representa un radical de alquilo, n y m representan 2.

La invención tiene preferentemente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que el término arilo representa un radical elegido entre fenilo, naftilo, antrilo y fluorenilo.

La invención tiene igualmente de manera preferente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que el término heteroarilo representa un radical elegido entre piridinilo, pirimidinilo, furilo, tienilo, benzotienilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, y aún más preferentemente, elegido entre tienilo, benzotienilo e imidazolilo.

También, la invención tiene igualmente de manera preferente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que el término alquilo representa un radical elegido entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo.

También, la invención tiene igualmente de manera preferente por objeto un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en el que el término alquilo representa un radical elegido entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo; y el término cicloalquilo representa un radical de ciclohexilo.

Más preferentemente, la invención se refiere a un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), en la que AA⁴ representa el radical de un aminoácido elegido entre Trp, Ala, β-(3-benzotienil)-Ala, β-(2-tienil)-Ala, β-(9-antril)-Ala, β-(2-fluorenil)-Ala, His, Val, 1-Nal, 2-Nal, fenil-Gly, Homo-Phe, *p*-Br-Phe, *p*-F-Phe, *m*-F-Phe, *o*-F-Phe, *m*-Br-Phe, *o*-Br-Phe, *p*-NO₂-Phe, 3,5-difluoro-Phe, 4-fenil-Phe, Tyr, *p*-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-Phe; β-(ciclohexil)-Ala, *p*-fenilazo-Phe.

Igualmente, de manera más preferente, la invención se refiere a un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), en la que AA⁴ representa un aminoácido elegido entre Trp, Ala, β-(3-benzotienil)-Ala, β-(2-tienil)-Ala, β-(9-antril)-Ala, β-(2-fluorenil)-Ala, His, Val, 1-Nal, 2-Nal, fenil-Gly, Homo-Phe, *p*-Br-Phe, *p*-F-Phe, *m*-F-Phe, *o*-F-Phe, *m*-Br-Phe, *o*-Br-Phe, *p*-NO₂-Phe, 3,5-difluoro-Phe, 4-fenil-Phe, Tyr, *p*-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-Phe.

Aún más preferentemente, la invención se refiere a un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), en la que el radical de aminoácido AA⁴ tiene la configuración D, y aún más preferentemente los aminoácidos 2-Nal¹ y AA⁴ tienen la configuración D, teniendo los otros aminoácidos la configuración L.

- 5 Igualmente, de manera muy preferente, la invención se refiere a un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), en la que el radical de aminoácido AA⁴ tiene la configuración L, y aún más preferentemente los aminoácidos 2-Nal¹ y AA⁴ tienen la configuración L, teniendo los otros aminoácidos la configuración D.

Aún más preferentemente, la invención se refiere a un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), en la que AA⁴ representa el radical de aminoácido Ala.

Preferentemente, el compuesto conforme a la invención se elige entre:

- 10 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-benzotienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-tienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-His⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Val⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 15 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(1-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(9-antril)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-fluorenil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Ph-D-Gly⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 20 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-homo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Tyr⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 25 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*o*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-3,5-diF-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*o*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-nitro-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 30 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Ph-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-2-Nal¹-ciclo(D-Cys²-D-Tyr³-Trp⁴-D-Lys⁵-D-Val⁶-D-Cys⁷)-D-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(ciclohexil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-fenilazo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 35 o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

Más preferentemente, el compuesto conforme a la invención tal como se ha definido anteriormente, se elige entre:

- H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-benzotienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-tienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-His⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(1-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-fluorenil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

5 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Tyr⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*o*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-3,5-diF-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

10 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-nitro-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-fenilazo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

Igualmente, más preferentemente, el compuesto conforme a la invención tal como se ha definido anteriormente, se elige entre:

15 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Ph-D-Gly⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(ciclohexil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

Igualmente, de manera preferente, el compuesto conforme a la invención tal como se ha definido anteriormente, se elige entre:

20 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Val⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(9-antril)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-homo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Ph-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

25 Igualmente, de manera muy preferente, el compuesto conforme a la invención tal como se ha definido anteriormente, es el compuesto siguiente:

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

La invención tiene igualmente por objeto un medicamento que comprende un compuesto conforme a la invención, tal como se ha definido anteriormente.

30 La invención tiene igualmente por objeto una composición farmacéutica que comprende un compuesto conforme a la invención tal como se ha definido anteriormente, y más particularmente cuando el compuesto se utiliza como principio activo.

La invención tiene igualmente por objeto una composición terapéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente, como principio activo en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La invención tiene igualmente por objeto una composición terapéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente, como excipiente farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un principio activo.

40 Igualmente, la invención tiene por objeto una composición terapéutica de liberación inmediata, controlada, prolongada o retardada, que comprende un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente, como excipiente farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un principio activo.

La invención tiene igualmente por objeto la utilización de un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente, para fabricar un medicamento.

5 La invención tiene igualmente por objeto una utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que el medicamento está destinado a tratar una patología elegida entre las enfermedades relacionadas con la hormona del crecimiento.

10 La invención se refiere finalmente a la utilización de un compuesto tal como se ha definido anteriormente para fabricar un medicamento; y preferentemente un medicamento destinado a tratar las patologías en las que está(n) implicado(s) uno (o varios) receptor(es) de la somatostatina, tales como acromegalia, el tratamiento de tumores neuroendocrinos, retinopatía diabética, el tratamiento de los vasos, articulaciones y la piel; y preferentemente la acromegalia o el tratamiento de los tumores neuroendocrinos.

La composición terapéutica conforme a la invención puede estar en forma sólida, por ejemplo polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, liposomas o supositorios. Los soportes sólidos apropiados pueden ser, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetil-celulosa de sodio, polivinilpirrolidina y cera.

15 La composición terapéutica conforme a la invención puede presentarse también en forma líquida, por ejemplo, en disoluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes. Los soportes líquidos apropiados pueden ser, por ejemplo, el agua, disolventes orgánicos tales como el glicerol o glicoles, así como sus mezclas, en proporciones variadas, en agua.

20 La administración de una composición conforme a la invención podrá hacerse por vía tópica, oral, parenteral, por inyección intramuscular, subcutánea, etc.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente solicitud tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido para un experto común en el campo al que pertenece la invención.

25 La parte experimental siguiente se presenta para ilustrar los procedimientos anteriores y en ningún caso debe ser considerada como una limitación al alcance de la invención.

Parte experimental

1. Descripción de las síntesis

1.1 Material utilizado

HPLC-EM:

30 El sistema es de la marca Waters (2525), con desgasificador en línea y sistema de inyección automática (2767). La elución consiste en un gradiente de agua y acetonitrilo, con ácido fórmico al 0,1 %. La detección de las especies eluidas se hace mediante una red de diodos (2996), un detector evaporativo por dispersión de luz (DEDL) y un espectrómetro de masas (véase a continuación). La columna es de tipo de fase inversa, injertada con C18, modelo X-Bridge 100 x 4,6 mm, con un tamaño de partículas de 3,5 µm y un tamaño de poros de 13,5 nm. El caudal se regula a 1 ml min⁻¹ y el volumen de inyección a 20 µl.

35 El espectrómetro de masas es un Micromass ZQ de la marca Waters. La ionización se hace por electropulverización, con una temperatura de la fuente de 120 °C y un voltaje de cono de 20 V. La muestra se introduce de forma continua a 0,3 ml min⁻¹. El analizador es de tipo de cuadrupolo (modelo ZQ2000). Los espectros se registran con el programa informático Mass Lynx 4.0 en el dominio de m/z 100-1000 para las moléculas orgánicas y de 100-2000 para los péptidos.

HPLC-preparativa:

45 Se utilizan dos sistemas para la purificación de péptidos. El sistema descrito anteriormente equipado de una columna de tipo de fase inversa, injertada con C18, modelo X-Bridge 150 x 19 mm con un tamaño de partículas de 5 µm y un tamaño de poros de 13,5 nm. El caudal es de 17 ml min⁻¹. El segundo sistema es un Waters 2545 similar al anterior, no equipado con un espectrómetro de masas. La columna es una Thermo Hypurity, de tipo de fase inversa (injertada con C18) de tamaño 21,2 x 250 mm. Se eluye con una mezcla de agua y acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA), con un caudal de 20 ml min⁻¹. Los dos sistemas de HPLC preparativa se utilizan en modo isocrático después de la determinación de las condiciones óptimas.

Análisis de RMN:

50 Los análisis por resonancia magnética nuclear se llevan a cabo en un espectrómetro Bruker Advance 400 Ultrashield. Las frecuencias de análisis son de 400 MHz para el protón, 376,4 MHz para el flúor 19 y 100 MHz para el carbono 13. Los espectros de RMN de flúor se registran con una secuencia de un solo pulso de 90 °, y de

duración de 19,5 μ s. El tamaño de ventana es de 7,5 kHz, el tiempo de relajación de 2 s y el tiempo de adquisición de 0,87 s. Se realizan dieciséis barridos en cada análisis. Los espectros se registran a temperatura ambiente, los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz. La multiplicidad se da de la siguiente forma: s = singlete, sa= singlete ancho, d = doblete, da = doblete ancho, dd = doble doblete, ddd = doble doblete, t = triplete, ta = triplete ancho, q = cuadruplete, qd = cuadruplete de dobletes, m = multiplete.

Análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS):

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (LCT de Micromass®, UK), equipado de una fuente de electropulverización "electrospray" (fuente Z-spray) en modo positivo. La referencia externa que permite la medida de la masa exacta se introduce en paralelo a la muestra y de forma continua (configuración Lockspray™). La utilizada aquí es la leucina encefalina, que proporciona un ión [M+Na]⁺ con m/z = 578,2591. La resolución de este aparato es de 6500 y los resultados se dan con una desviación con respecto a la masa teórica inferior a 5 mDa. El aparato está controlado por el programa informático Masslynx 4.0®. La muestra disuelta en agua se inyecta en un flujo de 50% de agua-50% de metanol vía HPLC equipado de un sistema de introducción automática de muestras (Alliance 2795 de Waters®, UK) con un caudal de 200 μ l min⁻¹. El volumen de inyección es de 10 μ l. El voltaje del capilar es de 2800 V. El voltaje de cono es de 40 V. La temperatura de la fuente es de 120°C. La temperatura de desolvatación es de 250°C. El caudal del gas de desolvatación (nitrógeno) es de 500 l h⁻¹. El caudal del gas de cono (nitrógeno) es de 20 l h⁻¹. TDC Stop: 100 mV

Espectrometría de IR:

Los espectros infrarrojos de los péptidos se registran por reflexión total atenuada y por transformada de Fourier. El aparato es un Bruker IFS 66 equipado de un módulo 45°N ZnSe ATR, purgado en continuo con nitrógeno. Se depositan 10 μ L de disolución sobre el cristal, y se promedian treinta barridos, a una resolución de 4 cm⁻¹. Se resta la señal del agua del espectro en bruto, gracias al programa informático OPUS 4.2.

Liofilizador:

El liofilizador utilizado es un Christ Alpha 2-4 LD plus, conectado a una bomba de paletas que permite alcanzar un vacío de alrededor de 15 μ bar. Las muestras acuosas se solidifican en nitrógeno líquido antes de ser conectadas a este aparato.

Microscopía:

MET (microscopio electrónico de transmisión) de tipo microscopio Phillips CM-20, que funciona a 200 kV, y MEB (microscopio electrónico de barrido) de tipo Léo-Gémini, "field emission gun" (cañón de emisión de campo).

1.2 Reactivos utilizados

La resina de síntesis peptídica se obtiene de Novabiochem, división de Merk Bioscience (Schwalbach, Alemania). La resina de intercambio de iones proviene de los laboratorios Bio-Rad (Hercules, EE.UU.).

El agua utilizada está desionizada doblemente por la utilización de un sistema intercambiador Milli-Q Plus de Millipore (Billerica, EE.UU.). Los disolventes para las síntesis y para la purificación se adquieren en Aldrich y VWR (West Chester, EE.UU.) y, salvo que se mencione lo contrario, se utilizan sin purificación.

Los aminoácidos se adquieren en Bachem (Weil am Rhein, Alemania), Fluka (Buchs, Suiza), Acros Organics (Geel, Bélgica) y NeoMPS (Strasbourg, Francia).

Aminoácidos precursores disponibles comercialmente:

Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Boc- β -(2-naftil)-D-Ala-OH;

Fmoc- β -(3-benzotienil)-D-Ala-OH, Fmoc- β -(2-tienil)-D-Ala-OH, Fmoc-D-His(Boc)-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc- β -(1-naftil)-D-Ala-OH, Fmoc- β -(2-naftil)-D-Ala-OH, Fmoc- β -(9-antril)-D-Ala-OH, Fmoc-Ph-D-Gly-OH, Fmoc-homo-D-Phe-OH, Fmoc-*p*-Br-D-Phe-OH, Fmoc-*p*-F-D-Phe-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-*m*-F-D-Phe-OH, Fmoc-*o*-F-D-Phe-OH, Fmoc-3,5-diF-D-Phe-OH, Fmoc-*m*-Br-D-Phe-OH, Fmoc-*o*-Br-D-Phe-OH, Fmoc-*p*-Nitro-D-Phe-OH, Fmoc-*p*-Ph-D-Phe-OH; Fmoc- β -(ciclohexil)-D-Ala-OH;

Fmoc- β -(2-naftil)-L-Ala-OH, Fmoc-D-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Thr(tBu)-OH.

Síntesis del aminoácido Fmoc- β -(2-fluorenil)-D-Ala-OH

a/ 2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)acrilato de metilo

- 5 A una disolución a 0 °C de 2-(benciloxicarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (2 g, 6,04 mmol, 1 eq) en diclorometano (60 ml), se añade 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU, 1,35 ml, 1,5 eq). Después de 5 min de agitación, se añade el 9H-fluoreno-2-carbaldehído (1,17 mg, 6,04 mmol, 1 eq). La mezcla se deja 2 h a 0 °C con agitación, y luego se retira el baño de hielo, dejando que la temperatura suba a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C. La reacción se deja con agitación durante 2 h. Al medio de reacción se añaden 40 ml de diclorometano, y después de lavar con HCl 0,5 M, la fase orgánica se seca con sulfato sódico, y luego se evapora. Se tritura con éter etílico frío. Se recupera el sobrenadante y la operación se realiza varias veces. El sólido obtenido se purifica en gel de sílice (fase móvil: hexano-AcOEt 75:25) para obtener 1,75 g de producto puro (configuración indeterminada), R = 74 %. También se recupera el otro isómero. La relación entre los dos isómeros es de 95/5.
- 10 1H-RMN (CDCl₃): δ 3,84 (m, 2H, fluoreno + 3H metilo); 5,13 (s, 2H, bencilo); 7,25-7,40 (m, 7H), 7,45 (s, 1H); 7,55 (d, J = 7,6, 2H); 7,72 (m, 2H), 7,79 (d, J = 7,6, 1H).
13C-RMN (CDCl₃): δ 36,95; 52,76; 67,63; 120,04; 120,44; 123,36; 125,22; 127,04; 127,52; 128,38; 128,59; 129,17; 132,16; 132,73; 136,07; 141,04; 143,31; 143,52; 144,0; 166,02.
EM (ionización por electropulverización (ESI)): m/z 400,0 [M+H]⁺
- 15 IR: λ. (cm⁻¹): 3262, 3034, 2951 (CH alquilo), 1725 (CO), 1699. 1509, 1234, 730.
Punto de fusión: 109 °C
b/ (R)-2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)propanoato de metilo
En un reactor metálico cerrado, se añade el catalizador asimétrico de rodio (35 mg, 2 % mol) a una disolución de 2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)acrilato de metilo (1 g, 2,51 mmol) en MeOH (150 ml). Se purga el aire del medio y se pone en atmósfera de hidrógeno (50 baros). Después de 24 h, el medio se concentra para dar cuantitativamente el producto de reducción.
- 20 1H-RMN (CDCl₃): δ 3,15 (dd, J = 14,0, J = 6,4, 1H); 3,22 (dd, J = 14,0, J = 6,0, 1H); 3,73 (s, 3H metilo); 3,85 (s, 2H fluoreno); 4,70 (m, 1H); 5,07 (d, J = 12,4, 1H bencilo); 5,12 (d, J = 12,4, 1H, bencilo); 5,25 (1H, NH); 7,11 (d, J = 7,6, 1H); 7,27-7,38 (m, 8H); 7,53 (d, J = 7,6, 2H); 7,58 (d, J = 7,8, 1H); 7,75 (d, J = 7,6, 1H).
25 13C-RMN (CDCl₃): δ 36,74; 38,38; 52,27; 54,95; 66,91; 119,76; 119,85; 124,96; 125,87; 126,64; 126,70; 127,79; 128,04; 128,11; 128,45; 134,14; 136,17; 140,74; 141,27; 143,12; 143,64; 155,58; 172,01.
EM (ESI) m/z : 402,0 [M+H]⁺
IR: λ. (cm⁻¹): 3347, 3025. 2949 (CH alquilo), 1741 (CO), 1689, 1523, 1256, 1024, 740
Punto de fusión: 125 °C
- 30 Exceso enantiomérico determinado mediante HPLC quiral: 93,4%
c/ ácido (R)-2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)propanoico
A una disolución de (R)-2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)propanoato de metilo (800 mg, 1,99 mmol) en dioxano (35 ml) a 0 °C, se añade una disolución de 96 mg de LiOH en agua (15 ml). La reacción se sigue mediante cromatografía en capa fina (CCF) (hexano-AcOEt 1:1) (el ácido formado no migra). La reacción termina al cabo de una hora. El medio se acidifica con HCl 2 M, y el producto se extrae con acetato de etilo. El producto se recupera de manera cuantitativa (735 mg) después de secar con sulfato sódico, evaporación a vacío y cristalización en éter.
- 35 1H-RMN ((CD₃)₂SO): δ 2,90 (dd, J = 14,0, J = 9,6, 1H); 3,20 (dd, J = 13,6, J = 4,8, 1H); 3,71 (s, 2H, fluoreno); 4,40 (dd, J = 9,6, J = 4,8, 1H); 4,87 (d, J = 12,6, 1H bencilo); 4,96 (d, J = 12,6, 1H, bencilo); 7,12 (m, 6H); 7,18 (t, J = 7,6, 1H); 7,26 (t, J = 7,6, 1H); 7,32 (s, 1H); 7,43 (d, J = 7,6, 1H); 7,60 (d, J = 7,6, 1H); 7,68 (d, J = 7,8, 1H).
40 13C-RMN ((CD₃)₂SO): δ 36,17; 36,60; 55,68; 65,14; 119,59; 119,71; 125,01; 125,77; 126,43; 126,63; 127,40; 127,59; 127,70; 128,45; 128,15; 136,57; 136,89; 139,39; 140,90; 142,82; 142,88; 155,92; 173,27.
EM (ESI) m/z: 388 [M+H]⁺
IR: λ. (cm⁻¹): 3333; 3035; 2902 (CH alquilo); 1724 (CO); 1705; 1689; 1531; 1245; 1062; 734.
Punto de fusión: 141 °C
- 45 d/ ácido (R)-2-amino-3-(9H-fluoren-2-il)propanoico
A una disolución de ácido (R)-2-(benciloxicarbonilamino)-3-(9H-fluoren-2-il)propanoico (650 mg, 1,68 mmol) en metanol (80 ml), se añade Pd/C (65 mg). El medio se purga con nitrógeno y luego con hidrógeno. La reacción se deja 6 h con agitación vigorosa: se forma un precipitado. El medio se filtra: se recupera una mezcla del producto

deseado y de Pd/C, antes de su solubilización en una mezcla de dioxano-agua (1:1), y después se acidifica con HCl 2 M para disolver el aminoácido. Esta disolución se filtra, se evapora el dioxano a vacío, y luego se neutraliza la fase acuosa añadiendo NaOH 2 M. Después de evaporar, el polvo blanco obtenido se lava con agua para retirar las sales en exceso. Se recuperan 500 mg del aminoácido. El rendimiento es de 85%.

