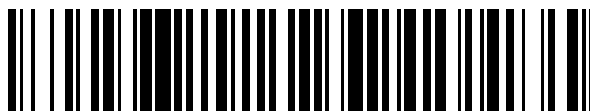


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 573**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/655** (2006.01)  
**A61K 38/31** (2006.01)  
**A61K 49/14** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008 E 08856519 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2225271**

54 Título: **Nuevos análogos no selectivos de somatostatina**

30 Prioridad:

**03.12.2007 IT MI20072266**  
**07.12.2007 EP 07425778**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2013**

73 Titular/es:

**ITALFARMACO S.P.A. (100.0%)**  
**VIALE FULVIO TESTI, 330**  
**20126 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**VITALI, ANDREA;**  
**PINORI, MASSIMO y**  
**MASCAGNI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 431 573 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 análogos no selectivos de somatostatina

5 La presente invención se refiere a nuevos ciclopéptidos análogos funcionales no selectivos de somatostatina, a sus conjugados y complejos, a procesos para la producción, a las formulaciones que los contienen y a sus usos en el campo farmacéutico.

10 **Estado de la técnica**

Los agonistas peptídicos cíclicos de somatostatina se han conocido durante algún tiempo [J Pept Res 58 (2), 91 (2001)]: en particular, dos de estos, octreótido y lanreótido, se usan clínicamente para el cuidado de la acromegalia y para el tratamiento sintomático de carcinomas.

15 La somatostatina actúa mediante la interacción con 5 subtipos de receptores (SSTR1, 2, 3, 4 y 5); pero los análogos empleados hasta ahora en terapia son, sin embargo, esencialmente selectivos para el único receptor SSTR2.

20 La gran mayoría de los agonistas ya conocidos se caracteriza por la presencia, en la estructura del péptido, del fragmento -DTrp-Lys-; por tanto, este fragmento parece ser esencial para la actividad de los análogos y de hecho está también presente en octreótido y lanreótido.

25 Recientemente, se ha avanzado la hipótesis de que análogos menos selectivos, es decir, capaces de interactuar también con otros subtipos de receptores, pueden ofrecer una ventaja desde el punto de vista del uso terapéutico [Nature Rev. Drug Discovery 2, 999 (2003)].

30 En la solicitud de patente WO2002010192, se describe un ciclopéptido que tiene una fuerte afinidad para el receptor SSTR5, una menor afinidad para SSTR2 y SSTR3 y casi afinidad cero para SSTR4. Para SSTR1, se describe una afinidad de aproximadamente 60 veces menor que esa para SSTR5.

Los mismos inventores del documento WO2002010192, en una publicación posterior [Nature Rev. Drug Discovery 2, 999 (2003)], sostienen la importancia de los receptores SSTR1, 2 y 5 para la actividad antisecretora de somatostatina, pero describen, para el mismo ciclopéptido descrito en la solicitud de patente anteriormente mencionada, una afinidad para SSTR1 de aproximadamente 300 menos que esa para SSTR5.

35 Está claro que, en este caso, una posible actividad terapéutica mediada por la interacción con el receptor SSTR1 solo se puede alcanzar en presencia de una sobredosis considerable con respecto a las acciones mediadas por la interacción con SSTR5.

40 Por tanto, mientras que el posible papel terapéutico de agonistas para el receptor SSTR4 no está claro, existe claramente la necesidad, y el posible uso, para nuevos análogos de somatostatina con un nivel de afinidad comparable para todos los otros cuatro receptores.

45 En particular, las potenciales ventajas terapéuticas de agonistas capaces de interactuar con SSTR1 se describen en la bibliografía: M.C. Zatelli y colaboradores ha estudiado, in vitro, el efecto de agonistas para SSTR1 en adenomas hipofisarios humanos, tanto secretores [J Clin End&Met 88, 2797 (2003)] como clínicamente no funcionales [J Clin End&Met 89, 5181 (2004)]; en ambos casos el estímulo de los receptores SSTR1 produjo una reducción de la actividad secretora y la viabilidad celular. Por otra parte, también se mostró la potencial ventaja terapéutica que puede derivar del uso de análogos pluripotentes de somatostatina (capaces de interactuar con los SSTR1, 2, 3 y 5) por J. van der Hoek y colaboradores en una revisión reciente [Curr. Pharm. Design 11, 1573 (2005)]; de hecho se mostró cómo diferentes tumores, tanto hipofisarios como gastroenteropancreáticos (GEP), expresan, en la superficie celular, porcentajes variables pero significativos de los cuatro receptores, mientras que el receptor SSTR4 está mucho menos presente.

55 La solicitud WO2005014624 describe la preparación de análogos cíclicos de somatostatina y los intermedios usados en su preparación. Estos análogos hexacíclicos tienen el residuo de triptófano en posición 3.

60 La solicitud WO2006066868 describe composiciones farmacéuticas para la administración parenteral de varias sales de análogos de somatostatina, que forman un depósito en gel después de la inyección en contacto con los líquidos corporales. Mediante análogos de somatostatina, se quiere decir péptidos lineales o cíclicos derivados de somatostatina, que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende triptófano.

65 En *Regulatory Peptides*, 1 (1980) 97-113, se sostiene la importancia del grupo NH de indol para la actividad de somatostatina: la sustitución de Trp<sup>8</sup> con naftilamina de hecho produce la pérdida de actividad.

Los datos de unión no se describen en el artículo, mientras que se evalúa la actividad de inhibición de la secreción gástrica *in vivo*. Estos resultados indican que, para la actividad gástrica, la sustitución de Trp<sup>8</sup> con halógeno, análogos metilados o metoxilados (tabla II) tiene poca influencia sobre la potencia biológica, potencia que en su lugar casi se cancela en los análogos que contienen pentametil-fenilalanina (Pmp) o naftilamina (tabla III), en lugar de triptófano. Los compuestos que derivan de halógeno de D-Trp en su lugar parecen mejorar considerablemente la actividad inhibitoria de la secreción de GH (tabla V). Investigadores de Merck S&D (véase Veber D.F. en *Proceedings of the 12th Am. Pep. Symp.*: Smith, J.A. & Rivier J.E. editores, ESCOM 1992, pp. 3-14) describen que, en hexapéptidos cíclicos, la sustitución del triptófano con otro aminoácido aromático produce una pérdida considerable de actividad *in vitro* en la inhibición de la secreción de GH.

En *J Med Chem* (2005) 48, 507, se describen análogos selectivos de SSTR1 junto con su posible papel terapéutico de agonistas. Las estructuras analizadas aquí también tienen triptófano.

El artículo describe dos series de análogos derivados de dos ciclopeptidos: uno contiene D-Trp y el otro D-Nal; todos los análogos, como los padres, solo tienen afinidad por SSTR1; la serie con D-Nal es aproximadamente 10 veces menos poderosa que esa con D-Trp. Un detalle particular es estos péptidos, que son inactivos en todos los otros subtipos de receptores, es la sustitución de la lisina con p-aminofenilalanina.

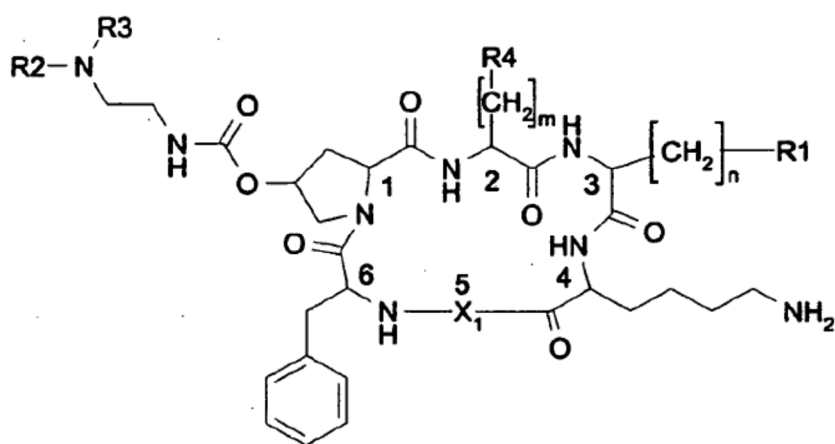
De lo que se expone anteriormente, es por tanto evidente que un agonista pluripotente de somatostatina, es decir, capaz de estimular SSTR1, SSTR2, SSTR3 y SSTR5, aumentará la posibilidad de respuestas positivas en pacientes afectados por tumores neuroendocrinos con respecto a agonistas cuya función activadora se restringe a un número menor de subreceptores de la somatostatina.