5 EM (ESI) m/z: 254 [M+H]⁺

IR: λ . (cm⁻¹): 3425; 3019; 2960 (CH alquilo); 1567; 1402; 1316; 737.

Punto de fusión: 225 °C

UV λ . (nm): 206 (abs = 0,868), 267 (abs = 0,446), 303 (abs = 0,203)

Fluorescencia: (excitación a 267 nm) máximo a 312 nm.

10 Exceso enantiomérico determinado mediante HPLC quiral: 93,4 %.

e/ ácido (R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-amino-3-(9H-fluoren-2-il) propanoico o Fmoc- β -(2-fluorenil)-D-Ala-OH

15 A una disolución del aminoácido ácido (R)-2-amino-3-(9H-fluoren-2-il)propanoico (560 mg, 2,21 mmol, 1 eq.) en una mezcla de dioxano (50 mL)-carbonato sódico al 10 % en agua (30 ml), se añade gota a gota una disolución de FmocOSu (820 mg, 2,43 mmol, 1,1 eq) en 20 ml de dioxano. La desaparición de FmocOSu se sigue mediante CCF, fase móvil hexano-AcOEt (1:1). La reacción se agita durante 3h. La mezcla de reacción se extrae con acetato de etilo, y la fase orgánica se recupera y se evapora. El sólido obtenido se cristaliza en AcOEt antes de filtrar. Se recuperan 860 mg del producto esperado. R = 82%.

20 ¹H-RMN ((CD₃)₂SO): δ 3,00 (dd, J = 13,2, J = 5,8, 1H); 3,13 (dd, J = 13,2, J = 4,9, 1H); 3,76 (s, 2H, fluoreno); 3,81 (dd, J = 6,4, J = 4,8, 1H), 4,12 (dd, J = 9,8, J = 6,4, 1H, CH β Fmoc); 4,19 (t, J = 6,4, 1H, Fmoc); 4,30 (dd, J = 9,8, J = 6,4, 1H, CH β Fmoc); 6,35 (s, 1H, NH); 7,12 (d, J = 7,6, 1H); 7,20-7,40 (m, 7H); 7,53 (d, J = 7,4, 1H); 7,62 (t, J = 7,2, 2H); 7,67 (d, J = 7,8, 1H); 7,81 (d, J = 7,6, 1H); 7,7 (d, J = 7,6, 2H).

¹³C-RMN (CD₃SO): la molécula está degradada.

EM (ESI) m/z: 476,0 [M+H]⁺

25 IR: λ . (cm⁻¹): 3382; 3051; 2958 (CH alquilo); 1678; 1605; 1528; 1411; 1254; 1037; 735.

Síntesis de N-fluorenilmetoxicarbonil-4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe o Fmoc-*p*-O-2-(2-metoxietoxi)etoxi-D-Phe

a/ N-tercbutiloxicarbonil-4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe

30 Se introducen 100 mg (0,35 mmol) de Boc-D-tirosina-OH así como 155 mg (1,12 mmol, 3,1 eq) en 1 ml de DMF y 100 μ l de H₂O. Se introducen a 0 °C, 180 μ l (1,43 mmol, 4,1 eq) de 1-bromo-2-(2-metoxietoxi)etano, y la reacción se calienta a 50°C durante 7 h. El medio de reacción se disuelve entonces en acetato de etilo y se añade ácido clorhídrico diluido para llevar el pH de la fase acuosa a 2. La fase orgánica se lava con ácido clorhídrico diluido y luego se seca sobre sulfato magnésico. Después de evaporar, se recogen 218,9 mg de sólido amorfo. Este sólido se disuelve en 2 ml de sosa 1 M y 2 ml de dioxano, y se deja con agitación 1 h 30. El pH se ajusta a 2 con ácido clorhídrico diluido, y luego el producto se extrae con acetato de etilo. Se recogen 137,7 mg de producto en bruto. Le purificación se lleva a cabo en columna de sílice con acetato de etilo-ciclohexano-ácido acético 60:40:1 % como fase móvil. Después de evaporar, se recogen 94,6 mg de producto puro, con un rendimiento de 68 %.

40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,41 (s, 9H, *t*Bu); 3,01 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H, CH β); 3,11 (dd, J = 13,7, J = 4,8, 1H, CH β); 3,39 (s, 3H, OCH₃); 3,55-3,60 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,69-3,74 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,81-3,87 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,07-4,16 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,50-4,59 (m, 1H CH α); 4,97 (d, J = 7,7, 1H, NH); 6,84 (d, J = 8,3, 2H, CH Ar); 7,07 (d, J = 8,3, 2H, CH Ar).

EM (ESI) m/z: 384,2 [M+H]⁺

b/ 4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe

45 Se introducen 1.89 g de N-*terc*-butiloxicarbonil-4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe en 26 ml de HCl al 35 % y 74 ml de acetato de etilo. La reacción se deja 3 h con agitación. Después de evaporar, el sólido se tritura tres veces con éter etílico, para obtener 1,12 g de sólido blanco, con un rendimiento de 66 %.

RMN ¹H ((CD₃)₂SO): δ 3,04 (d, J = 6,3, 2H, CHH β); 3,23 (s, 3H, OC_{H3}); 3,41-3,46 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,53-3,59 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,68-3,73 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,01-4,06 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,09-4,12 (m, 1H CH α); 6,89 (d, J = 8,8, 1H, CH Ar); 7,16 (d, J = 8,8, 1H, CH Ar).

RMN ¹³C ((CD₃)₂SO): δ 34,84 (Cβ); 53,17 (Cα); 58,11 (CH₃O); 67,16 (CH₂ etoxi); 68,97 (CH₂ etoxi); 68,77 (CH₂ etoxi); 71,34 (CH₂ etoxi); 114,57 (C *meta* Ar); 126,61 (C *orto* Ar); 130,65 (CH₂-C Ar); 157,84 (O-C Ar); 170,30 (CO).

EM (ESI) m/z: 284, 1 [M+H]⁺

c/ N-fluorenilmetoxicarbonil-4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe

- 5 Se introducen 812 mg (2,87 mmol) de 4-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe en 4 ml de agua destilada y 4 ml de acetona. Se añaden 300 mg (2,83 mmol, 0,98 eq) de Na₂CO₃ y 954,6 mg (2,83 mmol, 0,98 eq) de FmocOSu. La suspensión blanca se agita 5 h 30 a una temperatura comprendida entre 20 y 30°C. La acetona se evapora entonces, el medio se ajusta a un pH = 2 con ácido clorhídrico, y el producto se extrae con acetato de etilo. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una disolución de NaCl saturado, y luego se secan sobre MgSO₄ anhidro. Después de evaporar, se obtienen 1,5 g de producto en bruto. Este producto se purifica sobre aproximadamente 120 g sílice, con diclorometano-metanol-ácido acético 98:2:5 como fase móvil, para obtener 939 mg de sólido blanco, con un rendimiento de 65 %.

15 RMN ¹H (CDCl₃): δ 3,05 (dd, J = 14,0, J = 5,7, 1H, CHβ); 3,13 (dd, J = 14,0, J = 5,4, 1H, CH'β); 3,38 (s, 3H, OCH₃); 3,55-3,59 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,67-3,72 (m, 2H, CH₂ etoxi); 3,80-3,85 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,04-4,10 (m, 2H, CH₂ etoxi); 4,20 (t, J = 6,8, 1H, CH); 4,34 (dd, J = 10,8, J = 6,8, 1H, CHβ Fmoc); 4,44 (dd, J = 10,8, J = 6,8, 1H, CH'β Fmoc); 4,63 (dd, J = 14,0, J = 5,7, 1H, CHα); 5,30 (s, 1H, NH); 6,81 (d, J = 8,1, 2H, CH Ar.); 7,03 (d, J = 8,1, 2H, CH Ar.); 7,30 (t, J = 7,4, 2H, fluorenilo); 7,40 (t, J = 7,4, 2H, fluorenilo); 7,56 (t, J = 5,8, 2H, fluorenilo); 7,76 (d, J = 7,4, fluorenilo).

20 RMN ¹³C (CDCl₃): δ 36,89 (CH₂β); 47,08 (CH Fmoc); 54,66 (CHα); 58,96 (CH₃O); 66,96 (CH₂ Fmoc); 67,22 (CH₂ etoxi); 69,68 (CH₂ etoxi); 70,55 (CH₂ etoxi); 71,83 (CH₂ etoxi); 114,65 (C *meta* Phe.); 119,92 (CH fluorenilo); 125,01 (CH fluorenilo); 127,02 (C *orto* Ar); 127,67 (CH fluorenilo); 127,77 (CH fluorenilo); 130,34 (CH₂-C Phe.); 141,24 (C fluorenilo); 143,64 (C fluorenilo); 155,70 (CO Fmoc); 157,84 (O-C Ar.); 170,30 (CO).

EM (ESI) m/z: 506,0 [M+H]⁺

Síntesis del aminoácido Fmoc-β-(p-fenilazo)-D-Phe-OH

- 25 Se ponen 400 mg (1 mmol) de Fmoc-pNH₂-D-Phe-OH y 150 mg (1,4 mmol) de nitrosobenceno en 20 ml de ácido acético glacial, y después la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Entonces, se añaden 150 mg de nitrosobenceno de nuevo y la agitación continúa 24 h. Después se evapora el disolvente y el residuo se cristaliza en metanol caliente. La mezcla se deja toda la noche a +4°C y los cristales se recuperan por filtración, se enjuagan con metanol frío (2 x 20 ml) y después se secan en un desecador a vacío. Se recuperan 300 mg del aminoácido. El rendimiento es de 61%.

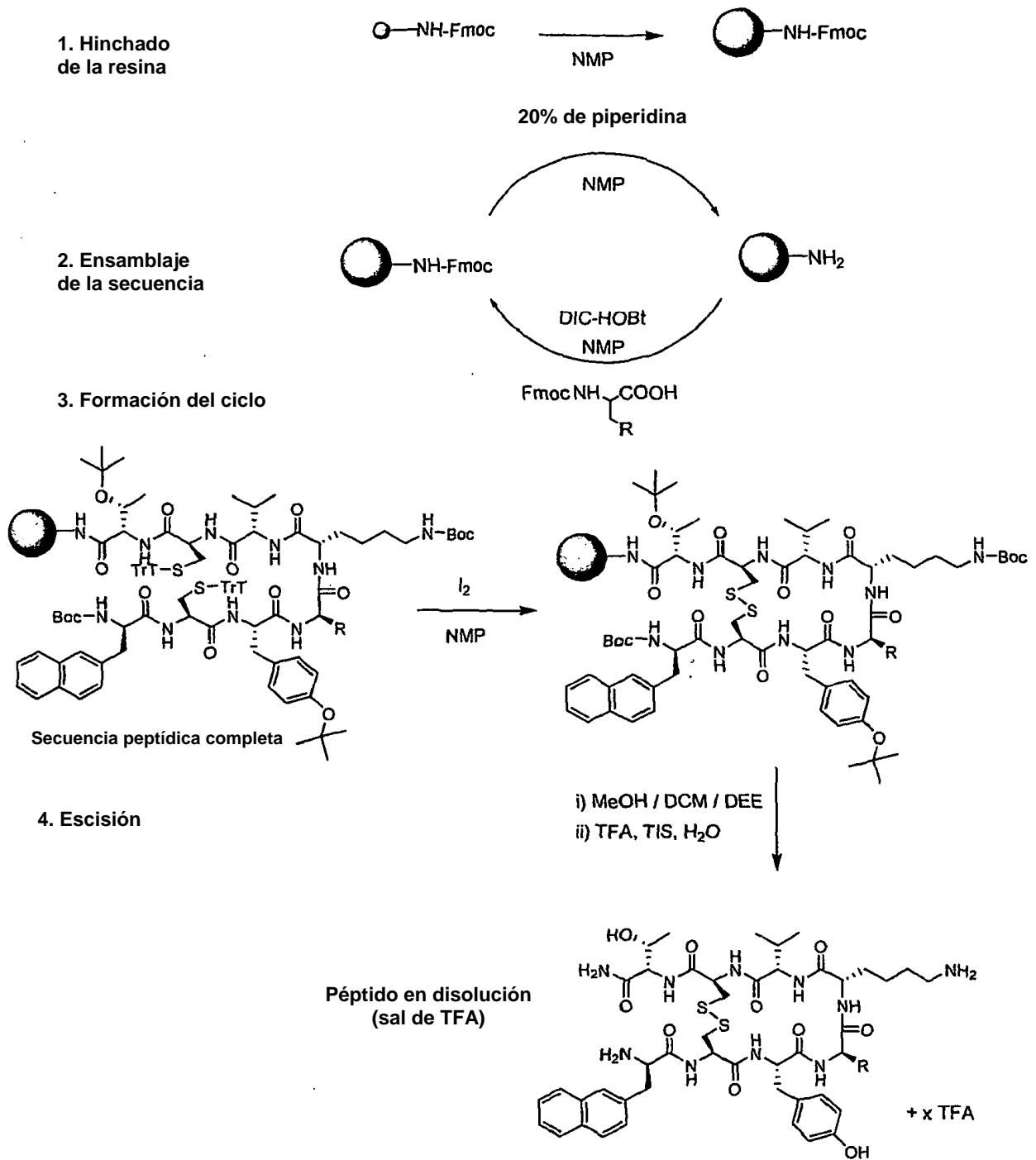
30 RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 3,04 (dd, J = 9,6, J = 13,6, 1H); 3,22-3,28 (m, 1H); 4,15 (t, J = 6,8, 1H); 4,24 (dd, J = 6,8, J = 10,4, 1H); 4,33 (dd, J = 7,2, J = 10,4, 1H); 4,50 (dd, J = 4,4, J = 9,6, 1H); 7,27 (t, J = 8, 2H); 7,36 (m, 2H); 7,42 (d, J = 8,4, 2H); 7,49-7,59 (m, 5H); 7,76 (d, J = 7,6, 2H); 7,83 (d, J = 8,4, 2H); 7,88 (dd, J = 6,8, 2H);.

EM (ESI) m/z: 492,1 [M+H]⁺

35 1.3 Preparación de compuestos octapeptídicos

1.3.1 Procedimiento general para la síntesis de péptidos

La síntesis consta de 4 etapas principales como se muestra en el esquema 1:



Esquema 1

1/ Remojo de la resina:

La resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-fluorenilmetoxicarbonil-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-(4-metil)-benzhdridlamina - base de poliestireno - divinilbenceno (Rink Amide MBHA) se introduce en una jeringa equipada con un vidrio sinterizado, una válvula en un extremo y un tapón en la otra. Se llena con la *N*-metilpirrolidona (NMP) y la mezcla se agita suavemente durante 1 h. El disolvente se elimina después por filtración.

2/ Acoplamiento de los aminoácidos:

Los aminoácidos se acoplan entre ellos en el orden deseado mediante una reacción de acoplamiento. Se introduce el aminoácido (2 eq) con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 2,2 eq) y *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC, 2,2eq) en *N*-metilpirrolidona (NMP, 5 ml/g de resina) en un tubo de ensayo, y se agita unos minutos. Después, se pone en

presencia de la resina en su recipiente. La mezcla de reacción se agita durante 1 h 30, y luego se filtra. Se utiliza la técnica del doble acoplamiento: la mezcla de reacción se filtra cuando la reacción ha avanzado aproximadamente 50 %, y se introducen reactivos frescos para optimizar la velocidad de la reacción y la pureza del producto final. La segunda etapa consiste en desproteger el nuevo aminoácido introducido para permitir un nuevo acoplamiento. La desprotección se realiza mediante tres tratamientos con piperidina en NMP (20 % v/v), 5 ml/g de resina, seguido de tres lavados con NMP (10 ml/g de resina). Con el fin de seguir la reacción, 5 µl del filtrado correspondiente al primer tratamiento, después 10 µl de los dos siguientes, así como el primer lavado, es decir, 4 muestras, se introducen en 2 ml de piperidina antes de medir la absorbancia de UV a 290 nm. Entre cada etapa, se procede a tres lavados de la resina con NMP (10 ml/g de resina). Esta etapa de ensamblaje consiste pues en dos reacciones: la reacción de acoplamiento de aminoácidos y la reacción de desprotección del grupo Fmoc, a realizar de manera iterativa hasta que se termine la secuencia peptídica.

3/ Formación del puente de disulfuro:

Una vez que se ha ensamblado la secuencia, el péptido debe ciclarse mediante la formación del puente de disulfuro. El puente de disulfuro se forma por tres tratamientos de 1 eq de yodo en NMP (5 ml/g de resina) durante respectivamente 2 min, 3 min y 5 min. La resina se lava después 5 veces con DCM y 5 veces con NMP, con el fin de eliminar el exceso de yodo retenido en la resina (10 ml/g de resina).

4/ Escisión:

La resina debe prepararse para la escisión con dos lavados con NMP, dos lavados con metanol (MeOH), dos lavados con diclorometano (DCM) y dos lavados con éter etílico (DEE) (10 ml por gramo de resina). La resina se pone después a vacío durante un día. La escisión se hace en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. La mezcla de reacción está formada por ácido trifluoroacético (TFA, 10 ml/g de resina) así como por triisopropilsilano (TIS) y agua (3 % y 2 % v/v). La reacción se agita 4 h a temperatura ambiente. El medio se filtra después sobre vidrio sinterizado y el sólido se lava dos veces con TFA. El filtrado se evapora luego para obtener un líquido blanco muy espeso. Éste se disuelve en una mezcla de agua-acetonitrilo 1:1 con el fin de someterse a liofilización. Después de esta etapa, el péptido se presenta en forma de sal de trifluoroacetato.