### Descripción de la invención

El solicitante ha encontrado sorprendentemente que el residuo de triptófano, presente en muchos análogos conocidos, se puede sustituir útilmente con otros residuos aromáticos adecuados, manteniendo la afinidad para la mayoría de los receptores de somatostatina.

En particular, se encontró que, usando aminoácidos cuyo grupo aromático es lo suficientemente rico con electrones (por ejemplo, al estar sustituido con grupos donantes de electrones) en sustitución del residuo de triptófano, se obtienen péptidos que muestran una buena afinidad por el receptor SSTR1, a valores de concentración similares a los necesarios para la unión a los receptores SSTR2, SSTR3 y SSTR5.

Por tanto, forman el objeto de la presente invención ciclohexapéptidos análogos de somatostatina, que tienen la fórmula (I), donde mediante ciclohexapéptidos análogos de somatostatina se quiere decir péptidos con seis residuos de alfa aminoácidos, en los que un enlace peptídico directo está presente entre el grupo alfa-carboxilo del sexto residuo y el grupo alfa-amino del primer residuo, con una afinidad de unión a concentraciones nanomolares, para al menos uno de los receptores de somatostatina conocidos:



Fórmula (I)

donde:

$m = 0, 1$  o  $2$  y  $n = 1, 2$  o  $3$ ; preferiblemente  $m$  es igual a  $1$  y  $n$  es igual a  $1$  o  $2$ ; aún más preferiblemente  $n$  es igual a  $1$ .

$R_1$  representa un grupo aromático, excluyendo indol, que es preferiblemente fenilo, naftilo, benzhidrilo, fluorenilo, estirenilo, antranilo o bifenilo, opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Los grupos de sustitución

preferidos son esos donantes de electrones tales como alquilo, alquilo xilo, hidroxilo, alquilamina, acilamina, sulfuro o alquilsulfuro.

5 El grupo R1 es preferiblemente un grupo naftaleno, sustituido con uno o más grupos metiloxi, preferiblemente con dos grupos metiloxi; en un aspecto aún más preferido de la invención R1 es 3,8-dimetoxi-naftalen-2-ilo.

R4 representa un grupo aromático, opcionalmente sustituido. El grupo R4 es preferiblemente un grupo fenilo, posiblemente sustituido con un grupo hidroxilo, alcoxilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, halógeno o nitro.

10 R2 y R3 son, independientemente, H o un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o, juntos, representan una cadena de alquileo de C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, unida al átomo de nitrógeno para formar una estructura cíclica.

Alternativamente, R3 puede ser un catión o grupo quelante de metal, directamente unido al grupo amino o unido a través de un espaciador.

15 El posible espaciador puede ser uno de los que ya se conocen en la técnica, por ejemplo los descritos en el documento GB-A-2.225.579 o en el documento WO9701579; pueden ser, por ejemplo, un grupo de fórmula -Z-R5-CO-, donde R5 es alquileo de C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub>, alquilenilo de C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub> o -CH(R6)-, donde R6 es la cadena lateral de un alfa aminoácido, y Z es una función capaz de formar un enlace covalente con el grupo quelante; Z puede ser, por ejemplo, un grupo funcional capaz de formar un enlace éter, éster o amídico con otro grupo funcional del grupo quelante (por ejemplo, hidroxilo, carboxilo o amina). Z preferiblemente es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre un radical carbonilo (o CO) o un radical amino (o NH).

20 El grupo Z es aún más preferiblemente un radical amino y el grupo de fórmula -Z-R5-CO- será un residuo bivalente que deriva de un aminoácido carboxílico, tal como por ejemplo, beta-alanina (o -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-), ácido 6-aminohexanoico (o -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-) u otros.

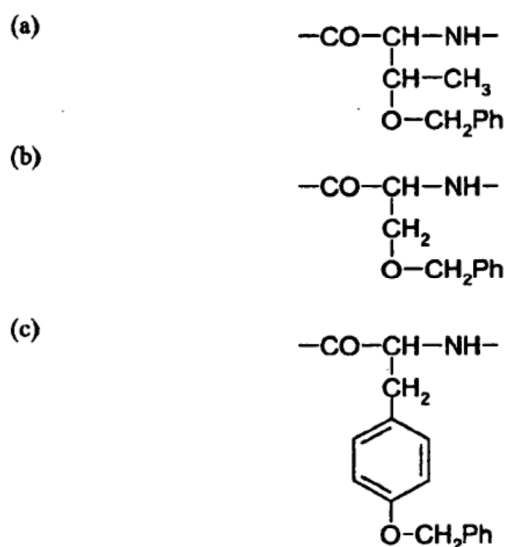
El grupo quelante es un grupo fisiológicamente aceptable, capaz de formar complejos con iones u otros elementos detectables o útiles para la radioterapia antitumoral y preferiblemente tiene un carácter hidrofílico.

30 Los grupos quelantes y los iones y otros elementos que forman complejos se pueden elegir útilmente entre esos ya conocidos y descritos, por ejemplo, por Okarvi S.M. en Med. Res. Rev. 24 (3), 357 (2004), por Weiner R.E. y Thakur M.L. BioDrugs 19(3), 145 (2005) o en el documento WO2002010192.

35 El grupo quelante puede estar en forma libre, salificado o en complejo con iones u otros elementos, ser detectable por radioactividad (radionúclidos) o con otros medios, o utilizable para fines radioterapéuticos.

40 Preferiblemente, el grupo quelante derivará de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y el ion será un ion paramagnético (Gd<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, u otros), fluorescente (Eu<sup>3+</sup>) o un radionúclido que emite radiaciones α, β o γ (111In, 99mTc, 169Yb, 177Lu, 90Y, 213Bi u otros).

X1 es un residuo aminoacilo de fórmula (a), (b) o (c)



X1 es preferiblemente un residuo aminoácido de fórmula (c).

Los residuos aminoácido, presentes en los ciclohexapéptidos de fórmula (I), pueden tener la configuración L o D; preferiblemente los residuos 1, 2 y 4-6 son L, y el residuo 3 es preferiblemente D.

Los ciclohexapéptidos de fórmula (I) pueden existir en forma de base libre o como sales. Las sales incluyen sales de adición con ácidos orgánicos (por ejemplo, acetatos, lactatos, benzoatos, aspartatos, pamoatos, etc.), ácidos poliméricos (por ejemplo, ácido polimetacrílico, ácido poliestirenosulfónico, etc.), o ácidos inorgánicos (por ejemplo, clorhidratos, sulfatos, nitratos, etc.).

Los compuestos de la invención son, in vivo, mucho más resistentes a los mecanismos de degradación en comparación con los ciclodisulfuros análogos de somatostatina (octreótido, lanreótido, etc.) y por consiguiente tienen una duración de acción más larga. En algunos casos, la estabilidad y la duración de la acción también mejoran con respecto a otros ciclo péptidos, incluyendo los ya conocidos por ser agonistas estables de somatostatina.

La presente invención también incluye los procesos para la producción de los compuestos de fórmula (I), de aquí en adelante llamados compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención se pueden producir usando diferentes métodos de síntesis, análogos a los métodos ya conocidos para otros péptidos.

a) Se puede producir un hexapéptido lineal correspondiente, parcialmente protegido, por medio de síntesis en fase sólida, de modo que deje tanto el grupo alfa amino N-terminal como el grupo alfa carboxílico C-terminal libres; los dos grupos libres se harán reaccionar, en solución, por medio de agentes de condensación apropiados y por último las protecciones de las cadenas laterales se eliminarán, obteniéndose el ciclohexapéptido deseado.

b) Alternativamente, la síntesis en fase sólida se puede realizar anclando el péptido a la resina por medio de la cadena lateral de la lisina; en este caso, después de haber eliminado selectivamente las protecciones de los grupos N-terminal y C-terminal, la ciclación se puede aún realizar en fase sólida y los compuestos de la invención se pueden obtener con un único tratamiento de desprotección y separación de la resina.

c) En otra alternativa, se puede preparar el péptido lineal protegido por medio de síntesis en solución y después, después de haber eliminado selectivamente las protecciones de los grupos N-terminal y C-terminal, se puede seguir como se describe en a).