1.3.2 Purificación

La purificación se lleva a cabo por cromatografía líquida preparativa de alta resolución (HPLC). La fase estacionaria se denomina « inversa » pues está injertada con cadenas alquílicas C₁₈. La fase móvil están constituida por una mezcla fija (isocrática) de agua y de acetonitrilo con 0,1 % de TFA o 1 % de ácido fórmico que sirve para neutralizar los grupos de silanol no injertados residuales que puedan existir sobre la fase estacionaria.

El péptido debe disolverse en una mezcla de agua-acetonitrilo para inyectarse en la HPLC preparativa. Se realiza al principio un estudio de solubilidad sobre una pequeña cantidad. Ello permite establecer el tanto por ciento óptimo de acetonitrilo y la cantidad máxima de péptido. Las condiciones ideales las constituyen un tanto por ciento de acetonitrilo lo más reducido posible con una concentración de péptido muy elevada, y una disolución resultante clara. A modo de ejemplo, la solubilidad del derivado 4-para-fluorofenilalanina (ejemplo 13 siguiente) se ha establecido como 49 g l⁻¹ en una disolución de agua:acetonitrilo 58:42.

Después de la purificación, las fracciones que contienen el péptido purificado se reúnen y se evaporan a vacío. El péptido puro se recupera entonces en grandes cantidades de disolvente a evaporar, antes de proceder a la liofilización. El péptido se presenta en general en forma de sal de trifluoroacetato, que debe intercambiarse por acetato antes del análisis fisicoquímico.

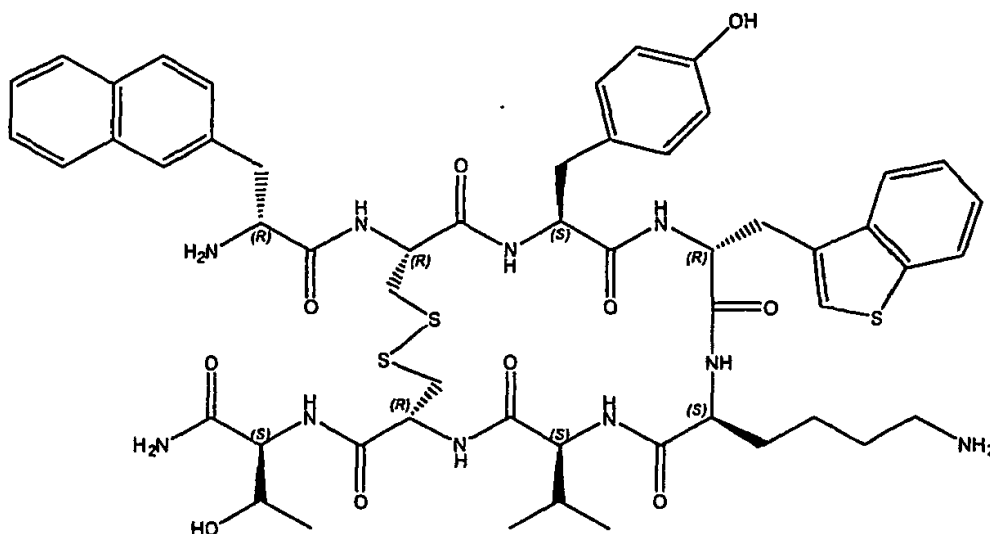
1.3.3 Intercambio de iones

El intercambio se lleva a cabo sobre una resina de tipo de intercambio de aniones fuertes (AG1-X8 Biorad). Se lavan en primer lugar 245 mg de esta resina, tres veces con 10 ml de ácido acético 1,6 N, después tres veces con 10 ml de ácido acético 0,16 M. Entonces, se introducen 20 mg de péptido en forma de sal de TFA en 4 ml de agua, y el recipiente se agita de manera rotativa durante 1 h. Luego el líquido se filtra y la resina se lava dos veces con 1 ml de agua destilada. Las fracciones se reúnen y después se liofilizan.

1.4 Ejemplos

Los productos se han caracterizado según los métodos clásicos conocidos por el especialista en la técnica descritos anteriormente.

Ejemplo 1: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-benzotienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre un soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(3-benzotienil)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

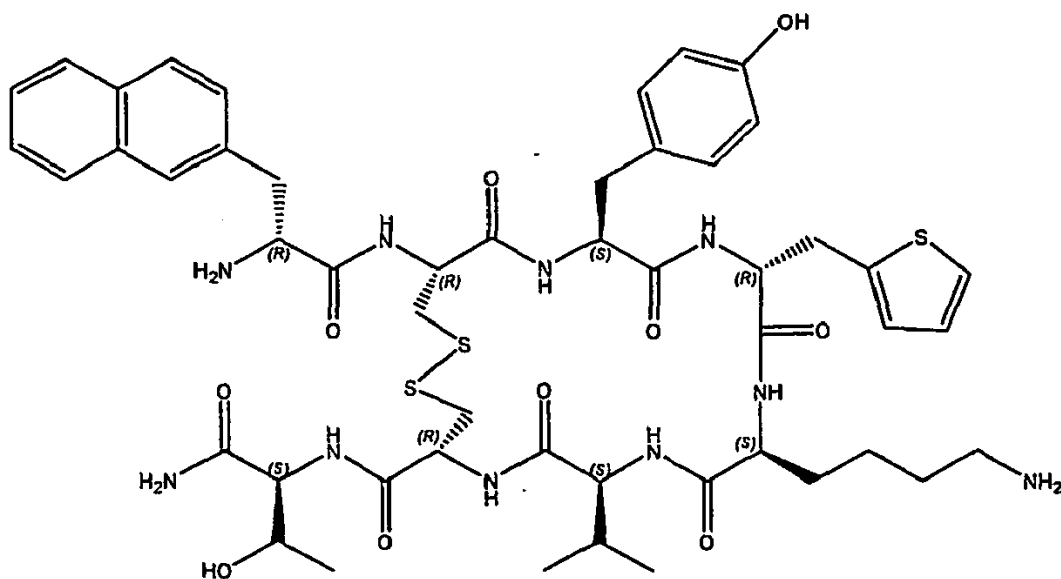
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-benzotienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,8 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,28-0,40 (m, 1H); 0,42 -0,54 (m, 1H); 0,90 (d, J = 6,6, 3H); 0,92 (d, J = 6,6, 3H); 1,20 (d, J = 6,4, 3H); 1,28-1,34 (m, 1H); 1,48 -1,62 (m, 1H); 1,90 (s, 6H); 1,90-2,20 (m, 1H); 2,44 (dd, J = 14,6, J = 4,2, 1H); 2,57 (dd, J = 14,8, J = 9,3, 1H); 2,65 -2,82 (m, 4H); 2,92 (d, J = 7,4, 2H); 3,06 (dd, J = 13,9, J = 5,5, 1H); 3,12 -3,22 (m, 1H); 3,29 (dd, J = 13,3, J = 9,5, 1H); 3,43 (dd, J = 13,5, J = 5,5, 1H); 3,81 (dd, J = 10,3, J = 3,7, 1H); 4,24 (dd, J = 6,4, J = 4,1, 1H); 4,26 -4,38 (m, 3H); 4,64 (t, J = 7,5, 2H); 6,84 (d, J = 8,2, 2H); 7,12 (d, J = 8,2, 2H); 7,31 (s, 1H); 7,38 -7,50 (m, 3H); 7,54 (dd, J = 9,4, J = 3,8, 1H); 7,55 (dd, J = 9,4, J = 3,8, 1H); 7,71 (d, J = 7,7, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,85-7,90 (m, 1H); 7,90 -7,95 (m, 2H); 7,98 (d, J = 7,5, 1H).

HRMS (H₂O) m/z: 1113,4368 [M+H]⁺ (calc. 1113,4360) C₅₄ H₆₉ N₁₀ O₁₀ S₃

Ejemplo 2: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-tienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(2-tienil)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

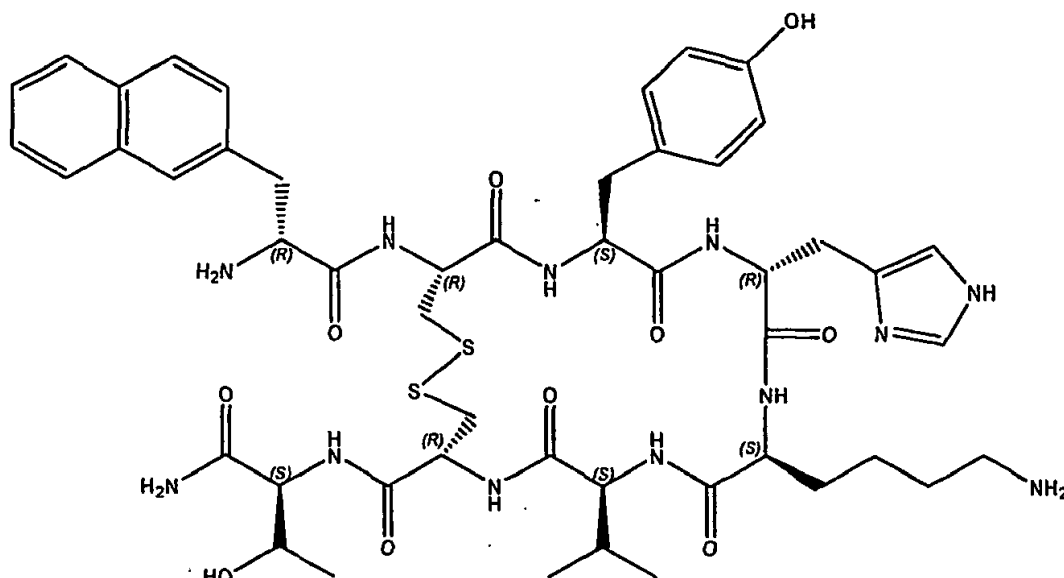
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al modo de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-tienil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,7 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,76-0,88 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,6, 3H); 0,95 (d, J = 6,6, 3H); 1,19 (d, J = 6,4, 3H); 1,40 - 1,54 (m, 3H); 1,76 - 1,88 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,14-2,26 (m, 1H); 2,41 (dd, J = 14,8, J = 3,8, 1H); 2,63 (dd, J = 15,4, J = 9,7, 1H); 2,68 (dd, J = 15,0, J = 3,6, 1H); 2,74-2,82 (m, 1H); 2,83 -2,95 (m, 4H); 3,10 (d, J = 8,0, 1H); 3,37 (dd, J = 13,6, J = 8,6, 1H); 3,47 (dd, J = 13,8, J = 5,6, 1H); 4,02 (d, J = 9,7, 1H); 4,07 (dd, J = 10,8, J = 3,5, 1H); 4,21 (qd, J = 10,4, J = 6,4, 1H); 4,28 (t, J = 8,1, 1H); 4,31 (d, J = 4,0, 1H); 4,42 (dd, J = 8,6, J = 6,2, 1H); 4,62 (t, J = 7,4, 1H); 4,89 (dd, J = 10,5, J = 3,6, 1H); 4,93 (dd, J = 10,5, J = 3,6, 1H); 6,82 (m, 3H); 6,98 (m, 2H); 7,11 (d, J = 8,4, 2H); 7,31 (d, J = 5,1, 1H); 7,47 (d, J = 8,2, 1H); 7,54 (dd, J = 9,5, J = 3,3, 1H); 7,55 (dd, J = 9,5, J = 3,3, 1H); 7,8 (s, 1H); 7,82-7,88 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1063,4230 [M+H]⁺ (calc. 1063,4204) C₅₀ H₆₇ N₁₀ O₁₀ S₃

Ejemplo 3: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-His⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-His-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

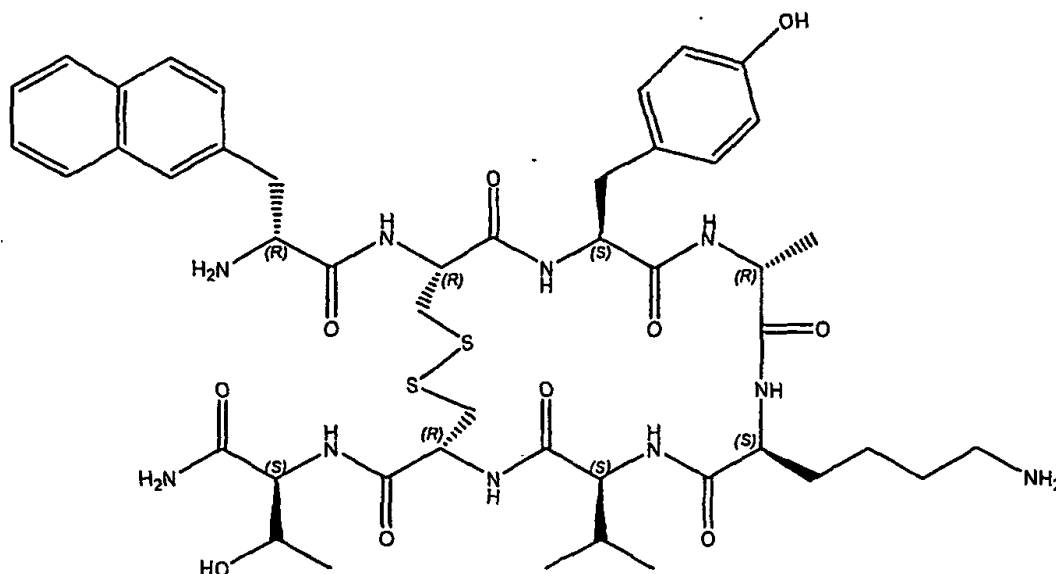
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-His⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 6,3 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,90 (d, J = 6,6, 3H); 0,94 (d, J = 6,6, 3H); 1,02 -1,14 (m, 2H); 1,17 (d, J = 6,6, 3H); 1,51 - 1,64 (m, 3H); 1,83 -1,90 (m, 1H); 1,91 (s, 6H); 2,10-2,18 (m, 1H); 2,53 (dd, J = 14,6, J = 4,4, 1H); 2,60 (dd, J = 14,8, J = 9,5, 1H); 2,70 (dd, J = 14,6, J = 4,4, 1H); 2,75 (dd, J = 14,4, J = 4,2, 1H); 2,84-2,94 (m, 5H); 2,99 (dd, J = 15,2, J = 7,2, 1H); 3,36 (dd, J = 13,9, J = 8,6, 1H); 3,46 (dd, J = 13,8, J = 5,7, 1H); 4,04 (d, J = 9,7, 1H); 4,13 -4,23 (m, 2H); 4,26 -4,32 (m, 2H); 4,40 (dd, J = 8,7, J = 5,9, 1H); 4,55 (t, J = 7,7, 1H); 4,86 (dd, J = 9,6, J = 4,4, 1H); 4,92 (dd, J = 10,4, J = 4,6, 1H); 6,74 (d, J = 8,6, 2H); 7,01 (d, J = 1,3, 1H); 7,04 (d, J = 8,6, 2H); 7,46 (dd, J = 8,5, J = 1,7, 1H); 7,52 (ddd, J = 6,7, J = 4,4, J = 1,6, 1H); 7,53 (ddd, J = 6,7, J = 4,4, J = 1,6, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,93 -7,93 (m, 3H); 8,29 (d, J = 1,1, 1H).

HRMS (H₂O) m/z: 1047,4507 [M+H]⁺ (calc. 1047,4545) C₄₉ H₆₆ N₁₂ O₁₀ S₂

Ejemplo 4: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



5 El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

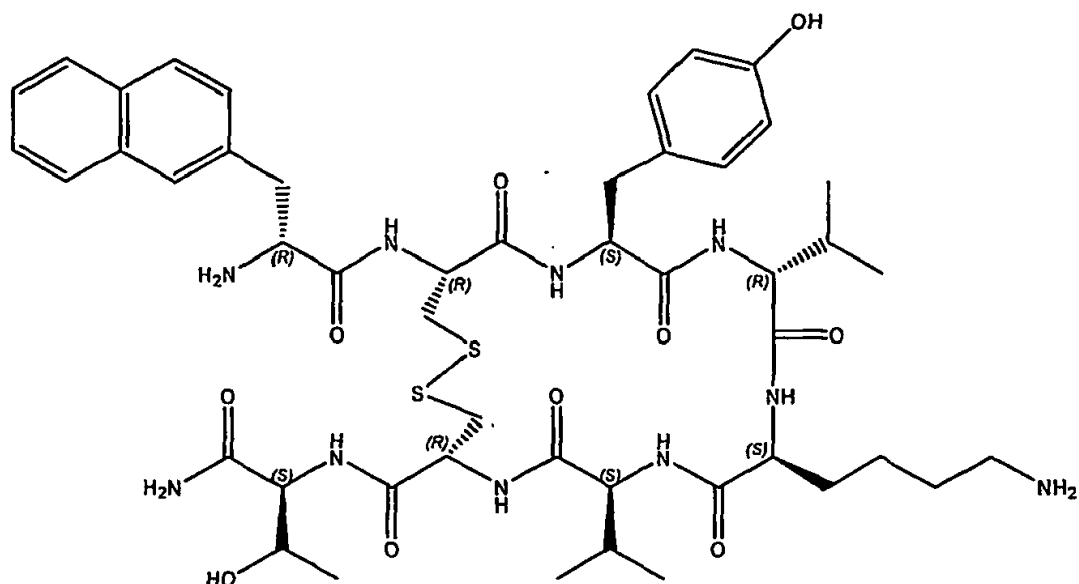
10 El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,8 min

15 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,93 (d, J = 6,6, 3H); 0,96 (d, J = 6,6, 3H); 1,18 (d, J = 7,8, 3H); 1,20 (d, J = 6,6, 3H); 1,34 -1,44 (m, 2H); 1,60-1,68 (m, 2H); 1,68 -1,80 (m, 2H); 1,90 (s, 6H); 1,92-2,20 (m, 1H); 2,12-2,22 (m, 1H); 2,45 (dd, J = 14,6, J = 4,9, 1H); 2,55 (dd, J = 14,7, J = 8,7, 1H); 2,74 (d, J = 1,3, 1H); 2,76 (s, 1H); 2,90 -3,00 (m, 4H); 3,3 (dd, J = 13,5, J = 9,1, 1H); 3,44 (dd, J = 13,7, J = 5,6, 1H); 4,04 (d, J = 9,5, 1H); 4,07 (d, J = 7,3, 1H); 4,2 (dd, J = 9,9, J = 4,1, 1H); 4,24 (dd, J = 6,5, J = 3,9, 1H); 4,28-4,32 (m, 1H); 4,33 (d, J = 4,0, 1H); 4,55 (dd, J = 7,8, J = 7,3, 1H); 4,82 -4,88 (m, 1H); 6,82 (d, J = 8,6, 2H); 7,11 (d, J = 8,6, 2H); 7,47 (dd, J = 8,5, J = 1,7, 1H); 7,54 (ddd, J = 5,7, J = 4,7, J = 2,0, 1H); 7,55 (ddd, J = 5,7, J = 4,7, J = 2,0, 1H); 7,79 (d, J = 0,9, 1H); 7,86-7,96 (m, 3H).