El péptido lineal que se va a ciclar se puede elegir de entre seis péptidos hipotéticamente obtenibles por medio de la apertura de cualquiera de los seis enlaces peptídicos presentes en los compuestos de la invención. La elección se guiará por consideraciones de idoneidad de síntesis, que conocen los expertos en síntesis de péptidos, pero no tienen influencia mínimamente en la naturaleza del producto final, que en cualquier caso será idéntico cualquiera que sea la secuencia elegida del péptido lineal; preferiblemente, se eligen péptidos en los que el aminoácido C-terminal es lisina.

Muchos de los derivados de aminoácidos, necesarios para la síntesis de péptidos, se conocen y están comercialmente disponibles.

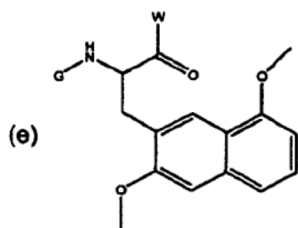
Se pueden preparar los derivados de hidroxiprolina como se describe en el documento WO9701579, o con otros procedimientos similares; alternativamente, los péptidos lineales parcialmente protegidos pueden contener un residuo de hidroxiprolina sin modificar, y la introducción de la cadena lateral se puede llevar a cabo directamente en los péptidos lineales, antes de la desprotección, o después de la ciclación, antes de la desprotección final.

Para los derivados quelantes de los compuestos de la invención, el grupo protector de la cadena unida a la hidroxiprolina se puede elegir apropiadamente de modo que sea posible selectivamente eliminarla, dejando la protección de la cadena lateral de la lisina sin alterar; de esta manera será posible unir el grupo quelante al grupo amino libre, directamente o por medio de un espaciador, antes de la desprotección final.

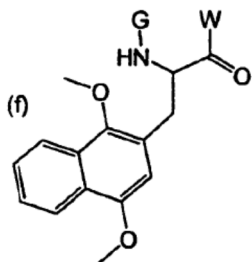
Algunos aminoácidos usados en la posición 3 de la fórmula general (I), como sus derivados, son nuevos y forman un aspecto adicional de la presente invención. En particular, se refiere a los aminoácidos:

3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina,  
3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina y  
2,5-dimetoxi-homofenilalanina

y a sus derivados total o parcialmente protegidos, que corresponden a las fórmulas (e), (f) y (g):

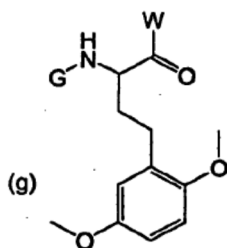


3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina y derivados



5

3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina y derivados



10

2,5-dimetoxi-homofenilalanina y derivados.

En las fórmulas (e), (g) y (f), G puede ser un átomo de hidrógeno o un grupo protector elegido entre los que conocen los expertos en la materia, tales como fluoren-9-il-metiloxi-carbonilo, tert-butiloxi-carbonilo o benciloxi-carbonilo; W puede ser un grupo hidroxilo o un grupo protector elegido entre los que conocen los expertos en la materia, por ejemplo, metiloxi, tert-butiloxi o benciloxi. Mediante derivados parcialmente protegidos, se quiere decir esos derivados donde solo uno, de entre G y W, representa un grupo protector.

Estos se pueden preparar adaptando métodos ya conocidos en la bibliografía (véase, por ejemplo, [J Org Chem 55, 2913 (1990)], [Org. Lett. 2, 1089 (2000)] y [Synthesis (1983), 38]); por ejemplo, empezando desde el aldehído correspondiente a la cadena lateral deseada, se puede usar el método descrito en el diagrama 1.

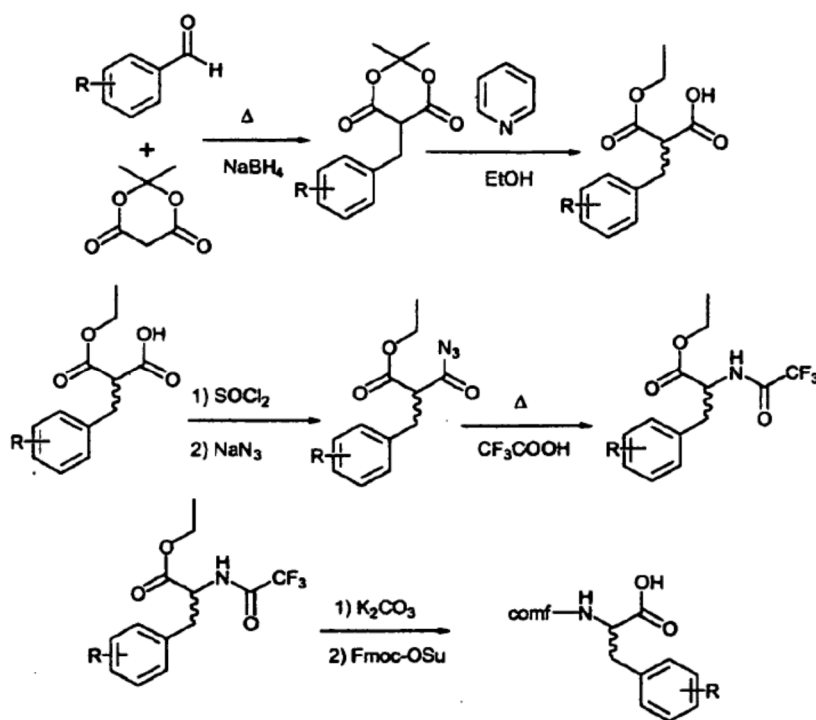


Diagrama 1

5 Los derivados anteriormente mencionados se pueden preparar como mezclas enantioméricas racémicas (D/L) o, por medio de síntesis estereoselectiva o métodos de resolución quiral, se pueden obtener como enantiómeros individuales D o L.

10 Entre los métodos de resolución quiral, se pueden usar los métodos de desracemización enzimática (tal como, por ejemplo, el descrito en el documento US2001021519), en los que la estereoselectividad de la enzima (por ejemplo, L o D aminoácido oxidasa) permite inducir la racemización de solo uno de los dos enantiómeros, después de lo cual ciclos de tratamiento repetidos permiten lograr alta pureza enantiomérica.

15 También objeto de la presente invención son las formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención.

20 Los compuestos de la invención se pueden administrar en forma libre o en forma de sales farmacéuticamente aceptables o como complejos. Tales sales y complejos se pueden preparar de una manera convencional y muestran el mismo orden de actividad que los compuestos libres. La presente invención también proporciona compuestos farmacéuticos que comprenden los compuestos de fórmula (I) en forma de base libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, junto con uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones se pueden formular de una manera convencional. Los compuestos de la invención también se pueden administrar en forma de liberación modificada, por ejemplo, como implantes, microcápsulas, microesferas o nanoesferas que comprenden, por ejemplo, polímeros o copolímeros biodegradables, en forma de formulación en liposoma, o en forma de autogel, por ejemplo, composiciones sólidas o semisólidas que pueden formar un gel después de la interacción con los líquidos del cuerpo del paciente.

30 Los compuestos de la invención o sus sales o complejos farmacéuticamente aceptables se pueden administrar por medio del cualquier vía convencional, por ejemplo, por vía parenteral, en forma de una solución o suspensión inyectable (que también incluye las formas de liberación modificada anteriormente indicadas), por vía oral, usando un promotor de absorción convencional, por vía nasal o como supositorios o por vía tópica, por ejemplo en forma de un líquido oftálmico, gel, preparación como ungüento o como suspensión, por ejemplo, suspensión de liposomas, como formulación de microesferas o nanoesferas, por ejemplo para instilación o inyección subconjuntival o intra o periocular.