20 HRMS (H₂O) m/z: 1003,4161 [M+Na]⁺ (calc. 1003,4146) C₄₆ H₆₄ Na N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 5: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Val⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-Val-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

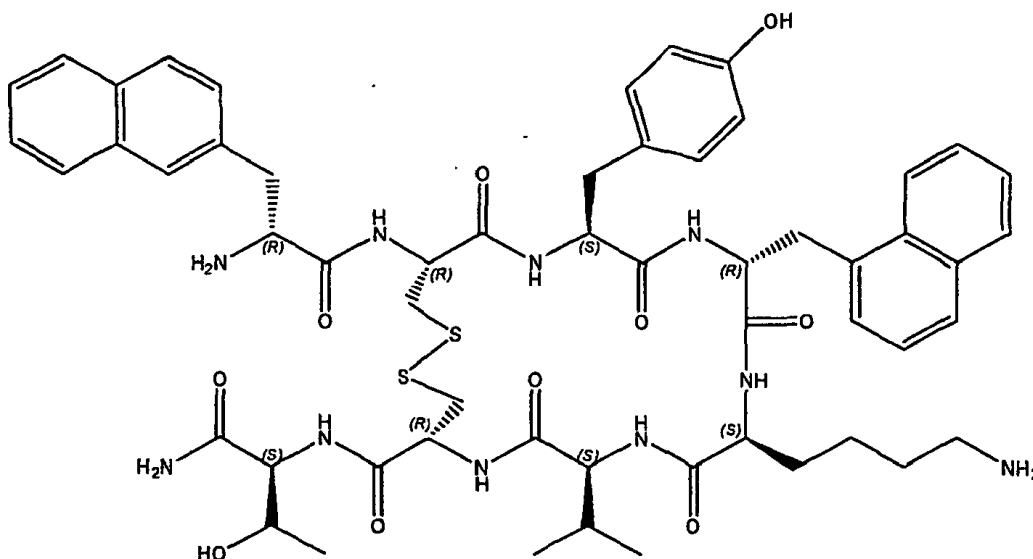
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Val⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 10,7 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,73 (d, J = 6,6, 3H); 0,80 (d, J = 6,8, 3H); 0,93 (d, J = 6,8, 3H); 0,98 (d, J = 6,6, 3H); 1,19 (d, J = 6,6, 3H); 1,30 -1,50 (m, 2H); 1,58 -1,82 (m, 4H); 1,60 -2,08 (m, 4H); 1,92 (s, 6H); 1,96-2,06 (m, 1H); 2,14 -2,24 (m, 1H); 2,51 (dd, J = 14,8, J = 3,8, 1H); 2,62 (dd, J = 14,8, J = 10,0, 1H); 2,69 (dd, J = 14,5, J = 3,5, 1H); 2,79 (dd, J = 14,9, J = 11,2, 1H); 2,88-3,00 (m, 3H); 3,37 (dd, J = 13,9, J = 8,6, 1H); 3,57 (dd, J = 13,9, J = 5,8, 1H); 3,60 (d, J = 9,7, 1H); 4,05 (d, J = 9,7, 1H); 4,21 (dd, J = 6,3, J = 3,9, 1H); 4,25 (dd, J = 10,7, J = 3,7, 1H); 4,30 (d, J = 3,8, 1H); 4,42 (dd, J = 8,6, J = 5,8, 1H); 4,61 (dd, J = 8,4, J = 6,9, 1H); 4,95 (dd, J = 9,3, J = 3,6, 1H); 4,96 (dd, J = 11,8, J = 2,9, 1H); 6,81 (d, J = 8,6, 2H); 7,12 (d, J = 8,4, 2H); 7,47 (dd, J = 8,4, J = 1,5, 1H); 7,54 (dd, J = 10,2, J = 3,8, 1H); 7,55 (dd, J = 10,2, J = 3,8, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,94 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1009,4627 [M+H]⁺ (calc. 1009,4640) C₄₈ H₆₉ N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 6: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(1-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(1-naftil)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

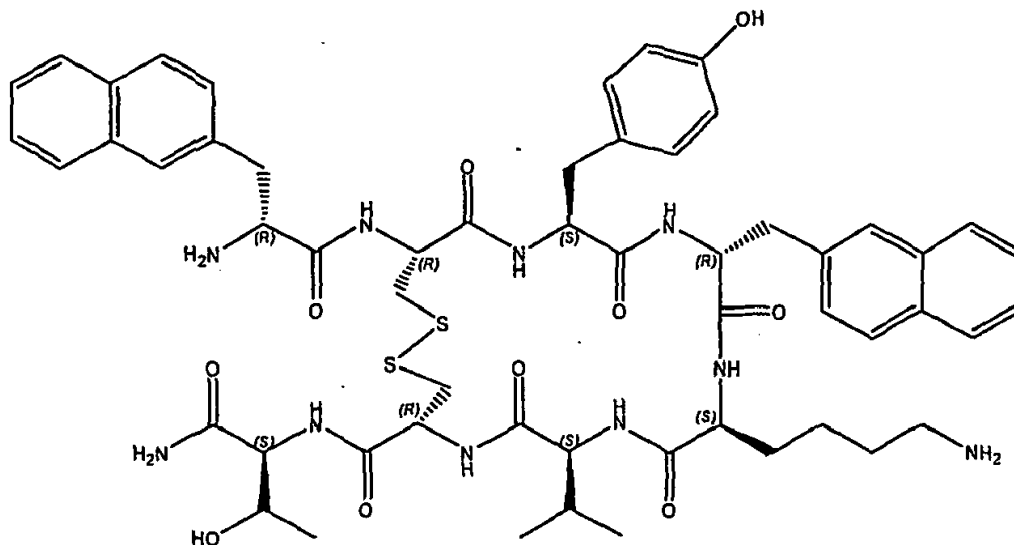
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(1-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,9 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ -0,10-0,04 (m, 1H); 0,22-0,34 (m, 1H); 0,87 (d, J = 4,6, 3H); 0,89 (d, J = 4,6, 3H); 0,98 - 1,10 (m, 1H); 1,18 (d, J = 6,4, 3H); 1,20 -1,30 (m, 1H); 1,40 -1,52 (m, 1H); 1,95 (s, 6H); 2,06 -2,18 (m, 1H); 2,42 (dd, J = 14,9, J = 3,9, 1H); 2,57 (dd, J = 14,9, J = 8,8, 1H); 2,64 (t, J = 8,0, 2H); 2,72 (dd, J = 14,8, J = 4,8, 1H); 2,78 (dd, J = 10,8, J = 4,8, 1H); 2,89 (dd, J = 13,3, J = 8,3, 1H); 2,89 (dd, J = 13,6, J = 6,8, 1H); 3,26 (d, J = 8,4, 2H); 3,34 (dd, J = 13,4, J = 9,0, 1H); 3,48 (dd, J = 13,7, J = 6,0, 1H); 3,68 (dd, J = 10,8, J = 3,7, 1H); 3,90 (d, J = 9,7, 1H); 4,21 (ddd, J = 12,7, J = 6,4, J = 4,0, 1H); 4,29 (d, J = 3,8, 1H); 4,31 (t, J = 8,6, 1H); 4,42 (dd, J = 8,7, J = 5,8, 1H); 4,66 (dd, J = 8,5, J = 6,8, 1H); 4,82-4,87 (m, 1H); 6,86 (d, J = 8,6, 2H); 7,14 (d, J = 8,6, 2H); 7,28 (d, J = 7,3, 1H); 7,45 (t, J = 7,7, 1H); 7,46 (d, J = 9,7, 1H); 7,53 (dd, J = 6,4, J = 3,5, 1H); 7,54 (dd, J = 6,4, J = 3,5, 1H); 7,57 -7,65 (m, 2H); 7,78 (s, 1H); 7,84-7,97 (m, 6H).

HRMS (H₂O) m/z: 1129,4578 [M+Na]⁺ (calc. 1129,4516) C₅₆ H₇₀ Na N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 7: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



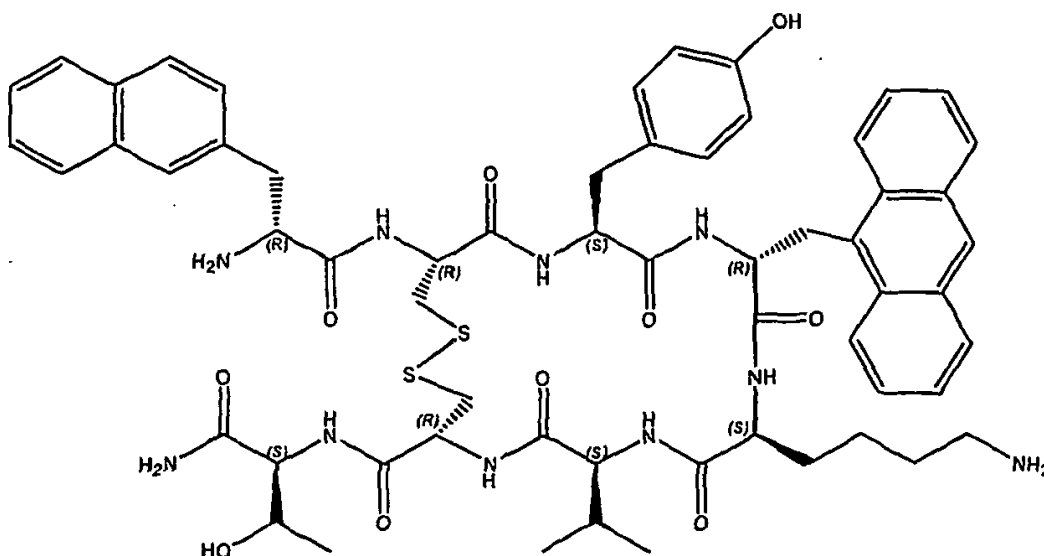
El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-naftil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 14,5 min

HRMS (H₂O) m/z: 1129,4651 [M+H]⁺ C₅₆ H₆₉ N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 8: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(9-antril)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(9-antril)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

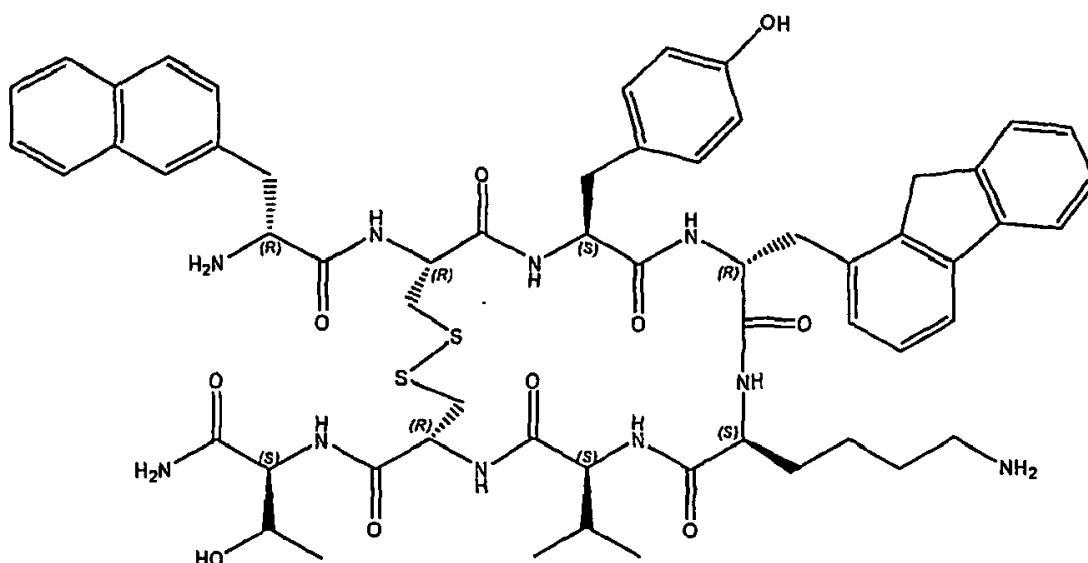
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(9-antril)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 10,1 min

- 5 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ -0,68- -0,58 (m, 1H); -0,36- -0,24 (m, 1H); 0,68-0,72 (m, 1H); 0,83 (d, J = 4,6, 3H); 0,84 (d, J = 4,7, 0,92-1,04 (m, 2H); 1,06-1,12 (m, 1H); 1,18 (d, J = 6,4, 3H); 2,0 (s, 6H); 2,0-2,08 (m, 1H); 2,4 (dd, J = 14,7, J = 4,3, 1H); 2,44-2,54 (m, 3H); 2,78 (d, J = 7,8, 2H); 2,90 (dd, J = 13,2, J = 9,6, 1H); 3,01 (dd, J = 13,3, J = 6,2, 1H); 3,26 (dd, J = 10,4, J = 4,2, 1H); 3,30-3,36 (m, 1H); 3,38-3,52 (m, 2H); 3,84 (d, J = 9,3, 1H); 3,89 (d, J = 13,5, 1H); 4,20-4,30 (m, 2H); 4,32 (d, J = 3,8, 1H); 4,42 (dd, J = 9,1, J = 5,8, 1H); 4,66 -4,76 (m, 2H); 6,97 (d, J = 8,6, 2H); 7,23 (d, J = 8,4, 2H); 7,44 (d, J = 8,6, 1H); 7,48-7,60 (m, 5H); 7,75 (s, 1H); 7,82 -7,94 (m, 5H); 8,05 (d, J = 8,0, 2H); 8,4 (s, 1H).

HRMS (H₂O) m/z: 1157,4919 [M+H]⁺ (calc. 1157,4953) C₆₀ H₇₃ N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 9: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-fluorenil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



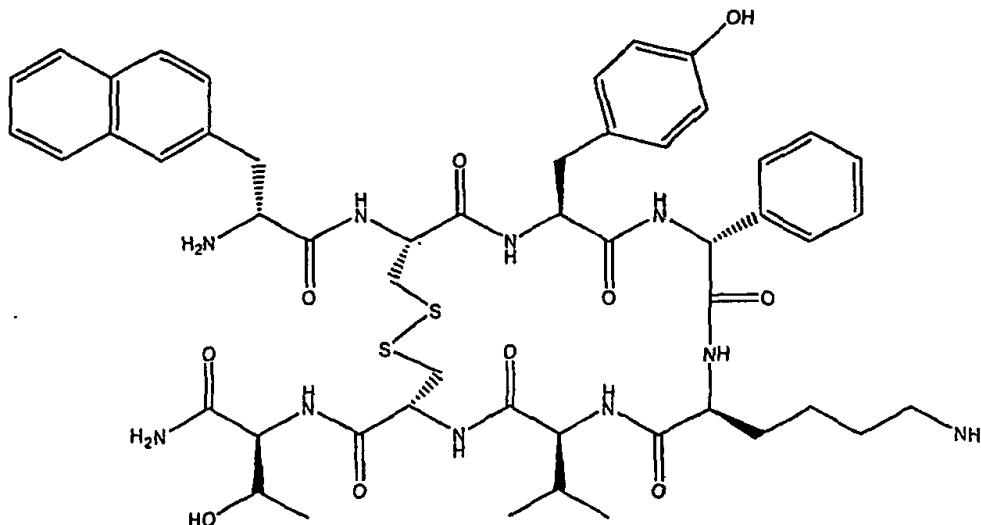
- 15 El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-β-(2-fluorenil)-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.
- 20 El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(2-fluorenil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,8 min

- 25 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,08-0,20 (m, 1H); 0,32-0,44 (m, 1H); 0,88 (d, J = 6,7, 3H); 0,91 (d, J = 6,6, 3H); 0,96 (t, J = 7,8, 2H); 1,17 (d, J = 6,4, 3H); 1,48-1,60 (m, 1H); 1,96 (s, 6H); 1,80-2,08 (m, 2H); 2,10-2,20 (m, 1H); 2,45 (dd, J = 14,7, J = 3,7, 1H); 2,61 (dd, J = 14,8, J = 9,7, 1H); 2,68 (dd, J = 14,8, J = 3,7, 1H); 2,76 (d, J = 11,0, 1H); 2,81 (dd, J = 11,9, J = 9,2, 1H); 2,88-3,00 (m, 3H); 3,35 (dd, J = 13,7, J = 8,8, 1H); 3,46 (dd, J = 13,7, J = 5,8, 1H); 3,80 (dd, J = 11,0, J = 3,2, 1H); 3,88 (s, 2H); 3,92 (d, J = 9,8, 1H); 4,19 (dd, J = 6,5, J = 3,7, 1H); 4,21 (dd, J = 11,8, J = 5,4, 1H); 4,29 (d, J = 3,8, 1H); 4,41 (dd, J = 8,8, J = 5,8, 1H); 4,63 (t, J = 7,5, 1H); 4,86 (dd, J = 11,7, J = 5,8, 1H); 4,90 (dd, J = 11,7, J = 5,8, 1H); 6,81 (d, J = 8,6, 2H); 7,11 (d, J = 8,6, 2H); 7,17 (d, J = 8,0, 1H); 7,43 (d, J = 1,0, 1H); 7,7 (dd, J = 7,4, J = 1,1, 1H); 7,40-7,48 (m, 2H); 7,52 (dd, J = 9,9, J = 3,5, 1H); 7,52 (dd, J = 9,9, J = 3,1, 1H); 7,62 (d, J = 7,3, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,79 (d, J = 7,8, 1H); 7,82-7,92 (m, 4H).