35 Según un aspecto adicional de la invención, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado o un complejo de compuestos de la invención junto con excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones se pueden producir de una manera convencional y se pueden presentar, por ejemplo, para imagenología diagnóstica, como un kit que comprende dos dosis separadas, siendo una el radionúclido y la otra el conjugado de los compuestos de la invención, con instrucciones para su mezcla. Para

40

radioterapia, el conjugado de los compuestos de la invención en forma de complejo puede estar preferiblemente en forma de formulación líquida caliente.

5 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar los objetos de la presente invención y no se deben considerar de ninguna manera limitantes de la misma.

En los siguientes ejemplos, se usarán las siguientes abreviaturas:

10	1,4MNal	3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina
	2,5-MhPhe	2,5-dimetoxi-homofenilalanina
	3,8MNal	3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina
	ACN	Acetonitrilo
	Bn	Bencilo
	Boc	tert-butiloxi-carbonilo
15	DIPEA	Diisopropiletilamina
	DMF	N,N-dimetilformamida
	DPPA	Difenilfosforilazida
	DSC	Carbonato de N,N-disuccinimidilo
	Fmoc	Fluoren-9-il-metiloxi-carbonilo
20	Fmoc-OSu	Carbonato de N-succinimidilo, fluoren-9-carbonilo
	HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	hPhe	Homofenilalanina; ácido 2-amino-4-fenilbutírico
	Hyp	4, hidroxiprolina
	Nal	3-(Naftalen-2-il)-alanina; ácido 2-amino-3-naftalen-2-il-propiónico
25	NMM	N-metil morfolina
	Pd/C	Paladio metal sobre carbono
	Phg	Fenilglicina; ácido 2-amino-2-fenil-acético
	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
	Sty	Estiril-alanina; ácido 2-amino-5-fenil-pent-4-enoico
30	Tfa	Trifluoroacetilo
	THF	Tetrahidrofurano
	-Trt(Cl)-DVB	Resina, (2-cloro) tritil-divinilbenceno
	Z	Benciloxi-carbonilo

35 Excepto donde se indica de otra manera, los aminoácidos están en la configuración L; con (D/L) se indican los aminoácidos racémicos, mientras con (D,L) se indican los enantiómeros individuales de quiralidad indefinida.

#### Método general de purificación

40 Si no se indica de otra manera, todas las purificaciones finales se llevaron a cabo por medio de un sistema HPLC/MS de preparación de Waters con columnas Waters Symmetry C18 de 5 mm 19x50 mm, equipadas con espectrómetro de masas Waters ZQ.

#### Condiciones de operación:

45 Ionización centroide ES<sup>+</sup>, tiempo de barrido 15 minutos, barrido 120-1000 m/z, diferencia de potencial de cono 15V, fuente de temperatura 120°C, temperatura de solvatación 250°C.

#### Eluyentes de HPLC:

50 A = H<sub>2</sub>O, B = ACN, C = CF<sub>3</sub>COOH al 1% en H<sub>2</sub>O

Se disolvió una alícuota del producto crudo que se va a purificar en MeOH y se diluyó con una mezcla ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). La solución, filtrada en una membrana de PVDF de 0,45 mm, se inyectó en el sistema de preparación previamente descrito. Para cada carrera, se recogieron las fracciones correspondientes al pico asociado con el ion molecular esperado ([M+H]<sup>+</sup>), se combinaron y concentraron a sequedad. Si estaban presentes picos adicionales asociados con el mismo ion molecular (isómeros), estos se recogieron por separado.

#### Preparación de los intermedios:

#### 60 **Ejemplo 1**

Fmoc-(D/L) 3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina

65 a) 3,8-dimetoxi-2-naftaldehído (1 eq), 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (1,35 eq) y piperidina (0,12 eq) se disuelven en CHCl<sub>3</sub>, y la solución se calienta y se somete a reflujo durante 2,5 horas. Después de lavados acuosos, el



producto se recupera mediante evaporación del solvente y se vuelve a disolver en una mezcla de THF y metanol, y se añade NaBH<sub>4</sub> (5,4 eq) a la solución. Después de aproximadamente 10 minutos, se añade agua y la mezcla se acidifica a pH=3. Mediante evaporación parcial, se separa un sólido que se recupera y vuelve a disolver en etanol, se añade piridina y la mezcla se calienta a reflujo hasta que el producto inicial ha desaparecido por completo (control por TLC).

b) Después de haber evaporado el etanol, el producto (éster monoetílico del ácido 2-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il-metil)-malónico) se disuelve en cloroformo y se lava con agua ácida. Se añade cloruro de tionilo (1,3 eq) a la solución seca, y la mezcla se calienta a reflujo durante aproximadamente una hora. Después de evaporaciones repetidas del cloroformo, el residuo se disuelve en diclorometano y la solución se enfría en un baño de hielo. Se añade bromuro de tetrabutamonio (catalítico) y NaN<sub>3</sub> (1,2 eq) disuelta en agua, y después de dos horas a 0°C, la fase orgánica se recupera, la cual se lava con agua y se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido; la solución se deja a temperatura ambiente, en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido, durante una noche entera. Se añade ácido trifluoroacético (1,5 eq) a la solución filtrada, y la mezcla se calienta a reflujo durante aproximadamente 6 horas. Después de haber lavado con NaHCO<sub>3</sub> al 5%, el solvente se evapora y el aceite obtenido se purifica en una columna de gel de sílice.

c) El producto obtenido (Tfa-(D/L)3,8MNaI-OEt) se disuelve en una mezcla de THF, metanol y agua, que contiene K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq) y se calienta a reflujo durante una noche. La solución se evapora parcialmente y se añade Fmoc-OSu (1 eq) disuelto en THF. Tras terminar la reacción (control por TLC), el THF se evapora y el producto se recupera extrayendo la solución acuosa con acetato de etilo. Con la adición de n-hexano, se obtiene la precipitación del producto (Fmoc-(D/L)3,8MNaI-OH) que se filtra y seca (pureza por HPLC: 98,5%; m/z = 498 uma ([M+H]<sup>+</sup>)).

## Ejemplo 2

Fmoc-[4-(2-aminoetil)carbamoil]prolina

a) Se disuelven Z-Hyp-OBn y DSC (1 equivalente) en acetonitrilo u se tratan con trietilamina (1,2 eq). Después de una noche a temperatura ambiente, se añade N-Boc-diaminoetano (1,2 eq) y la mezcla se deja reaccionar durante 3,5 horas. Después de la evaporación del solvente, el residuo recuperado con acetato de etilo se lava, en orden, con KHSO<sub>4</sub> al 2,5%, NaHCO<sub>3</sub> y NaCl. La solución orgánica, secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido, se evapora a sequedad, recuperándose el producto.

b) El producto se disuelve en metanol y los grupos protectores (Z y éster bencílico) se eliminan por medio de hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C al 10%. Después de la filtración del catalizador, el aminoácido se recupera por evaporación del solvente, y se disuelve en una mezcla de agua y THF que contiene K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 eq), y después de haber enfriado a 0°C, se añade Fmoc-OSu (2 eq) disuelto en THF. Tras completar la reacción (control por TLC), el THF se evapora y el producto se recupera extrayendo la solución acuosa con acetato de etilo. Con la adición de n-hexano, se obtiene la precipitación del producto, que se filtra y seca (pureza por HPLC: 99,9%; m/z = 540 uma ([M+H]<sup>+</sup>)).

## Ejemplo 3

Fmoc-(D/L) 2,5-dimetoxi-homofenilalanina

a) A una suspensión de 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (1,3 eq) en DMF (50 ml), enfriada en un baño de hielo, se añaden NaCNBH<sub>3</sub> (1,8 eq) y 2,5-dimetoxifenilacetaldehído (1,1 eq). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 horas. Mediante la adición de H<sub>2</sub>O, se separa un sólido que se filtra, purifica mediante cristalización de isopropanol y por último se disuelve en EtOH y se trata a reflujo con piridina durante seis horas.

b) Operando como se ha descrito en el punto b) del ejemplo 1, a partir del producto obtenido (éster monoetílico del ácido 2-(2,5-dimetoxi-fenil-etil)-malónico), se prepara el aminoácido parcialmente protegido Fmoc-(D/L)2,5MhPhe-OH (pureza por HPLC: 96%; m/z = 462 uma ([M+H]<sup>+</sup>)).

## Ejemplo 4

Fmoc-(D/L) 3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)-alanina

Empezando a partir de 1,4-dimetoxi-2-naftaldehído y operando como se describe en el ejemplo 1, se obtiene el aminoácido protegido Fmoc-(D/L)1,4MNaI-OH (pureza por HPLC: 96,9%; m/z ([M+H]<sup>+</sup>)= 498 uma).

### Preparación de ciclopéptidos:

La pureza de los péptidos descritos en los ejemplos se analizó por medio de cromatografía de HPLC de fase reversa (cromatógrafo Agilent 1100), usando el siguiente método:

Eluyentes: A) TFA al 0,1% en acetonitrilo/agua (5:95 v/v)  
B) TFA al 0,1% en acetonitrilo

Gradiente de eluyente B: desde el 20% al 80% en 30 min.

5

Flujo: 1,0 ml/min

Columna: Jupiter 4  $\mu$  (4 x 250 mm)

### Ejemplo 5

10

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)3,8MNal-Lys] isómero B

a) H-Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHBoc)-Phe-(D/L)3,8MNal-Lys(Boc)-OH

15

Empezando de la resina Fmoc-Lys(Boc)-Trt(Cl)-DVB, se llevan a cabo varios ciclos de síntesis de péptidos en fase sólida, para obtener el hexapéptido deseado; en el primer ciclo se usa Fmoc-(D/L)3,8MNal-OH (véase el ejemplo 1) y en el tercer ciclo se usa Fmoc-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHBoc)-OH (véase el ejemplo 2); para cada ciclo, el grupo Fmoc se elimina con piperidina al 20% en DMF y el aminoácido posterior, protegido como Fmoc, se activa con HATU y se hace reaccionar con los grupos amino presentes en la resina.

20

Al final, el grupo Fmoc se elimina con piperidina al 20% en DMF y el péptido parcialmente protegido se elimina de la resina por medio de un tratamiento con una mezcla de ácido acético, trifluoroetanol y diclorometano (en proporción 1:2:7) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de haber evaporado el solvente, el residuo se divide entre acetato de etilo y NaHCO<sub>3</sub> al 5%, la fase orgánica se recupera y evapora, obteniéndose un residuo sólido.

25

b) ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)3,8MNal-Lys]

El péptido obtenido en c) se disuelve en DMF (1,6 mM) y se enfría a -10°C; se añaden DIPEA (2 eq) y DPPA (1,3 eq) y la mezcla se deja a +4°C durante 60 horas. Después de haber eliminado el DMF, el residuo se recupera con acetato de etilo y se lava con NaHCO<sub>3</sub> al 5%. Evaporando la fase orgánica, se obtiene un residuo sólido que se trata con TFA (al 95% en H<sub>2</sub>O) a 0°C durante 1 hora y después se evapora; diferentes especies de isómeros están presentes en el residuo, que se separan por medio de cromatografía de fase inversa (columna C18). El segundo isómero, en el orden de elución de la columna de HPLC (isómero B), se recoge puro.

35

HPLC: TR 14,74 min; pureza del 99,1%

MS: m/z = 1133 uma ([M+H]<sup>+</sup>) y 567 uma ([M+2H]<sup>2+</sup>)

### Ejemplo 6

40

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)2,5MhPhe-Lys] isómero B

a) H-Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHBoc)-Phe-(D/L)2,5-MhPhe-Lys(Boc)-OH

45

Se opera como se describe en el punto a) del ejemplo 5, usando Fmoc-(D/L)2,5MhPhe-OH (ejemplo 3) en el primer ciclo y Fmoc-Hyp-OH en el tercer ciclo. Antes de la eliminación del grupo Fmoc terminal, la resina se trata con p-nitrofenilcoloroformiato (5 eq) en presencia de NMM (5 eq); después de tres horas, la resina se lava con DCM y se trata con N-Boc-diaminoetano (5 eq) durante otras tres horas, y después se filtra y lava. A continuación se sigue como se describe en el punto a) del ejemplo 5.

50

b) ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)2,5MhPhe-Lys]

El péptido obtenido en a) se trata como se describe en el punto b) del ejemplo 5. También en este caso, se obtienen diferentes isómeros, que se separan por medio de cromatografía de fase inversa (columna C18). El segundo isómero, en el orden de elución de la columna de HPLC, (isómero B), se recoge puro.

55

HPLC: TR 13,82 min; pureza del 99,0%

MS: m/z = 549 uma ([M+2H]<sup>2+</sup>)

60

### Ejemplo 7

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>)-Phe-(D,L)3,8MNal-Lys] isómero B

65

Se opera como se describe en el ejemplo 6, usando Fmoc-(D/L)3,8MNal-OH (ejemplo 1) en el primer ciclo y Boc-N-(CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) para modificar la cadena lateral de hidroxiprolina. Se obtienen diferentes isómeros, que se

separan por medio de cromatografía de fase reversa (columna C18). El segundo isómero, en el orden de elución de la columna de HPLC, (isómero B), se recoge puro.

HPLC: TR 15,07 min; pureza del 94,5%

MS: m/z = 1147 uma ( $[M+H]^+$ ) y 574 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 8

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)1,4-MNal-Lys] isómero A

Se opera como se describe en el ejemplo 6, usando Fmoc-(D/L)1,4MNal-OH (ejemplo 4) en el primer ciclo. Se obtienen diferentes isómeros, que se separan por medio de cromatografía de fase reversa (columna C18). El isómero con menor tiempo de retención (isómero A), corresponde al producto del título.

HPLC: TR 13,71 min; pureza del 80,6%

MS: m/z = 1133 uma ( $[M+H]^+$ ) y 567 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 9

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D,L)1,4-MNal-Lys] isómero B

De la preparación descrita en el ejemplo previo, también se recoge el isómero B puro, el segundo en el orden de elución de la columna de HPLC.

HPLC: TR 14,71 min; pureza del 97,7%

MS: m/z = 1133 uma ( $[M+H]^+$ ) y 567 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 10

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D)Nal-Lys]

El compuesto se sintetiza según el procedimiento descrito en el ejemplo 6, usando Fmoc-(D)Nal-OH en el ciclo.

HPLC: TR 14,14 min; pureza del 99,5%

MS: m/z = 1073 uma ( $[M+H]^+$ ) y 537 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 11

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phe-(D)hPhe-Lys]

El compuesto se sintetiza según el procedimiento descrito en el ejemplo 6, usando Fmoc-(D)hPhe-OH en el primer ciclo.

HPLC: TR 13,81 min; pureza del 94,5%

MS: m/z = 1037 uma ( $[M+H]^+$ ) y 519 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 12

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>)-Phg-(D)Sty-Lys]

El compuesto se sintetiza según el procedimiento descrito en el ejemplo 7, usando Fmoc-(D)Sty-OH en el primer ciclo y Fmoc-Phg-OH en el segundo ciclo.

HPLC: TR 13,62 min; pureza del 97,8%

MS: m/z = 1049 uma ( $[M+H]^+$ ) y 525 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 13

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phg-(D)hPhe-Lys]

El compuesto se sintetiza según el procedimiento descrito en el ejemplo 6, usando Fmoc-(D)hPhe-OH en el primer ciclo y Fmoc-Phg-OH en el segundo ciclo.

HPLC: TR 12,78 min; pureza del 98,8%

MS: m/z = 512 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 14

ciclo[Tyr(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Tyr-(D,L)3,8MNaI-Lys] isómero B

Se opera como se describe en el ejemplo 5, usando Fmoc-Tyr(tBu)-OH en el segundo ciclo.