HRMS (H₂O) m/z: 1167,4774 [M+Na]⁺ (calc. 1167,4772) C₅₉ H₇₂ Na N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 10: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Phg⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-Phg-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

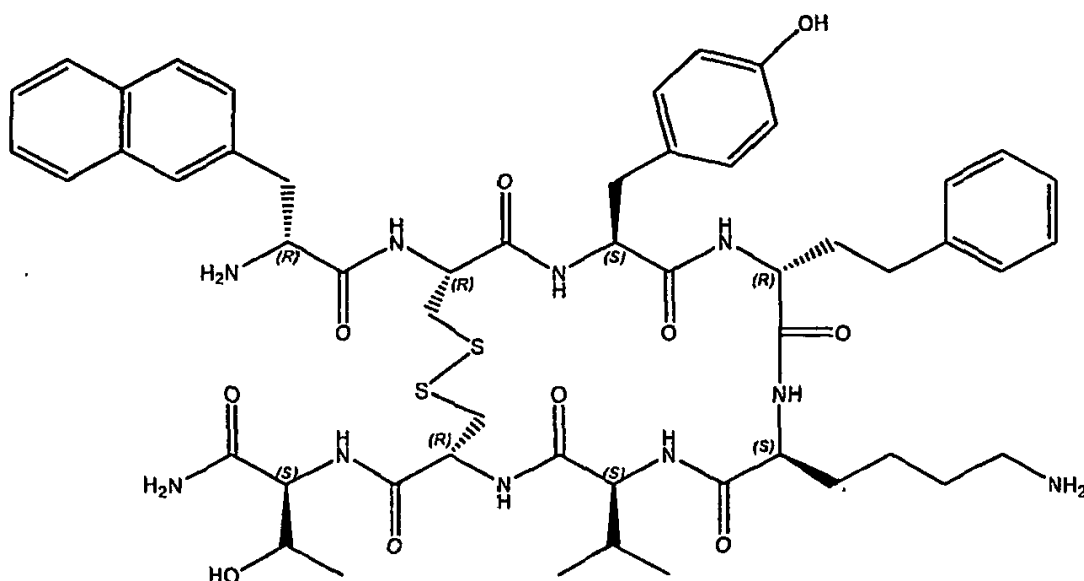
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Phg⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,9 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,93 (d, J = 7,0, 3H); 0,96 (d, J = 6,8, 3H); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,20 (d, J = 6,4, 3H); 1,47 (q, J = 7,8, 2H); 1,61-1,72 (m, 1H); 1,82 -1,92 (m, 1H); 1,97 (s, 6H); 2,12-2,20 (m, 1H); 2,40 (t, J = 8,3, 1H); 2,48 (d, J = 6,5, 2H); 2,68 -2,89 (m, 6H); 2,95 (dd, J = 13,3, J = 6,0, 1H); 3,31 (dd, J = 13,0, J = 9,1, 1H); 3,42-3,51 (m, 1H); 4,11 (d, J = 8,4, 1H); 4,14 (dd, J = 10,0, J = 4,2, 1H); 4,39 (dd, J = 9,1, J = 6,0, 1H); 4,60 (dd, J = 9,2, J = 6,5, 1H); 4,66 (t, J = 6,6, 1H); 4,70-4,78 (m, 2H); 6,69 (d, J = 8,1, 2H); 7,03 (d, J = 8,4, 2H); 7,15 (d, J = 6,4, 2H); 7,32-7,42 (m, 3H); 7,46 (dd, J = 8,7, J = 0,5, 1H); 7,52-7,60 (m, 2H); 7,78 (sa, 1H); 7,88-7,98 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1065,4276 [M+Na]⁺ (calc. 1065,4303) C₅₁ H₆₆ Na N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 11: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Homophe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



ES 2 426 125 T3

El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-Homophe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

5

El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Homophe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

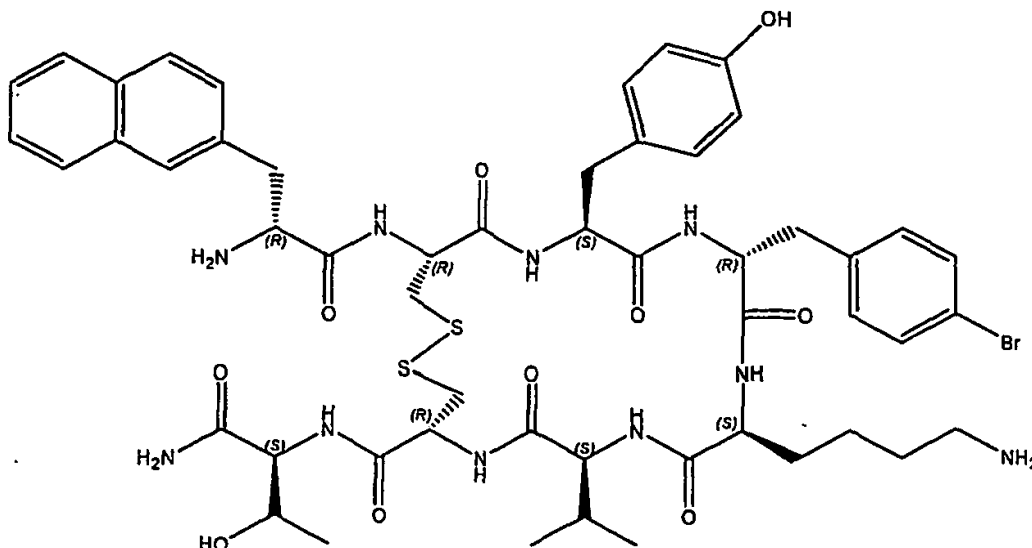
HPLC: tr = 8,87 min

10 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,89 (d, J = 6,7, 3H); 0,92 (d, J = 6,7, 3H); 1,17 (d, J = 6,4, 3H); 1,26-1,36 (m, 2H); 1,54-1,68 (m, 3H); 1,76 -1,84 (m, 2H); 1,86-1,92 (m, 1H); 2,08-2,18 (m, 1H); 1,94 (s, 6H); 2,27 (ddd, J = 14,0, J = 7,9, J = 5,9, 1H); 2,36 (ddd, J = 14,2, J = 6,4, J = 5,6, 1H); 2,48 (dd, J = 14,7, J = 4,8, 1H); 2,56 (dd, J = 14,8, J = 8,8, 1H); 2,72 (d, J = 3,7, 1H); 2,74 (s, 1H); 2,84-2,82 (m, 3H); 2,96 (dd, J = 13,4, J = 5,9, 1H); 3,34 (dd, J = 13,8, J = 8,9, 1H); 3,47 (J = 13,7, J = 5,8, 1H); 3,88 (dd, J = 8,5, J = 6,3, 1H); 4,02 (d, J = 9,5, 1H); 4,14 (dd, J = 9,9, J = 4,3, 1H); 4,21 (dd, J = 6,5, J = 3,9, 1H); 4,30 (d, J = 3,9, 1H); 4,40 (dd, J = 8,9, J = 6,0, 1H); 4,61 (dd, J = 9,9, J = 6,1, 1H); 4,80-4,88 (m, 2H); 6,82 (d, J = 8,6, 2H); 7,03 (dd, J = 6,9, J = 1,4, 1H); 7,14 (d, J = 8,6, 2H); 7,22-7,28 (m, 1H); 7,28-7,34 (m, 2H); 7,45 (dd, J = 8,5, J = 1,7, 1H); 7,52 (ddd, J = 6,9, J = 5,1, J = 2,0, 1H); 7,53 (ddd, J = 6,9, J = 5,1, J = 2,0, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,86-7,93 (m, 3H).

15

HRMS (H₂O) m/z: 1129,4609 [M+H]⁺ (calc. 1093,4616) C₅₃ H₇₀ Na N₁₀ O₁₀ S₂

20 Ejemplo 12: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-p-Br-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

25

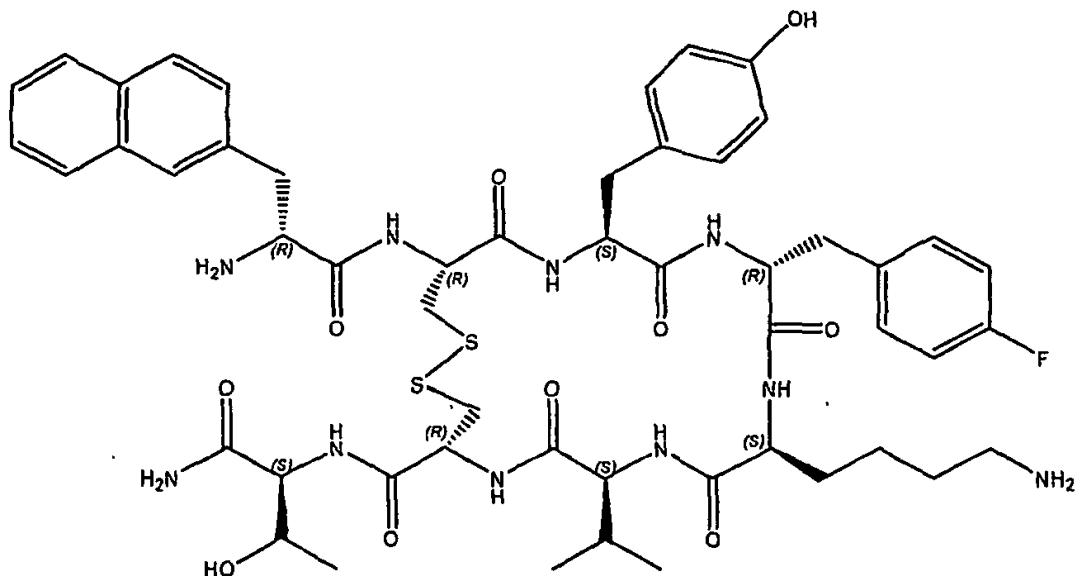
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

30 HPLC: tr = 9,5 min

35 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,50-0,62 (m, 1H); 0,70-0,82 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,8, 3H); 0,99 (d, J = 6,6, 3H); 1,18 (d, J = 6,6, 3H); 1,30-1,42 (m, 1H); 1,42 -1,52 (m, 2H); 1,70-1,80 (m, 1H); 1,96 (s, 6H); 2,12-2,28 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 14,8, J = 3,6, 1H); 2,63 (dd, J = 14,6, J = 9,8, 1H); 2,68 (dd, J = 14,7, J = 3,7, 1H); 2,80-2,82 (m, 2H); 2,84-2,96 (m, 4H); 3,36 (dd, J = 13,7, J = 8,7, 1H); 3,48 (dd, J = 13,5, J = 6,2, 1H); 3,95 (dd, J = 11,1, J = 3,5, 1H); 3,98 (d, J = 10,0, 1H); 4,18-4,24 (m, 2H); 4,30 (d, J = 3,8, 1H); 4,42 (dd, J = 8,6, J = 6,0, 1H); 4,62 (t, J = 7,1, 1H); 4,88-4,94 (m, 2H); 6,82 (d, J = 8,6, 2H); 7,07 (d, J = 8,4, 2H); 7,10 (d, J = 8,6, 2H); 7,48-7,52 (m, 3H); 7,53 (dd, J = 9,5, J = 3,3, 1H); 7,55 (dd, J = 9,5, J = 3,7, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,94 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1157,3549 y 1159,3585 [M+Na]⁺ (calc. 1157,3564 y 1159,3544) C₅₂ H₆₇ Br Na N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 13: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-p-F-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

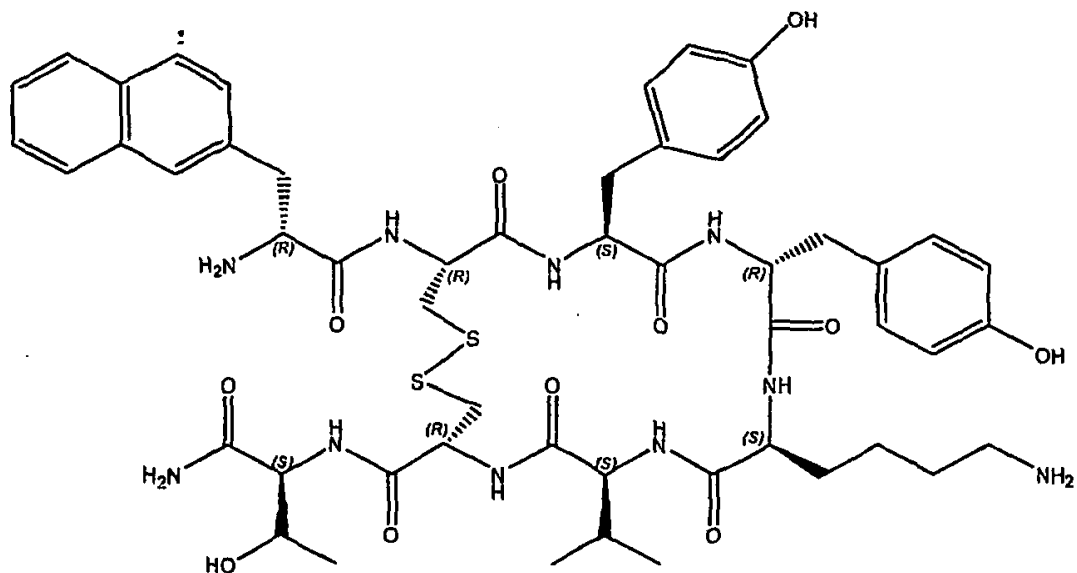
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,7 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,50-0,62 (m, 1H); 0,72-0,84 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,8, 3H); 0,93 (d, J = 6,6, 3H); 1,18 (d, J = 6,4, 3H); 1,30-1,50 (m, 4H); 1,70-1,80 (m, 1H); 2,02 (s, 6H); 2,14-2,26 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 15,0, J = 3,8, 1H); 2,63 (dd, J = 14,8, J = 9,9, 1H); 2,68 (dd, J = 14,8, J = 3,4, 1H); 2,74-2,98 (m, 6H); 3,37 (dd, J = 13,8, J = 8,8, 1H); 3,48 (dd, J = 13,7, J = 6,0, 1H); 3,92-4,02 (m, 2H); 4,18-4,24 (m, 2H); 4,30 (d, J = 3,8, 1H); 4,43 (dd, J = 8,7, J = 5,9, 1H); 4,62 (t, J = 7,5, 1H); 4,88-4,96 (m, 2H); 6,81 (d, J = 8,4, 2H); 7,04-7,18 (m, 6H); 7,47 (dd, J = 8,5, J = 1,5, 1H); 7,54 (dd, J = 9,7, J = 3,4, 1H); 7,54 (dd, J = 9,6, J = 3,4, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,96 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1097,4332 [M+Na]⁺ (calc. 1097,4365) C₅₂H₆₇F N₁₀O₁₀S₂

Ejemplo 14: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Tyr⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-D-Tyr-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

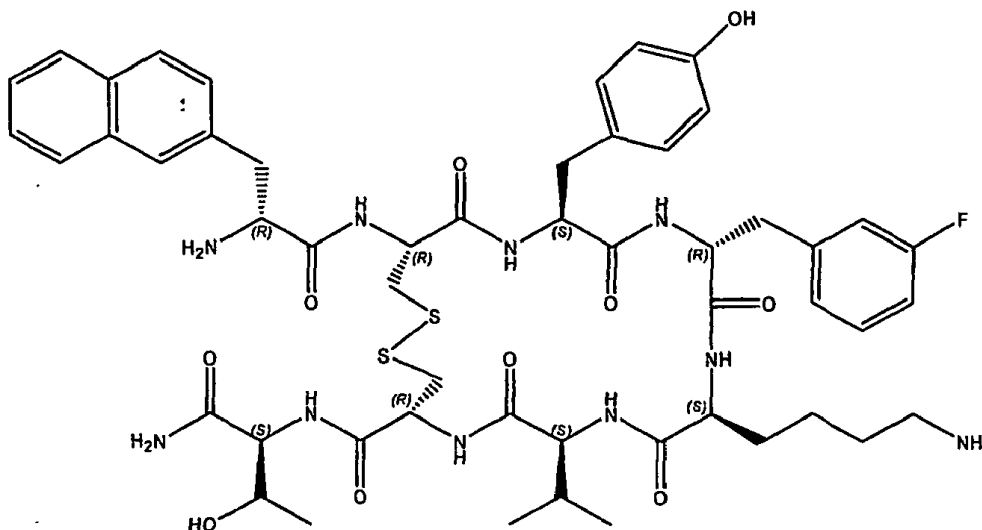
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Tyr⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 7,7 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,50-0,64 (m, 1H); 0,66-0,80 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,6, 3H); 0,93 (d, J = 6,6, 3H); 1,20 (d, J = 6,4, 3H); 1,28-1,48 (m, 3H); 1,66-1,78 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,12-2,24 (m, 1H); 2,41 (dd, J = 14,8, J = 3,7, 1H); 2,55 (dd, J = 14,8, J = 9,5, 1H); 2,64-2,96 (m, 7H); 3,20 (dd, J = 13,4, J = 9,1, 1H); 3,33 (dd, J = 13,2, J = 5,7, 1H); 3,92 (dd, J = 11,0, J = 3,2, 1H); 3,97 (d, J = 9,7, 1H); 4,10-4,20 (m, 2H); 4,24 (qd, J = 10,5, J = 6,4, 1H); 4,32 (d, J = 3,8, 1H); 4,60 (t, J = 7,3, 1H); 6,80 (t, J = 8,3, 4H); 7,02 (d, J = 8,2, 2H); 7,09 (d, J = 8,4, 2H); 7,43 (d, J = 8,4, 1H); 7,48-7,56 (m, 2H); 7,73 (s, 1H); 7,80-7,92 (m, 4H).