HPLC: TR 13,13 min; pureza del 95,4%

MS: m/z = 1149 uma ( $[M+H]^+$ ) y 575 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Ejemplo 15

ciclo[Ser(Bn)-Phe-Pro(4-OCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Tyr-(D,L)3,8MNaI-Lys] isómero B

Se opera como se describe en el ejemplo 5, usando Fmoc-Ser(Bn)-OH en el quinto ciclo.

HPLC: TR 12,26 min; pureza del 98,2%

MS: m/z = 1057 uma ( $[M+H]^+$ ) y 529 uma ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### Parte experimental

Los compuestos de la invención muestran propiedades farmacológicas importantes, como indican varios ensayos in vitro e in vivo.

En particular, los compuestos de la invención se unen, con buena afinidad, a al menos uno de los subtipos de los receptores de la somatostatina.

#### Ensayos de unión

Los ensayos de unión se llevaron a cabo, como se explica posteriormente, usando preparaciones de receptores humanos recombinantes, hSSTR1, hSSTR2, hSSTR3 y hSSTR5, obtenidos de membranas de células (por ejemplo CHO) transfectadas según métodos estándar.

Las membranas se incuban en duplicado durante 60 minutos a 25°C con 3-[125I]yodotirosil11 somatostatina-14 (Amersham, IM161, 2000 Ci/mmol) como radioligando y con concentraciones crecientes del compuesto en estudio, en tampón Hepes 25 mM (pH 7,4), que contiene MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 10 µg/ml de saponina, BSA al 0,5%. La incubación se termina por medio de filtración con un Filtermate Harvester (Perkin Elmer) a través de filtros GF/B, que después se lavan 6 veces con tampón (Hepes 25 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM). La radioactividad de los filtros se mide en un lector TopCounter™ o MicroBeta™ durante 1 min/pocillo después de haber añadido el líquido de centelleo Microscint 20 (Packard) e incubado durante 15 minutos en un agitador orbital. Los resultados se expresan como porcentaje de unión específica del ligando radiomarcado, en presencia de concentraciones crecientes del compuesto en estudio. Se calcularon los valores de CI50 usando el software "GraphPad Prism" (CI50 = concentración del compuesto necesaria para obtener la mitad de la inhibición máxima, en la prueba de unión competitiva descrita anteriormente).

Los valores de CI50 de los compuestos de la invención se sitúan en el campo de concentración nMolar, preferiblemente comprendidos entre 0,1 y 50 nM.

Compuesto	CI50 (nM)			
	hSSTR1	hSSTR2	hSSTR3	hSSTR5
Ejemplo 5	10,8	9,3	0,31	0,42
Ejemplo 6	10,0	25,8	0,52	0,64
Ejemplo 7	5,8	9,2	1,33	0,97
Ejemplo 8	19,1	26,6	2,92	9,78
Ejemplo 9	32,4	9,9	2,34	1,90
Ejemplo 10	113,8	1,7	1,22	0,52
Ejemplo 11	26,9	21,3	1,34	1,18

Ejemplo 12	39,3	3,3	4,03	4,86
Ejemplo 13	84,7	31,9	3,02	0,54
Ejemplo 14	21,7	1,8	0,35	0,36
Ejemplo 15	1,0	7,0	1,80	1,62

#### Ensayo para la inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento en células hipofisarias de rata

5 Los compuestos de la invención también muestran una actividad de inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento (GH), como se muestra a partir de pruebas llevadas a cabo in vitro en células hipofisarias de rata. Las glándulas hipofisarias retiradas de ratas macho adultas (CD1-SD, 175-200 g) se cortan en trozos pequeños y se incuban con colagenasa (1 mg/ml) en tampón de Hank que contiene BSA al 1%, Hepes 20 mM, antibióticos, durante 20 minutos a 37°C. Las células dispersadas, después de haber sido lavadas varias veces con tampón, se distribuyen, con 20000 células/pocillo, en placas de 48 pocillos y se mantienen en cultivo durante 6-7 días (DMEM que contiene suero bovino fetal al 5%, suero de caballo al 5%, aminoácidos no esenciales al 1%). El día del experimento, las células se lavan con tampón de Hank y después se incuban a 37°C durante 1 hora en presencia de tampón de Hank al que añade BSA al 1% y HEPES 20 mM. A continuación el tampón se sustituye con tampón reciente, aún en presencia de BSA al 1% y HEPES 20 mM. Las células se incuban después durante 3 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> con varias concentraciones de los productos en estudio y con GHRH 3x10<sup>-9</sup> M. La GH liberada en el medio se mide usando el kit de ELISA Rat Growth Hormone Biotrack Enzymeimmunoassay (Amersham RPN2561) o el kit Mouse/Rat GH ELISA (DSL-10-72100) según las indicaciones del suministrador. Los compuestos de la invención inhiben la liberación de GH a concentraciones en el intervalo de 10<sup>-11</sup> a 10<sup>-6</sup> M; el compuesto del ejemplo 5 tiene un valor de CI<sub>50</sub> de 1,3 nM.

#### 20 Ensayo para la inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento en células humanas de adenoma hipofisario que secreta GH

25 Los compuestos de la invención también muestran una actividad inhibidora de la liberación de GH de células humanas de adenoma hipofisario que secreta GH, como se indica mediante las pruebas in vitro en informes tumorales clínicos. La prueba se ejecuta usando biopsias de tumores humanos; la GH producida de las células no estimuladas, en presencia de cantidades variables del compuesto en estudio, se mide usando el kit de ELISA hGH - EASIA (biosource KAP1081) según las indicaciones del suministrador. En los tumores sensibles a la acción de somatostatina y análogos, los compuestos de la invención reducen a la mitad la producción de GH a concentraciones en el intervalo de 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-6</sup> M; preferiblemente a la concentración de 10 nM.

#### 30 Ensayo para la inhibición in vivo de la producción de GH, estimulada por barbitúricos

35 Los compuestos de la invención inhiben, in vivo, la liberación de GH estimulada por la administración de Nembutal. Los compuestos se administran por vía subcutánea, en diferentes dosis, a ratas macho (CD, Harlan Italia). Se recogen muestras de sangre, a diferentes tiempos, una hora después de que los animales se anestesiaran por medio de administración intraperitoneal de Nembutal (60 mg/kg); los niveles de hormona se miden por medio de la prueba de ELISA. En los animales tratados con los compuestos de la invención, en dosis desde 5 a 250 µg/kg, hay una disminución de los niveles de GH producida. El compuesto del ejemplo 1, a la dosis de 5 µg/kg, reduce en el 55% la liberación de GH medida seis horas después de la administración; a la dosis de 125 µg/kg la reducción de GH es aún medible 24 horas después de la administración.

#### Ensayo para el perfil farmacocinético

45 Los compuestos de la invención también muestran, en ratas, un perfil farmacocinético muy favorable. El perfil farmacocinético se midió administrando los compuestos a ratas macho, por vía subcutánea, a la dosis de 1 mg/kg (CD, Sprague Dawley; 200-250 g). Se recogieron muestras de sangre, a diferentes tiempos, hasta 72 horas después de la administración. Las concentraciones del compuesto en estudio se midieron en las muestras de plasma separadas, por medio de un método de análisis de LC-MS/MS y los valores se procesaron según un modelo no compartimental usando el software "Kinetica". En la siguiente tabla, se describen los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos con el compuesto del ejemplo 1, comparados con los obtenidos con PASIREOTIDO, otro análogo estable de somatostatina, actualmente en fase de desarrollo clínico (se preparó PASIREOTIDO siguiendo el proceso descrito en el documento WO2002010192).

		Ejemplo 5	PASIREOTIDO
Dosis	(mg/kg)	1	1
C <sub>max</sub>	(ng/ml)	224,02	667,88
t <sub>max</sub>	(h)	4	2
t <sub>1/2</sub>	(h)	31,3	24,4
AUC <sub>0-t</sub>	(ng/ml*h)	2728,50	2781,40
AUC <sub>tot</sub>	(ng/ml*h)	2883,06	2795,85
TRM	(h)	18,96	4,87

El compuesto del ejemplo 5 es mejor que PASIREOTIDO tanto en términos de semivida como para el tiempo de residencia media (TRM); en el caso de OCTREÓTIDO, el valor de  $t_{1/2}$  es aproximadamente 2 horas.

5 Los compuestos de la invención son por consiguiente útiles para la prevención o el tratamiento de trastornos con un origen que comprende o está asociado con un exceso de secreción de GH y/o un exceso de IGF-1, tal como en el tratamiento de acromegalia, en el tratamiento de diabetes mellitus de tipo I o tipo II, especialmente en sus complicaciones, tales como por ejemplo, angiopatía, retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético, nefropatía y fenómeno hiperglucémico al despertar y otros trastornos metabólicos relacionados con la liberación de  
10 insulina o glucagón, tales como por ejemplo, obesidad mórbida u obesidad hipotalámica u obesidad hiperinsulinémica. Los compuestos de la invención son útiles también en el tratamiento de fistulas enterocutáneas y pancreáticas cutáneas, síndrome del intestino irritable, enfermedades inflamatorias, tales como por ejemplo, enfermedad de Grave, enfermedad del intestino irritable, psoriasis o artritis reumatoide, poliquistosis renal, enfermedad de vaciado gástrico rápido, síndrome de diarrea acuosa, diarrea relacionada con SIDA, diarrea inducida  
15 por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica, tumores gastrointestinales que secretan hormonas (por ejemplo tumores GEO, tales como vipomas, gluconomas, insulinomas, carcinoides), linfocitos malignos, tales como linfomas o leucemias, carcinomas hepatocelulares como hemorragia gastrointestinal, como hemorragia varicosa esofágica.

20 Los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de tumores positivos para los receptores de somatostatina, tales como por ejemplo, los tumores que tienen los receptores SSTR1, SSTR2, SSTR3 y/o SSTR5, como se indica en las pruebas proliferativas con varias líneas de células cancerosas que expresan los receptores para somatostatina.

25 Para todas las indicaciones anteriormente mencionadas, la dosis requerida naturalmente variará con respecto a, por ejemplo, el paciente, el modo de administración y la gravedad de la afección que se debe tratar. Generalmente, sin embargo, se obtienen resultados satisfactorios con administraciones desde 1  $\mu\text{g}$  hasta 0,7 mg/kg/día de los compuestos de la invención. Una dosis diaria recomendada para pacientes está en el orden de aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  hasta 50 mg, preferiblemente desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 40 mg, por ejemplo desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 3 mg s.c. del compuesto convenientemente administrado en dosis  
30 divididas, hasta 3 veces al día, en formas farmacéuticas individuales que contienen, por ejemplo, desde aproximadamente 0,5  $\mu\text{g}$  hasta aproximadamente 25 mg, por ejemplo desde aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  hasta aproximadamente 20 mg, por ejemplo desde aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  hasta aproximadamente 1,5 mg de los compuestos de la invención. Los conjugados de los compuestos de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables son útiles tanto como agentes para imagenología diagnóstica, por ejemplo para la presentación de tejidos y células positivas para los receptores de somatostatina, tales como los tumores y metástasis positivos para  
35 los receptores de somatostatina, y para los trastornos inflamatorios y autoinmunes que muestran receptores de somatostatina, tuberculosis o el rechazo de órganos después del trasplante, cuando están en complejo con un elemento detectable, tal como por ejemplo los núclidos  $\gamma$  o positrones emisores, un ion metálico fluorescente o un ion paramagnético, tales como por ejemplo,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Cr}^{2+}$ , o como  
40 radiofármacos para el tratamiento in vivo de tumores y metástasis positivos para los receptores de somatostatina, para artritis reumatoide, y afecciones de inflamación graves, cuando están en complejo con un núclido  $\alpha$ - o  $\beta$ -emisor con una cascada de electrones Auger, por ejemplo  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  o  $^{201}\text{Tl}$ .

45 Los conjugados de los compuestos de la invención en forma de complejo para su uso en imagenología diagnóstica se pueden administrar por vía intravenosa, por ejemplo en forma de solución o suspensión inyectable, preferiblemente en forma de inyección única. Los radiomarcadores preferiblemente se pueden hacer justo antes de la administración al paciente.

50 En animales, un intervalo de dosis recomendado puede ser desde 0,01 hasta 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de conjugado de los compuestos de la invención, en complejo con 0,02-0,5 mCi de radionúclido  $\gamma$ -emisor. En los mamíferos más grandes, tales como seres humanos, un intervalo de dosis recomendado puede ser desde 1 a 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de conjugado de los compuestos de la invención en complejo, por ejemplo, con 1-100 mCi/ $\text{m}^2$  de elemento detectable, tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$ .

55 Las dosis usadas en la práctica del uso radioterapéutico de la presente invención dependerán, por supuesto, de las afecciones particulares que se deben tratar, por ejemplo, la radiotoxicidad conocida para órganos sanos que expresan los receptores de somatostatina, el tamaño de la masa tumoral y la terapia deseada. En general, la dosis se calcula basada en los datos farmacocinéticos y los datos de distribución de la radioactividad obtenidos de órganos sanos y basada en la captación observada en la diana. Un complejo o un conjugado  $\beta$ -emisor de los compuestos de la invención se puede administrar repetidamente, por ejemplo, durante un periodo de 1-3 meses.  
60

En animales, un intervalo de dosis recomendado puede ser desde 20 hasta 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de conjugado de los compuestos de la invención en complejo con 15-70 mCi de núclido  $\alpha$ - o  $\beta$ -emisor, o un núclido con la cascada de electrones Auger, tales como por ejemplo,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  o  $^{161}\text{Tb}$ . En mamíferos más grandes, tales como seres humanos, un intervalo de dosis recomendado puede ser desde 1-100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de un conjugado en complejo de un  
65

compuesto de la invención, por ejemplo desde 1-100 mCi/m<sup>2</sup> de un núcleo α- o β-emisor, o un núcleo con la cascada de electrones Auger, tales como por ejemplo, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu o <sup>161</sup>Tb.

5 Los conjugados de los compuestos de la invención en forma de complejo para su uso como agentes de radioterapia se pueden administrar a través de cualquier vía convencional, por ejemplo, por vía intravenosa, por ejemplo en forma de solución inyectable. Se pueden inyectar ventajosamente mediante infusión, por ejemplo con una infusión de 15-60 min. Dependiendo del sitio del tumor, se puede administrar tan cerca como sea posible al sitio del tumor, por ejemplo a través de un catéter. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de los compuestos de la invención en forma de base libre o como sal farmacéuticamente aceptable o como complejo con un agente detectable o radioterapéutico, junto con uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

15 Los compuestos de la invención o sus conjugados en forma de complejos son útiles para el mapeo o tratamiento de los tumores que expresan o acumulan los receptores, como los tumores hipofisarios, tumores gastro-entero-pancreáticos, carcinoides, tumores del sistema nervioso central, tumores de mama, tumores de próstata (incluyendo cáncer de próstata avanzado resistente a hormonas), tumores de ovario o colon, tumor de pulmón microcítico, oclusión intestinal maligna, paragangliomas, cáncer de riñón, cáncer de piel, neuroblastomas, feocromocitomas, carcinoma medular del tiroides, mielomas, linfomas, linfomas de Hodgkins y linfomas no de Hodgkins, tumores de hueso y sus metástasis, junto con trastornos autoinmunes o inflamatorios, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Grave u otras enfermedades inflamatorias del ojo.

20 Los compuestos de la invención o sus conjugados en complejo se pueden administrar como único principio activo o se pueden administrar en combinación, por ejemplo, como adyuvantes, con otros principios activos. Por ejemplo, se pueden usar en combinación con un agente inmunosupresor, por ejemplo un inhibidor de calcineurina, como ciclosporina A o FK506; con una lactona macrocíclica que tenga propiedades inmunosupresoras, como rapamicina; con un anticuerpo monoclonal con propiedades inmunosupresoras o con un agente antiinflamatorio.