HRMS (H₂O) m/z: 1073,4578 [M+H]⁺ (calc. 1073,4589) C₅₂ H₆₉ N₁₀ O₁₁ S₂

Ejemplo 15: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-*m*-F-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

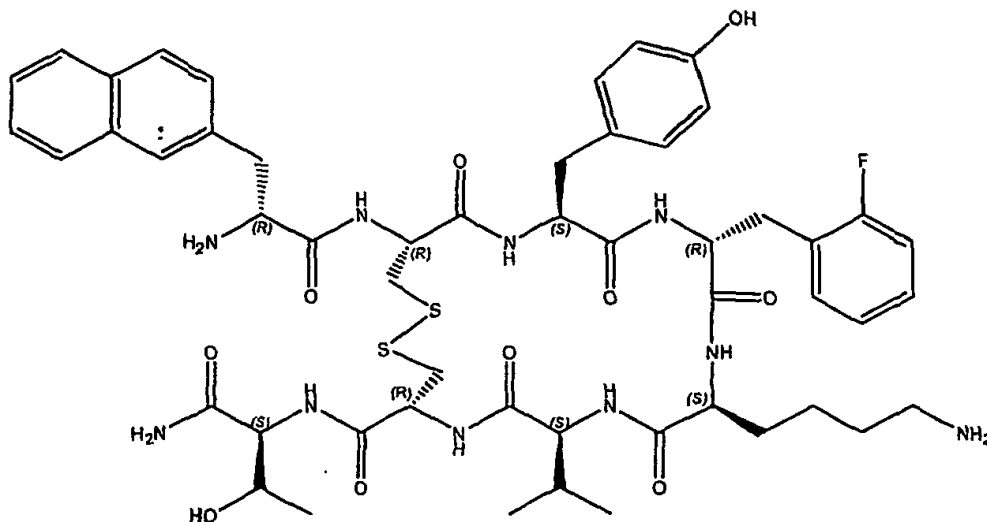
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,1 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,60-0,72 (m, 1H); 0,74-0,88 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,7, 3H); 0,95 (d, J = 6,4, 3H); 1,20 (d, J = 6,7, 3H); 1,34-1,51 (m, 3H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,90 (s, 1H); 2,15-2,24 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 14,7, J = 3,9, 1H); 2,61 (dd, J = 14,8, J = 9,8, 1H); 2,70 (dd, J = 14,5, J = 3,6, 1H); 2,74-2,84 (m, 4H); 2,86-2,94 (m, 3H); 3,32 (dd, J = 13,8, J = 8,8, 1H); 3,44 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H); 4,00 (d, J = 9,9, 1H); 4,01 (d, J = 10,8, 1H); 4,23 (dd, J = 6,4, J = 3,8, 1H); 4,25 (dd, J = 10,4, J = 6,4, 1H); 4,32-4,36 (m, 2H); 4,61 (dd, J = 7,1, J = 7,9, 1H); 4,88 (dd, J = 10,0, J = 3,9, 1H); 4,91 (dd, J = 11,5, J = 3,5, 1H); 6,82 (d, J = 8,5, 2H); 6,93 (da, J = 9,7, 1H); 6,98 (d, J = 7,7, 1H); 7,01-7,08 (m, 1H); 7,10 (d, J = 8,5, 2H); 7,35 (dd, J = 14,7, J = 7,9, 1H); 7,47 (dd, J = 8,6, J = 1,3, 1H); 7,52-7,57 (m, 2H); 7,80 (sa, 1H); 7,86-7,89 (m, 1H); 7,90-7,94 (m, 2H).

HRMS (H₂O + ACN) m/z: 1075,4492 [M+H]⁺ (calc. 1075,4545) C₅₂ H₆₈ F N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 16: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-o-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-o-F-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

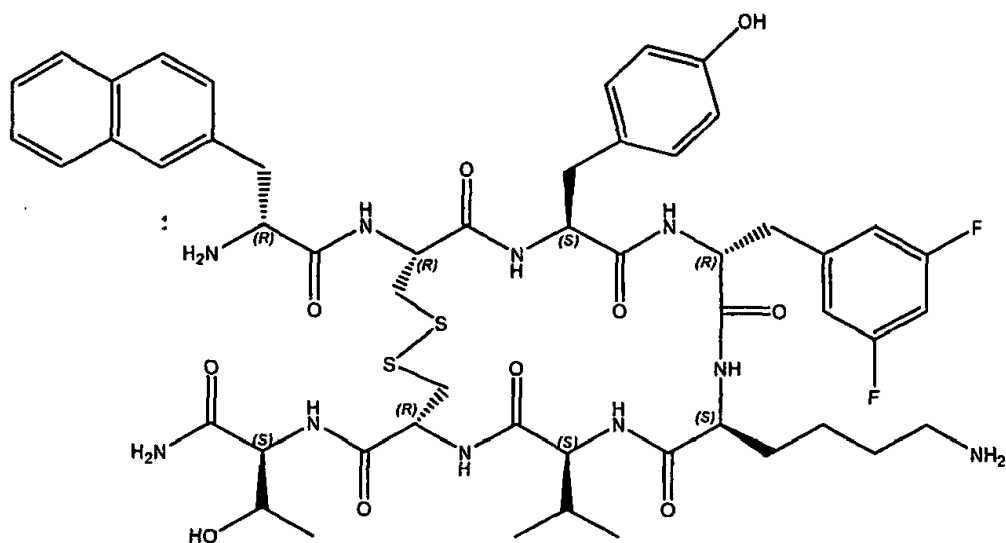
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-o-F-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,1 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,58-0,70 (m, 1H); 0,74-0,86 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,6, 3H); 0,94 (d, J = 6,7, 3H); 1,19 (d, J = 6,4, 3H); 1,33-1,51 (m, 4H); 1,70 -1,80 (m, 1H); 1,97 (s, 6H); 2,12-2,25 (m, 1H); 2,47 (da, J = 13,3, 1H); 2,61 (dd, J = 14,6, J = 9,3, 1H); 2,64-2,86 (m, 4H); 2,86-2,96 (m, 3H); 3,31-3,41 (m, 1H); 3,42-3,52 (m, 1H); 3,99 (d, J = 10,0, 2H); 4,18-4,22 (m, 1H); 4,28 (dd, J = 10,3, J = 6,1, 1H); 4,31 (d, J = 4,3, 1H); 4,42 (sa, 1H); 4,62 (dd, J = 7,5, J = 7,0, 1H); 4,83-4,93 (m, 2H); 6,82 (d, J = 7,9, 2H); 7,06-7,18 (m, 5H); 7,28-7,36 (m, 1H); 7,48 (da, J = 7,3, 1H); 7,56 (sa, 2H); 7,80 (sa, 1H); 7,84-7,98 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1075,4514 [M+H]⁺ (calc, 1075,4545) C₅₂ H₆₈ N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 17: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-3,5-diF-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el

orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-3,5-diF-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

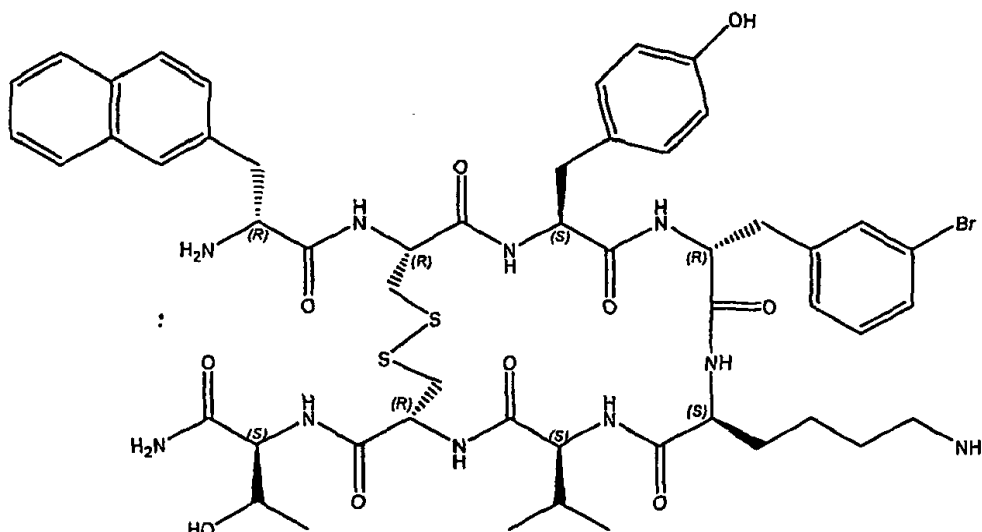
- 5 El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-3,5-diF-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁵-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 8,8 min

10 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,75-0,85 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,6, 3H); 0,96 (d, J = 6,6, 3H); 1,20 (d, J = 6,6, 3H); 1,40-1,55 (m, 3H); 1,77-1,87 (m, 1H); 1,90 (s, 6H); 2,20 (dd, J = 13,2, J = 6,6, 1H); 2,49 (dd, J = 14,8, J = 4,0, 1H); 2,62 (dd, J = 14,7, J = 9,8, 1H); 2,70 (dd, J = 14,7, J = 3,8, 1H); 2,79 (dd, J = 14,7, J = 11,4, 1H); 2,81-2,95 (m, 6H); 3,34 (dd, J = 13,6, J = 9,0, 1H); 3,45 (dd, J = 13,6, J = 5,8, 1H); 4,01 (d, J = 9,9, 1H); 4,06 (dd, J = 10,8, J = 3,6, 1H); 4,20-4,28 (m, 2H); 4,33 (d, J = 3,8, 1H); 4,35 (dd, J = 8,8, J = 6,0, 1H); 4,61 (d, J = 7,7, 1H); 4,89 (dd, J = 9,8, J = 4,1, 1H); 4,92 (dd, J = 11,3, J = 3,6, 1H); 6,75-6,84 (m, 4H); 6,86-6,92 (m, 1H); 7,09 (d, J = 8,6, 2H); 7,48 (dd, J = 8,2, J = 1,1, 1H); 7,52-7,59 (m, 2H); 7,80 (s, 1H); 7,85-7,95 (m, 3H).

15 HRMS (H₂O) m/z: 1093,4406 [M+H]⁺ (calc. 1093,4451) C₅₂ H₆₇ N₁₀ O₁₀ F₂ S₂

Ejemplo 18: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



- 20 El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-*m*-Br-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

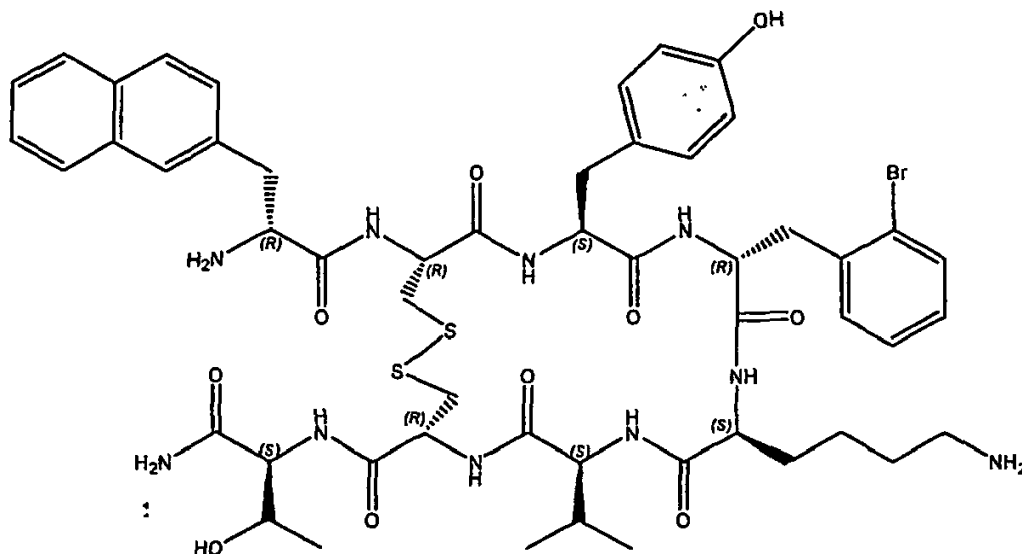
- 25 El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*m*-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,0 min

30 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,52-0,68 (m, 1H); 0,76-0,90 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,8, 3H); 0,95 (d, J = 6,6, 3H); 1,21 (d, J = 6,4, 3H); 1,30-1,54 (m, 3H); 1,70-1,82 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,12-2,27 (m, 1H); 2,48 (dd, J = 14,8, J = 3,7, 1H); 2,63 (dd, J = 14,8, J = 9,7, 1H); 2,70 (dd, J = 14,5, J = 3,5, 1H); 2,74-2,99 (m, 7H); 2,28 (dd, J = 14,0, J = 9,1, 1H); 3,49 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H); 3,95-4,05 (m, 2H); 4,19-4,27 (m, 2H); 4,32 (d, J = 3,8, 1H); 4,43 (dd, J = 8,7, J = 5,7, 1H); 4,63 (dd, J = 7,7, J = 7,2, 1H); 4,87-4,95 (m, 1H); 6,83 (d, J = 8,1, 2H); 7,11 (d, J = 8,4, 2H); 7,16 (d, J = 7,5, 1H); 7,27 (t, J = 7,8, 1H); 7,36 (s, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,50 (s, 1H); 7,53-7,60 (m, 2H); 7,81 (s, 1H); 7,86-7,96 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1135,3741 y 1137,3704 [M+H]⁺ (calc. 1135,3745 y 1137,3724) C₅₂ H₆₈ Br N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 19: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-o-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-o-Br-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

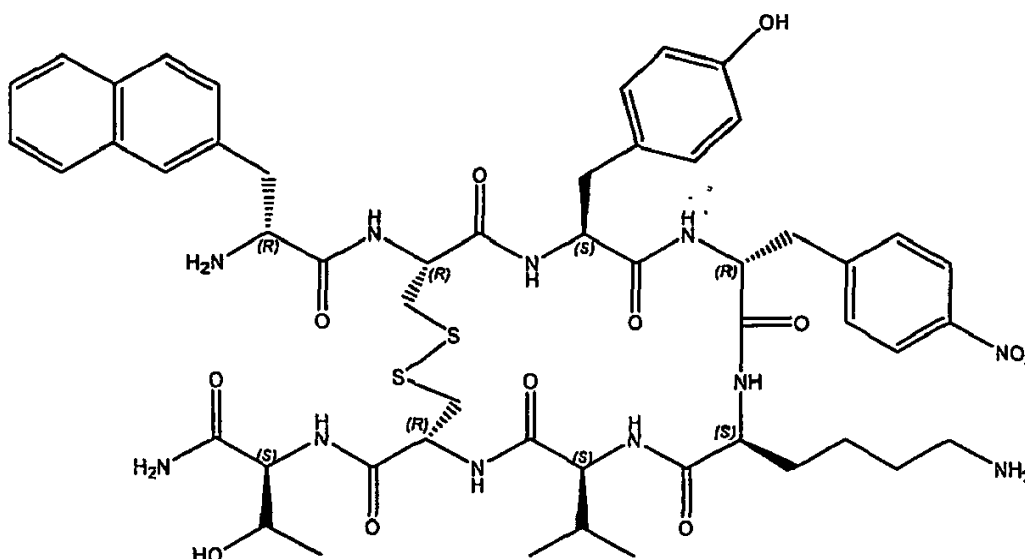
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-o-Br-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,3 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,52-0,68 (m, 1H); 0,76-0,90 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,8, 3H); 0,95 (d, J = 6,6, 3H); 1,21 (d, J = 6,4, 3H); 1,30-1,54 (m, 3H); 1,70-1,82 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,12-2,27 (m, 1H); 2,48 (dd, J = 14,8, J = 3,7, 1H); 2,63 (dd, J = 14,8, J = 9,7, 1H); 2,70 (dd, J = 14,5, J = 3,5, 1H); 2,74-2,99 (m, 7H); 2,28 (dd, J = 14,0, J = 9,1, 1H); 3,49 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H); 3,95-4,05 (m, 2H); 4,19-4,27 (m, 2H); 4,32 (d, J = 3,8, 1H); 4,43 (dd, J = 8,7, J = 5,7, 1H); 4,63 (dd, J = 7,7, J = 7,2, 1H); 4,87-4,95 (m, 1H); 6,83 (d, J = 8,1, 2H); 7,11 (d, J = 8,4, 2H); 7,16 (d, J = 7,5, 1H); 7,27 (t, J = 7,8, 1H); 7,36 (s, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,50 (s, 1H); 7,53-7,60 (m, 2H); 7,81 (s, 1H); 7,86-7,96 (m, 3H).

HRMS (H₂O) m/z: 1135,3749 y 1137,3723 [M+H]⁺ (calc. 1135,3745 y 1137,3724) C₅₂ H₆₈ Br N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 20: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-nitro-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-*p*-nitro-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

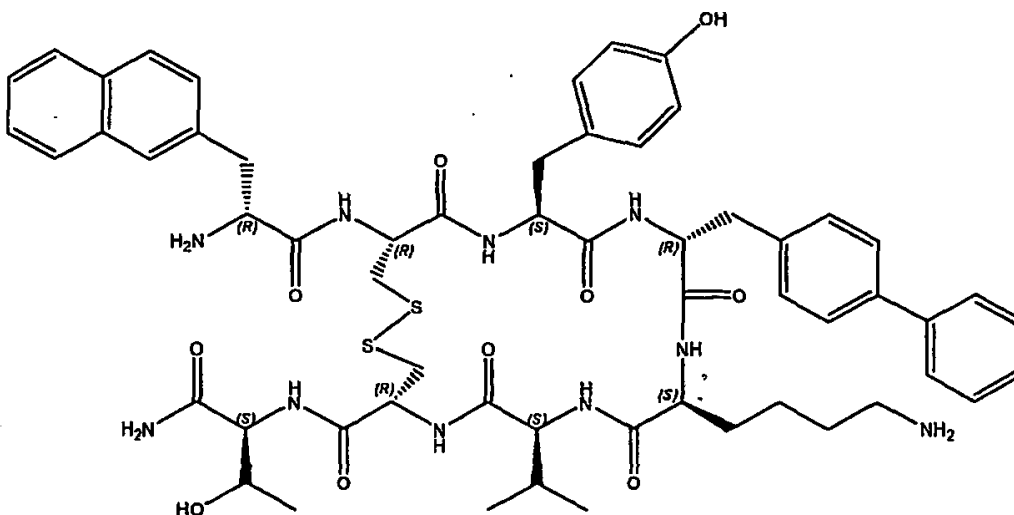
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-nitro-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,6 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,64-0,76 (m, 1H); 0,78-0,90 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,7, 3H); 0,94 (d, J = 6,6, 3H); 1,19 (d, J = 6,5, 3H); 1,35-1,47 (m, 3H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,11-2,21 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 14,6, J = 4,0, 1H); 2,59 (dd, J = 14,7, J = 9,8, 1H); 2,69 (dd, J = 14,7, J = 3,9, 1H); 2,72-2,81 (m, 3H); 2,84 (d, J = 8,0, 2H); 2,94 (d, J = 2,9, 1H); 3,00 (s, 1H); 3,30 (dd, J = 13,6, J = 9,0, 1H); 3,42 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H); 3,99 (m, 2H); 4,21 (dd, J = 6,6, J = 4,0, 1H); 4,26-4,34 (m, 3H); 4,59 (t, J = 7,6, 1H); 4,82-4,92 (m, 3H); 6,75 (d, J = 8,5, 2H); 7,05 (d, J = 8,5, 2H); 7,35 (d, J = 8,7, 2H); 7,46 (dd, J = 8,6, J = 1,2, 1H); 7,50-7,56 (m, 2H); 7,78 (sa, 1H); 7,84-7,88 (m, 1H); 7,88-7,94 (m, 2H).

HRMS (H₂O) m/z: 1102,4476 [M+H]⁺ (calc. 1102,4490) C₅₂ H₆₈ N₁₁ O₁₂ S₂

Ejemplo 21: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Ph-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-*p*-Ph-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

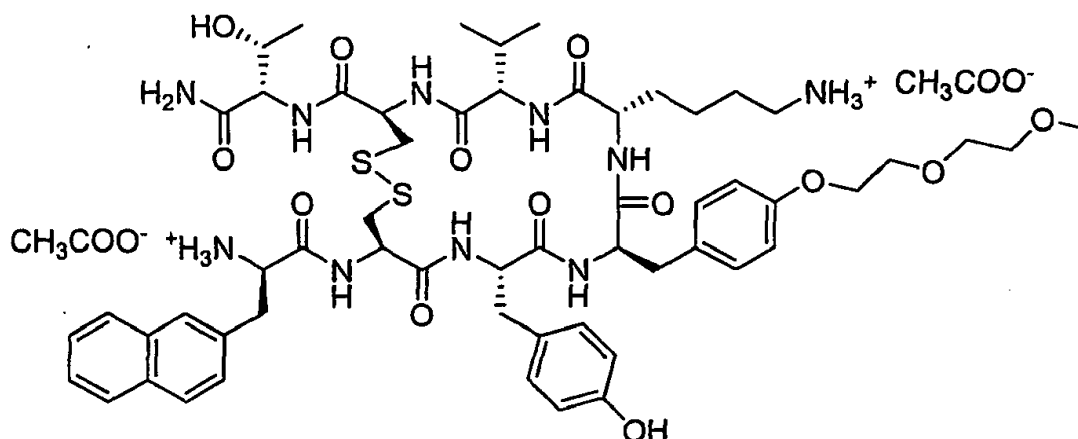
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-*p*-Ph-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,9 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,51-0,62 (m, 1H); 0,62-0,72 (m, 1H); 0,90 (d, J = 6,6, 3H); 0,93 (d, J = 6,6, 3H); 1,20 (d, J = 6,3, 3H); 1,23-1,28 (m, 1H); 1,28-1,36 (m, 1H); 1,62-1,73 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,12-2,24 (m, 1H); 2,35-2,46 (m, 3H); 2,54 (dd, J = 14,6, J = 9,5, 1H); 2,67-2,82 (m, 2H); 2,82-2,98 (m, 4H); 3,20 (dd, J = 13,3, J = 9,2, 1H); 3,36 (dd, J = 13,4, J = 5,6, 1H); 3,91 (dd, J = 10,9, J = 3,4, 1H); 3,96 (d, J = 9,8, 1H); 4,15 (dd, J = 8,2, J = 6,2, 1H); 4,20-4,30 (m, 2H); 4,32 (d, J = 3,9, 1H); 4,31 (dd, J = 7,7, J = 7,2, 1H); 4,84-4,90 (m, 2H); 6,81 (d, J = 6,8, 2H); 7,09 (d, J = 8,4, 2H); 7,25 (d, J = 7,9, 2H); 7,41-7,46 (m, 2H); 7,48-7,58 (m, 4H); 7,66 (d, J = 8,0, 2H); 7,71 (d, J = 7,4, 2H); 7,75 (sa, 1H); 7,83-7,87 (m, 1H); 7,87-7,92 (m, 2H).

HRMS (H₂O) m/z: 1133,5002 [M+H]⁺ (calc. 1133,4953) C₅₈ H₇₃ N₁₀ O₁₀ S₂

Ejemplo 22: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH

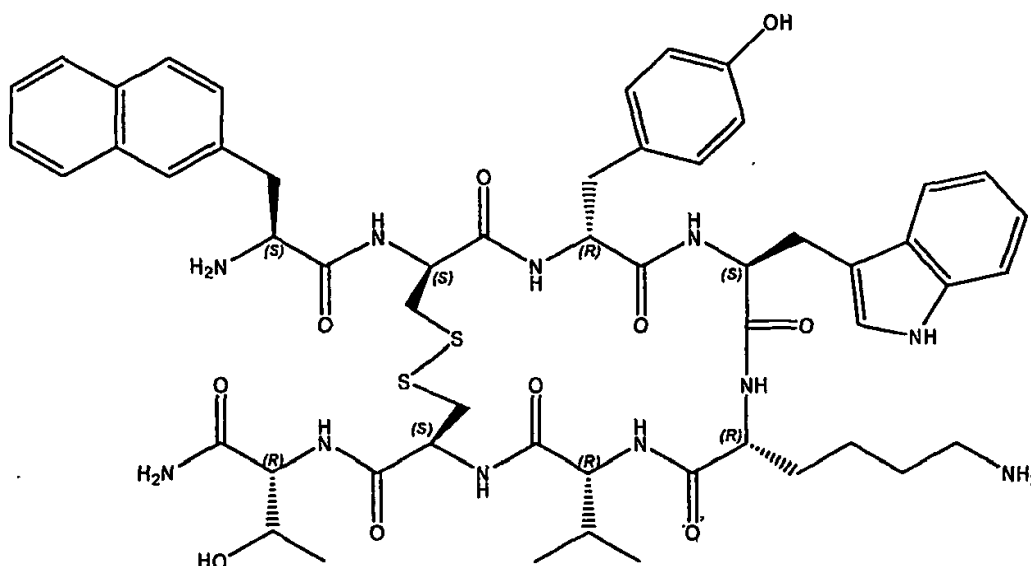


El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-p-2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Boc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Fmoc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-2-(2-metoxietoxi)etoxi)-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH.

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,64-0,76 (m, 1H); 0,76-0,88 (m, 1H); 0,93 (d, J = 6,9, 3H); 0,96 (d, J = 6,9, 3H); 1,23 (d, J = 6,3, 3H); 1,35-1,52 (m, 2H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,91 (s, 6H); 2,13-2,24 (m, 1H); 2,43 (dd, J = 14,6, J = 4,8, 1H); 2,54 (dd, J = 14,5, J = 9,3, 1H); 2,70-2,95 (m, 4H); 3,19 (dd, J = 13,1, J = 9,6, 1H); 3,36 (s, 3H); 3,60 (t, J = 3,4, 1H); 3,61 (t, J = 4,4, 1H); 3,71 (t, J = 4,4, 1H); 3,72 (t, J = 3,4, 1H); 3,84-3,89 (m, 2H); 3,99 (d, J = 10,8, 1H); 4,00 (d, J = 4,01, 1H); 4,07-4,14 (m, 1H); 4,16-4,20 (m, 2H); 4,23-4,30 (m, 2H); 4,35 (d, J = 3,9, 1H); 4,60 (dd, J = 7,6, J = 6,8, 1H); 4,83-4,88 (m, 2H); 6,82 (d, J = 8,4, 2H); 6,96 (d, J = 8,6, 2H); 7,07 (d, J = 8,4, 2H); 7,13 (d, J = 8,6, 2H); 7,46 (dd, J = 8,5, J = 1,3, 1H); 7,51-7,56 (m, 2H); 7,76 (sa, 1H); 7,85-7,94 (m, 3H).

Ejemplo 23: H-2-Nal¹-ciclo(D-Cys²-D-Tyr³-Trp⁴-D-Lys⁵-D-Val⁶-D-Cys⁷)-D-Thr⁸-NH₂·2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-D-Thr(tBu)-OH después Fmoc-D-Cys(Trt)-OH después Fmoc-D-Val-OH después Fmoc-D-Lys(Boc)-OH después Fmoc-L-Trp-OH después Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-D-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-L-Ala-OH.

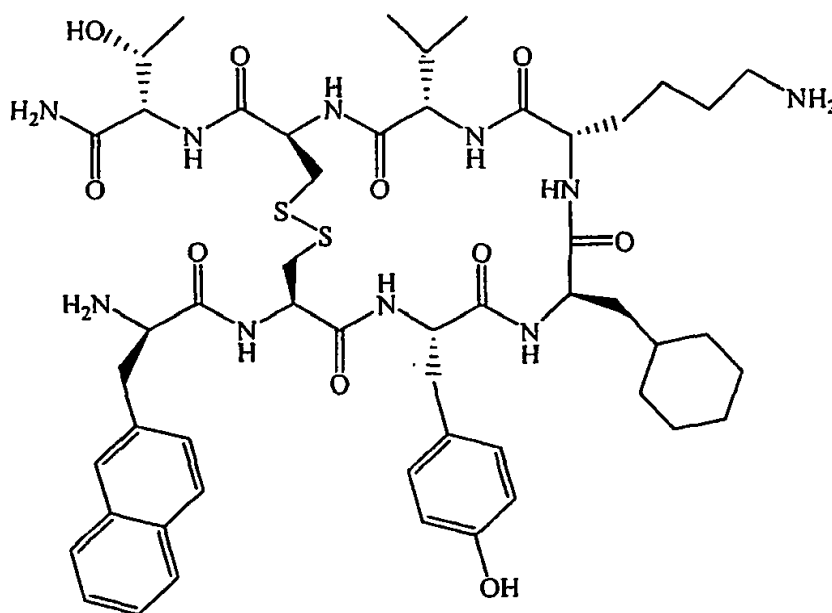
El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-2-Nal¹-ciclo(D-Cys²-D-Tyr³-Trp⁴-D-Lys⁵-D-Val⁶-D-Cys⁷)-D-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 9,87 min

- 5 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,10-0,22 (m, 1H); 0,32-0,46 (m, 1H); 0,90 (d, J = 7,6, 3H); 0,91 (d, J = 7,3, 3H); 1,10-1,30 (m, 4H); 1,19 (d, J = 6,2, 3H); 1,50-1,62 (m, 1H); 1,95 (s, 6H); 2,10-2,20 (m, 1H); 2,45 (dd, J = 14,5, J = 3,9, 1H); 2,52-2,64 (m, 3H); 2,70 (dd, J = 14,8, J = 3,8, 1H); 2,78 (dd, J = 14,3, J = 11,7, 1H); 2,90-3,60 (m, 4H); 3,35 (dd, J = 13,5, J = 9,0, 1H); 3,46 (dd, J = 14,0, J = 6,0, 1H); 3,81 (dd, J = 10,9, J = 3,4, 1H); 3,95 (d, J = 9,4, 1H); 4,18-4,27 (m, 2H); 4,31 (d, J = 3,6, 1H); 4,42 (dd, J = 8,5, J = 5,9, 1H); 4,64 (t, J = 7,4, 1H); 4,83-4,92 (m, 2H); 6,84 (d, J = 8,6, 2H); 7,12 (d, J = 8,6, 2H); 7,16 (t, J = 7,1, 1H); 7,22 (t, J = 7,1, 1H); 7,43-7,49 (m, 2H); 7,50-7,57 (m, 3H); 7,77 (sa, 1H); 7,83-7,88 (m, 1H); 7,90 (da, J = 8,9, 2H).

HRMS (H₂O) m/z: 1096,4749 [M+H]⁺

Ejemplo 24: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-ciclohexil-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



- 15 El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-ciclohexil-D-Ala-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

- 20 El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-ciclohexil-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

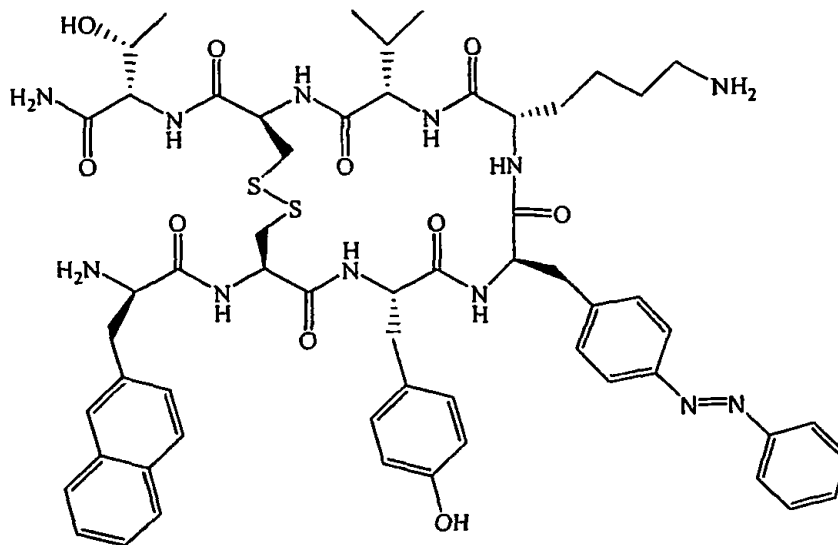
HPLC: tr = 5,13 min

- 25 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,6-0,8 (m, 1H), 0,8 (d, J = 7,5, 3H), 0,84 (d, J = 7,3, 3H), 0,95 (ls), 1,1 (d, J = 7,3, 3H), 1,14-1,35 (m, 4H), 1,35-1,65 (m, 6H), 1,7-1,94 (m, 5H), 1,98-2,1 (m, 1H), 2,32-2,5 (m, 2H), 2,6 (d, J = 7,4, 1H), 2,72-2,92 (m, 4H), 3,18 (dd, J = 9,2, J = 13,4, 1H), 3,3 (dd, J = 8, J = 13,4, 1H), 3,85 (t, J = 7,4, 1H), 3,9 (d, J = 9,5, 1H), 4,4,1 (m, 2H), 4,18 (m, 2H), 4,4 (dd, J = 6,2, J = 9,5, 1H), 6,65 (d, J = 8,3, 2H), 6,97 (d, J = 8,4, 2H), 7,35 (d, J = 8,3, 1H), 7,37-7,42 (m, 2H), 7,62 (s, 1H), 7,7-7,8 (m, 2H), 8,28 (s, 1H).

HRMS (H₂O) m/z: 1063,51245 [M+H]⁺ (calc. 1063,510909) C₅₂ H₇₅ N₁₀ O₁₀ S₂

30

Ejemplo 25: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-p-fenilazo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH



El péptido abierto se obtiene según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) y acoplamiento del aminoácido siguiente sobre soporte sólido en el orden siguiente: Fmoc-L-Thr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH después Fmoc-L-Val-OH después Fmoc-L-Lys(Boc)-OH después Fmoc-4-fenilazo-D-Phe-OH después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

El compuesto se cicla mediante la formación de un puente de disulfuro, después se escinde de la resina, se purifica, y finalmente se obtiene en forma de acetato conforme al método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-4-fenilazo-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂•2 CH₃COOH.

HPLC: tr = 6,0 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,6-0,85 (m, 1H), 0,9 (d, J = 7,4, 3H), 0,93 (d, J = 7,3, 3H), 1,2 (d, J = 7,4, 3H), 1,27-1,56 (m, 2H), 1,68-2,07 (m, 10H), 2,1-2,5 (m, 1H), 2,55-3,07 (m, 8H), 3,35 (dd, J = 8,9, J = 13, 1H), 3,47 (dd, J = 5,6, J = 13, 1H), 3,99 (d, J = 9,9, 1H), 4,21-4,25 (m, 1H), 4,32 (d, J = 3,8, 2H), 4,33-4,4 (m, 1H), 4,57-4,98 (m, 4H), 6,81 (d, J = 8,4, 2H), 6,91 (m, 1H), 7,1 (t, J = 8,8, 2H), 7,21-7,35 (m, 1H), 7,37 (d, J = 8,3, 2H), 7,48 (d, J = 8,4, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,63 (m, 2H), 7,78-7,94 (m, 8 H).

HRMS (H₂O) m/z: 1161,50281 [M+H]⁺ (calc. 1161,501407) C₅₈ H₇₃ N₁₂ O₁₀ S₂

2. Estudio de los compuestos según la invención

2.1 Actividad de los compuestos octapeptídicos sobre los receptores de la somatostatina

2.1.1 Protocolo de medida de la afinidad de los péptidos sobre los receptores de la somatostatina

La afinidad de los compuestos de la invención por los receptores de la somatostatina se determina por la medida de la inhibición de la unión de [125I-Tyr¹¹]SRIF-14 a preparaciones membranales de células CHO-K1 transfectadas.

Las células CHO-K1 que expresan de forma estable cada uno de los subtipos de receptores de la somatostatina se recogen con EDTA 0,5 mM y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en tampón de fosfato (PBS) y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en tampón Tris 50 mM a pH 7,4 y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Las células se lisan mediante ultrasonidos y se centrifugan a 39 000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspende en tampón Tris 50 mM a pH 7,4, se extrae una parte alícuota para la dosificación de proteínas y el resto se centrifuga a 50 000 g durante 10 minutos. Las membranas obtenidas en este último sedimento se conservan a -80°C.

La medida de la inhibición competitiva de la unión de la [125I-Tyr¹¹]SRIF-14 (Perkin Elmer) sobre cada uno de los subtipos de receptores de la somatostatina se lleva a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos de polipropileno. Las membranas celulares (5 a 20 µg de proteínas/pocillo) se incuban con la [125I-Tyr¹¹]SRIF-14 (de 0,05 a 0,1 nM) durante de 50 a 90 minutos a 37°C (condiciones que dependen del subtipo de receptor) en un medio de tampón HEPES 50 mM de pH 7,4, que comprende 0,2 % de seroalbúmina bovina (BSA), MgCl₂ 5 mM, 200 KIU/ml de Trasylol, 0,02 mg/ml de bacitracina, 0,02 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

La [125I-Tyr¹¹]SRIF-14 unida se separa de la [125I-Tyr¹¹]SRIF-14 libre mediante filtración a través de placas de fibra de vidrio GF/C (Unifilter, Perkin Elmer) preimpregnadas con 0,1 % de polietilenimina (PEI), utilizando un

Filtermate 96 (Perkin Elmer). Los filtros se lavan con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 4°C, y la radiactividad presente se determina con un contador (TopCount, Perkin Elmer).

Los datos se analizan por regresión no lineal con la ayuda del programa informático XLfit 4.2 (IDBS).

2.1.2 Resultados

5 Los ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 y 25 tienen una afinidad por el subtipo 2 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 5 μ M.

Los ejemplos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 y 25 tienen una afinidad por el subtipo 2 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 700 nM.

10 Los ejemplos 1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 y 25 tienen una afinidad por el subtipo 2 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 50 nM.

Los ejemplos 1, 6, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 24 tienen una afinidad por el subtipo 2 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 5 nM.

Los ejemplos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 y 25 tienen una afinidad por el subtipo 5 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 5 μ M.

15 Los ejemplos 1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 y 25 tienen una afinidad por el subtipo 5 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 1 μ M.

Los ejemplos 1, 6, 8, 9, 12, 15, 17, 18, 19, 21 y 24 tienen una afinidad por el subtipo 5 de los receptores de la somatostatina inferior o igual a 100 nM.

2.2 Propiedades fisicoquímicas de los compuestos octapeptídicos

20 Los péptidos obtenidos son objeto de un estudio de sus propiedades de autoensamblaje.

El procedimiento utilizado consta de tres etapas: disolución de los péptidos y análisis macroscópico; análisis espectroscópicos y microscópicos de las estructuras formadas y análisis por difracción de rayos X a ángulos pequeños (SAXS).

2.2.1 Disolución de los péptidos y análisis macroscópico

25 La primera etapa de la caracterización de los derivados es la realización de una gama de concentraciones de 3 a 15 % en peso de péptido en agua. La gelificación de la disolución indica la presencia de estructuras autoensambladas, que pueden ser nanotubos, pero también fibras u otras estructuras autoorganizadas.

2.2.2 Análisis espectroscópicos y microscópicos de las estructuras formadas

30 Esta etapa tiene por objetivo verificar la presencia de estructuras autoensambladas, caracterizar su autoensamblaje y visualizarlas mediante microscopía.

35 La espectroscopía infrarroja permite obtener información sobre el modo de apilamiento de los péptidos en los autoensamblajes. El espectro de la banda de amida, que refleja los espectros de absorción de las funciones de carbonilo del esqueleto peptídico, da información sobre el tipo de enlace de hidrógeno en el que están implicados estos agrupamientos (enlaces de H que conducen a la formación de hoja β , de hélice α o aún de bucle o de conformación aleatoria), y en consecuencia sobre la estructura secundaria y terciaria de los péptidos en disolución y autoensamblados. La técnica por reflexión total atenuada (ATR-FTIR) utiliza un cristal sobre el que se deposita la muestra, sólida o líquida. La radiación infrarroja es guiada a través de este cristal conforme a un ángulo que la permite reflejarse muchas veces en el interior del cristal, lo que aumenta la sensibilidad de la técnica. Gracias a las prestaciones de este aparato, es posible entonces hacer medidas sobre disoluciones relativamente diluidas. El haz penetra la muestra depositada sobre el cristal unos micrómetros, lo que hace que sólo se analicen las moléculas/estructuras que se depositan sobre la superficie del cristal. Además, esta técnica no es destructiva.

40 Las estructuras ensambladas se visualizan después mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica, muy potente, que permite aumentos hasta de 500 000 veces, es una de las contadas técnicas capaces de visualizar estructuras de tamaño nanométrico. La muestra se somete a un haz de electrones. La visualización del haz transmitido se hace o mediante una pantalla fotoluminiscente o mediante una cámara CCD. Estando la muestra en el microscopio a vacío, las que se observan son las muestras secadas después de coloración con sales de uranio para aumentar el contraste.

45 El péptido en disolución se deposita en primer lugar sobre una rejilla de cobre recubierta de una película de carbono. Después del depósito del material, se elimina el exceso de líquido. De la misma manera, la disolución de colorante,

en este caso acetato de uranilo, se deposita sobre la rejilla, se elimina el exceso y la rejilla se seca al aire libre. Entonces puede introducirse en el microscopio.

2.2.3 Análisis por difracción de rayos X a ángulos pequeños (SAXS)

5 Las muestras, líquidas o en gel, se introducen en un capilar y se someten a un flujo monocromático de rayos X. La intensidad difundida se mide en función del ángulo de difusión con respecto al ángulo incidente.

10 Los diagramas de difusión obtenidos de esta manera deben correlacionarse con un modelo teórico próximo a las estructuras presentes en la muestra. En el caso en el que los péptidos se autoensamblan en forma de nanotubos huecos, la modelización de los datos experimentales con la difusión teórica producida por las columnas huecas infinitamente largas permite determinar con precisión el diámetro de las columnas y estimar el espesor de su pared (Valéry et al., en *Biophysical Journal*, 2004, 86(4), 2484-2501 y *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100(18) 10258-10262). Para autoensamblajes polidispersos, nanotubulares, fibrilares, micelares o lamelares, es la correlación de los datos espectroscópicos, microscópicos y de difusión de RX la que permite estimar una gama de tamaños para los objetos observados.

2.2.4 Resultados

15 Los resultados de los análisis de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos se presentan en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Ejemplo	Ensamblaje
1	nanotubo de 20 nm monodisperso
2	nanotubo de 12 nm monodisperso
3	nanotubo de 9,3 nm monodisperso
4	Fibras
5	Soluble
6	nanotubo de 35 nm monodisperso
7	Insoluble
8	Insoluble
9	nanotubo de 22 nm monodisperso
10	Fibras
11	Soluble
12	nanotubo de 17 nm monodisperso
13	nanotubo de 17 nm monodisperso
14	nanotubo de 18 nm monodisperso
15	nanotubo de 15,6 nm monodisperso
16	nanotubo de 17 nm monodisperso
17	nanotubo de 15,3 nm monodisperso
18	nanotubo de 18,4-18,8 nm monodisperso
19	nanotubo de aproximadamente 29 nm polidisperso
20	nanotubo de 17,6 nm monodisperso
21	Insoluble
22	nanotubo de 17,4 nm monodisperso
23	nanotubo de 24,4 nm monodisperso
24	Fibras
25	nanotubo de 10 nm monodisperso

Ciertos péptidos permiten obtener nanotubos monodispersos, mientras que otros se ensamblan en fibras o en nanotubos polidispersos. Por último, algunos son solubles, o al contrario insolubles, en las condiciones de operación mencionadas anteriormente.

5 Los derivados que se autoensamblan en nanotubos monodispersos de péptidos son los siguientes: ejemplos 1, 2, 3, 6, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 20. Se obtiene una gama de diámetros de 9,3 a 35 nm.

El derivado del ejemplo 19 se ensambla en nanotubos de diámetros polidispersos.

Los derivados que permiten obtener fibras autoensambladas son los siguientes: ejemplos 4 y 10.

Los derivados solubles en las concentraciones estudiadas son los siguientes: ejemplos 5 y 11.

Por último, los derivados insolubles en las concentraciones estudiadas son los siguientes: ejemplos 7, 8 y 21.

10 Un estudio de los compuestos en otras gamas de concentraciones podría revelar una evolución de estos componentes.

2.3 Reología de los compuestos octapeptídicos

Las propiedades de viscosidad y viscoelásticas de las disoluciones/geles de los compuestos conforme a la invención pueden estudiarse mediante la reología, conforme a los modos de operación descritos a continuación.

15 2.3.1 Equipo y condiciones de las medidas

Las medidas se realizan en general utilizando un reómetro de tipo « Control Stress Haake 600 » (Haake, Alemania), equipado de una geometría de medida cono/placa, con un cono de 20 mm de diámetro, un ángulo de 1 grado y un entrehierro de 52 micrómetros. La temperatura de medida se fija a 25° C +/- 0,2° C con la ayuda de un baño termostático, pero puede modularse si es necesario.

20 2.3.2 Tipos de medidas y modos de operación

Se llevan a cabo dos tipos de ensayos complementarios, por una parte medidas en modo estático y por otra parte medidas en modo dinámico (reología oscilatoria), las dos descritas brevemente a continuación.

Modo estático

25 Se registra una curva de flujo en modo estático (una tensión de cizallamiento τ (Pa) en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ (s^{-1})). Esta curva permite acceder a informaciones tales como el comportamiento del flujo, la viscosidad, la tensión de fluencia y una eventual tixotropía de las muestras. Las disoluciones/geles que presentan nanoestructuras peptídicas de tipo de nanotubos o fibras se comportan en general como fluidos no newtonianos. Adaptando a la curva de flujo experimental modelos teóricos tales como los de (Cross MM. J Colloid Sci 1965 20; 417-37) o de Casson (Casson, N. In Rheology of Disperse Systems, C.C. Mill ed, 1959, p. 82, Pergamon Press, New York, NY.), es posible acceder por extrapolación a los valores de viscosidad infinita (η^{∞}) y viscosidad 0, η_0 (Pa.s), que sirven de parámetros de comparación y de referencia para definir la viscosidad de estas disoluciones/geles.

30

Modo dinámico (reología oscilatoria)

35 Para las medidas dinámicas, se aplica a la muestra una deformación por cizallamiento (strain) (γ_0) (Pa) de tipo sinusoidal, de amplitud y de frecuencia conocidas. Se mide la tensión de cizallamiento sinusoidal resultante (amplitud τ_0). Las disoluciones/geles que presentan nanoestructuras peptídicas de tipo de nanotubos o fibras son generalmente sistemas viscoelásticos. En este caso, las sinusoides registradas mediante la deformación por cizallamiento (strain) y la tensión de cizallamiento (stress) presentan un desfase de un ángulo δ . Los valores de τ_0 , γ_0 y δ permiten acceder a los parámetros viscoelásticos:

El módulo complejo	$ G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$
El módulo de almacenamiento	$G' = G^* \cos \delta$
El módulo de pérdida	$G'' = G^* \sin \delta$

5 El módulo de almacenamiento (también denominado módulo elástico) es una medida de la energía elástica almacenada (o restituida) por unidad de volumen, mientras que el módulo de pérdida es una medida de la energía disipada por unidad de volumen. Estos módulos deben calcularse en la región viscoelástica lineal (es decir, condiciones experimentales para las que estos módulos son independientes de la amplitud de la tensión de cizallamiento (strain)). Estas condiciones experimentales se determinan en general por un experimento denominado de « stress sweep », que consiste en una medida del módulo elástico y del módulo de pérdida en función de la amplitud de la deformación impuesta (para una frecuencia dada, típicamente de 1 Hz). El comportamiento general es que, para las deformaciones débiles, G' y G'' varían muy poco con la deformación. Después, cuando se pasa el umbral de fluencia, se observa una fuerte disminución de G' y un máximo de G''. Esta transición delimita la región de viscoelasticidad lineal. Cuando se conoce la región de viscoelasticidad lineal, pueden llevarse a cabo otros ensayos tales como medidas de « frequency sweep », que consisten en medir la dependencia de G' y G'' en función de la frecuencia de cizallamiento a una amplitud de deformación fija, comprendida en la región de viscoelasticidad lineal.

15 La deformación crítica es la deformación a partir de la cual el módulo elástico se vuelve dependiente de la deformación aplicada a una frecuencia constante. Para deformaciones superiores, el material pierde sus propiedades viscoelásticas y tienden a volverse más viscoso que elástico.

20 Igualmente, pueden realizarse ensayos de deformación y de recuperación para caracterizar las disoluciones/geles de los compuestos. En este tipo de ensayo, se somete la muestra a una tensión de amplitud constante en el instante inicial t=0, tensión que se mantiene constante con el tiempo. La viscosidad cero, η_0 , es entonces igual a la inversa de la pendiente de la curva de deformación elástica (J) en función del tiempo.

2.3.3 Resultados

Tabla 2

Ej.	Reología módulo de almacenamiento (Pa)		Reología deformación crítica (Pa)	
	75 mM	226 mM	75 mM	226 mM
3	Viscosidad demasiado reducida	150000	Viscosidad demasiado reducida	360
4	184000	>2700000	800	18600
6	643500	>2700000	5000	8500

2.4 Estudio de la liberación de los compuestos octapeptídicos

Pueden llevarse a cabo estudios de liberación sobre los compuestos octapeptídicos conforme a la invención, en forma de gel, sólido, o en suspensión. Son factibles dos tipos de ensayos: ensayos de liberación estáticos y/o ensayos dinámicos, los dos descritos brevemente a continuación.

5 Los parámetros experimentales son comunes a los dos tipos de ensayos. El medio de liberación es un medio líquido bien controlado de modo fisicoquímico, preferiblemente un tampón PBS (tampón fosfato salino) ajustado a 7,4 y mantenido a 37°C. La curva de liberación se define como la concentración del compuesto estudiado en el medio de disolución (expresada en % de compuesto liberado) en función del tiempo (minutos, horas, días). Para iniciar los ensayos, se coloca una cantidad conocida de muestra en el medio de disolución a tiempo 0 (t=0 min/h/d), estando la muestra eventualmente acondicionada en un dispositivo adaptado a su estado físico inicial (gel, sólido, suspensión).
 10 Las medidas de concentración del compuesto en el medio de liberación se llevan a cabo mediante uno o varios métodos analíticos bien conocidos en el estado de la técnica, como la espectrofotometría de UV-visible o la HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Los parámetros de los métodos analíticos se ajustan en función de las características fisicoquímicas de los compuestos. Los ensayos pueden llevarse a cabo con diversas concentraciones de partida, tales como 75 mM y 226 mM en los ejemplos presentados a continuación.

2.4.1 Ensayos estáticos

Los estudios de liberación en modo estático se conducen sin someter las muestras a una agitación controlada o a un flujo del medio de liberación. Las extracciones del medio de liberación y/o las determinaciones de concentración no están generalmente automatizadas, y necesitan operaciones manuales. Por ejemplo, ciertos estudios estáticos de liberación pueden realizarse sobre muestras que corresponden a aproximadamente de 2 a 5 mg de compuesto puro en 20 ml de PBS (típicamente en vasos de precipitados de 50ml) mantenidos en una estufa a 37°C. Las medidas de concentración se realizan sobre extracciones representativas del medio de liberación, efectuadas a tiempos elegidos.

2.4.2 Ensayos dinámicos

25 Para los estudios dinámicos de liberación, se aplica a las muestras una agitación controlada o un flujo del medio de liberación. En este modo, las extracciones y/o determinaciones de concentración están generalmente automatizadas, y los estudios pueden conducirse en sistemas/instrumentos estandarizados y bien conocidos en el estado de la técnica (véanse los sistemas de la Farmacopea Europea). Por ejemplo, pueden realizarse ciertos estudios en modo dinámico sobre muestras que corresponden al orden de 10 mg de compuesto puro en 100 ml de PBS previamente introducidos en los vasos de precipitados estandarizados, y mantenidos a 37°C. La agitación y las extracciones / medidas se controlan con un instrumento de ensayo de disolución del tipo de aparato 1 o 2 descrito por la Farmacopea Europea.

2.4.3 Resultados

Tabla 3

Ej.	Liberación estática después de 48 h	Liberación dinámica después de 44 h	
	75 mM	75 mM	226 mM
3	/	100%	93%
4	85%	94%	75%
6	25%	37%	17%

35

2.5 Análisis de los resultados experimentales

De esa manera, las propiedades biológicas y/o fisicoquímicas de los compuestos de la invención permiten considerar aplicaciones diversas, tales como péptidos con actividad terapéutica con un efecto inmediato o prolongado, o péptidos sin efecto terapéutico intrínseco pero que sirven como soporte de formulación, por ejemplo para una liberación prolongada del principio activo.

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IPSEN PHARMA S.A.S. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> Nouveaux composés octapeptidiques et leur utilisation thérapeutique

5 <130> SCC 001 WO

<140> EP08290917.7

<141> 2008-09-30

<160> 1

<170> Patentin version 3.3

10 <210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<220>

15 <221> DISULFID

<222> (2)..(7)

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

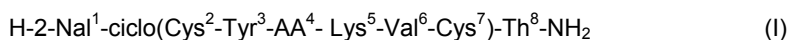
20 <223> xaa is any natural or non-natural amino acid

<400> 1

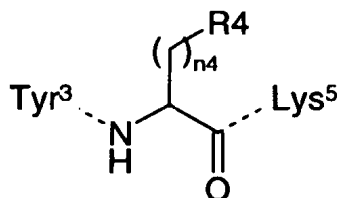
Na1 Cys Tyr Xaa Lys Va1 Cys Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I)



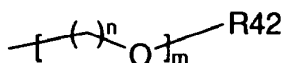
en la que AA⁴ representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos Tyr³ y Lys⁵ conforme a la fórmula



5

en la que n₄ representa un número entero de 0 a 3 y R₄ representa un átomo de hidrógeno, un radical de alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo y heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre arilazo, halo, nitro, hidroxilo, arilo, OR₄₁;

R₄₁ representa un radical



10

en el que R₄₂ representa un radical de alquilo o un átomo de hidrógeno, n es un número entero de 2 a 4, y m es un número entero de 1 a 4;

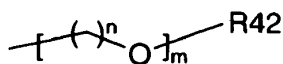
entendiéndose que todos los aminoácidos pueden tener la configuración D o L,

15 con exclusión de los compuestos H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-β-(3-piridil)-D-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂, H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ y de sus sales,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

20 2. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 1, caracterizado porque n₄ representa un número entero de 0 a 2, y R₄ representa un radical de alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, estando los radicales de arilo y heteroarilo sustituidos eventualmente con uno o varios radicales iguales o diferentes, elegidos entre arilazo, halo, nitro, hidroxilo, arilo y OR₄₁;

R₄₁ representa un radical



25 en el que R₄₂ representa un radical de alquilo, n y m representan 2.

3. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 o 2, en la que n₄ representa 0 o 1 y R₄ representa un átomo de hidrógeno, o un radical alquílico.

30 4. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 3, en la que n₄ representa 0 y R₄ representa un radical alquílico.

5. Un compuesto conforme a una de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado porque el radical alquílico representa el radical metilo.

35 6. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 1, en la que AA⁴ representa un radical de aminoácido elegido entre Trp, Ala, β-(3-benzotienil)-Ala, β-(2-tienil)-Ala, β-(9-antril)-Ala, β-(2-fluorenil)-Ala, His, Val, 1-Nal, 2-Nal, fenil-Gly, Homo-Phe, p-Br-Phe, p-F-Phe, m-F-Phe, o-F-Phe, m-Br-Phe, o-Br-Phe, p-NO₂-Phe, 3,5-difluoro-Phe, 4-fenil-Phe, Tyr, p-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-Phe; β-(ciclohexil)-Ala, p-fenilazo-Phe.

7. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el radical de aminoácido AA⁴ tiene la configuración D.

8. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 7, caracterizado porque los aminoácidos 2-Nal¹ y AA⁴ tienen la configuración D, teniendo los otros aminoácidos la configuración L.
9. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el radical de aminoácido AA⁴ tiene la configuración L.
- 5 10. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 9, caracterizado porque los aminoácidos 2-Nal¹ y AA⁴ tienen la configuración L, teniendo los otros aminoácidos la configuración D.
11. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado porque AA⁴ representa el radical del aminoácido Ala.
12. Un compuesto octapeptídico de fórmula general (I), caracterizado porque se trata del compuesto siguiente:
- 10
$$\text{H-D-2-Nal}^1\text{-ciclo(Cys}^2\text{-Tyr}^3\text{-D-Ala}^4\text{-Lys}^5\text{-Val}^6\text{-Cys}^7\text{)-Thr}^8\text{-NH}_2.$$
13. Una composición terapéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 a 12, como principio activo en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 14. Una composición terapéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 a 12, como excipiente farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un principio activo.
15. Utilización de un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) conforme a una de las reivindicaciones 1 a 12 para fabricar un medicamento.
- 20 16. Utilización conforme a la reivindicación 15, caracterizada porque el medicamento está destinado al tratamiento de una patología elegida entre las enfermedades relacionadas con la hormona del crecimiento.