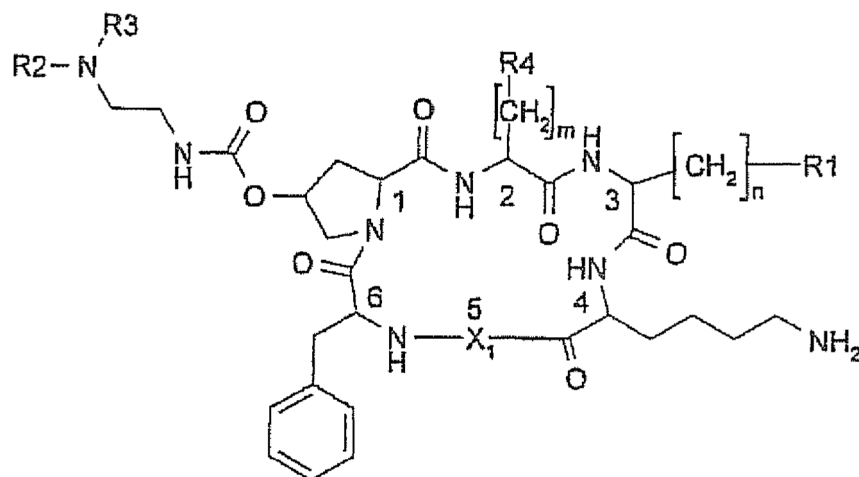
25 Los compuestos de la invención o sus conjugados en complejo también se pueden usar en combinación con un agente antiproliferativo, por ejemplo un principio activo quimioterapéutico, como paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina, 5-fluorouracilo o taxol, con un agente hormonal o antagonista, por ejemplo, un antiandrógeno o mitoxantrona (especialmente en el caso de cáncer de próstata) o con un antiestrógeno, como letrozol (especialmente en los casos de cáncer de mama), con un antimetabolito, con un alcaloide de una planta, con un modificador de la respuesta biológica, preferiblemente un interferón o una linfoquina, con un inhibidor de una proteína tirosina quinasa y/o con las serina/treonina quinasas, con un inhibidor enzimático de histona desacetilasa o con un agente con otros mecanismos de acción o desconocidos, tales como por ejemplo, una epotilona o derivados de epotilona, o con una lactona macrocíclica tal como por ejemplo rapamicina, RAD o CCI779.

30 Cuando los compuestos de la invención o sus conjugados en forma de complejos se administran en combinación con otro fármaco, las dosis de los fármacos coadministrados por supuesto variarán como una función de las afecciones que se van a tratar etcétera. Los términos "coadministración" o "administración combinada" se usan aquí para querer decir una administración de los agentes terapéuticos elegidos para un único paciente, y se pretende que incluya pautas de tratamiento en las que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

35 40 45 50 La combinación particular de la invención se seleccionará dependiendo de si la enfermedad o trastorno se debe prevenir o tratar; por ejemplo, una combinación con un agente inmunosupresor, por ejemplo para la prevención o el tratamiento de rechazo a trasplante crónico, una combinación con un secretagogo de insulina, con un promotor de la secreción de insulina, con un sensibilizante de insulina con una dosis baja de insulina en el tratamiento de la diabetes y en sus complicaciones, una combinación con un agente antiinflamatorio para la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, una combinación con un agente con efecto antiangiogénico para la prevención o el tratamiento, por ejemplo, de edema macular o degeneración o cáncer, una combinación con un agente quimioterapéutico para su uso en cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I):



5

Fórmula (I)

10 en donde m varía de 0 a 2; n varía de 1 a 3; R1 es un grupo aromático, excluyendo indol, opcionalmente sustituido en una o más posiciones; R4 es un grupo aromático, opcionalmente sustituido; R2 y R3 son, independientemente, H o un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o, juntos, son una cadena de alquileo de C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, unida al átomo de nitrógeno para formar una estructura cíclica; o R3 es un catión o grupo quelante de metales;

15 X1 es un residuo aminoacilo de fórmula (a), (b) o (c)



20 2. Compuestos según la reivindicación 1, en donde el ion o grupo quelante de metales está directamente unido al grupo amino, o está unido a través de un espaciador, y en donde dicho espaciador es preferiblemente un grupo de fórmula -Z-R5-CO-, en donde R5 es alquileo de C<sub>1-11</sub>, alquilenilo de C<sub>1-11</sub> o -CH(R6)-, en donde R6 es la cadena lateral de un alfa aminoácido, y Z es un grupo funcional capaz de formar un enlace éter, un enlace éster o un enlace amídico con un grupo funcional presente en el grupo quelante, preferiblemente un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un radical carbonilo o un radical amino.

25

3. Compuestos según la reivindicación 1, en donde m es igual a 1 y n varía de 1 a 2, y preferiblemente n es igual a 1.

30

4. Compuestos según la reivindicación 1, en donde R1 es fenilo, naftilo, benzhidrilo, fluorenilo, estirenilo, antranilo o bifenilo, opcionalmente sustituidos en una o más posiciones por grupos donantes de electrones preferiblemente elegidos de entre alquilos, alquiloilos, hidroxilos, alquilaminas, acilaminas, sulfuros o alquilsulfuros.



5. Compuestos según la reivindicación 1, en donde R1 es un grupo naftaleno sustituido con uno o más grupos metiloxi, preferiblemente con dos grupos metiloxi, y, más preferiblemente R1 es 3,8-dimetoxi-naftalen-2-ilo.
- 5 6. Compuestos según la reivindicación 1, en donde R4 es fenilo, opcionalmente sustituido con hidroxilos, alcoxilos de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilos de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, halógenos o grupos nitro y, preferiblemente R4 es 4-hidroxifenilo.
7. Compuestos según la reivindicación 1, en donde el grupo R3 es un agente quelante hidrofílico, preferiblemente derivado de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA).
- 10 8. Compuestos según la reivindicación 1, en donde el grupo quelante R3 es un grupo quelante en forma libre, salificado o en complejo con cationes o elementos radioactivos (radionúclidos), preferiblemente en complejo con un ion paramagnético, tales como Gd<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, o un ion fluorescente, tal como Eu<sup>3+</sup> o un radionúclido que emite radiaciones α, β o γ, tal como <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>169</sup>Yb, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y o <sup>213</sup>Bi.
- 15 9. Compuestos según la reivindicación 1, en donde X1 es un residuo aminoacilo de fórmula (c).
10. Compuesto según la reivindicación 1, en donde los residuos aminoacilos del ciclohexapéptido en la fórmula (I), tienen configuración L o D; preferiblemente, los residuos 1, 2 y 4-6 son L, y el residuo 3 es preferiblemente D.
- 20 11. Compuestos según la reivindicación 1, en donde uno de los grupos amino puede estar opcionalmente en forma protegida, o en su forma salificada o en complejo, preferiblemente en forma mono- o disalificada, más preferiblemente en donde la sal es una sal de adición con ácidos orgánicos, ácidos polímeros o ácidos inorgánicos.
- 25 12. Compuestos según la reivindicación 11, en donde las sales se eligen de entre acetatos, lactatos, benzoatos, aspartatos, pamoatos, polimetacrilatos, poliestirensulfonatos, clorhidratos, sulfatos o nitratos.
- 30 13. Compuesto según la reivindicación 1 elegido del grupo compuesto de
- ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)[3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero B,
  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)(2,5-dimetoxi)hPhe-Lys] isómero B,

35 - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-metilaminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)[3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero B,

  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)[3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero A,
  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)[3-(1,4-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero B.

40 - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D)[3-(naftalen-2-il)]-Ala-Lys],

  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D)hPhe-Lys],
  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-metilaminoetil)carbamoil]Pro-Phg-(D)estirilAla-Lys],
  - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phg-(D)hPhe-Lys],

45 - ciclo[Tyr(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Tyr-(D,L)[3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero B, y

  - ciclo[Ser(Bn)-Phe-[4-(2-aminoetil)carbamoil]Pro-Phe-(D,L)[3-(3,8-dimetoxi-naftalen-2-il)]Ala-Lys] isómero B,
- 50 y sus sales y complejos farmacéuticamente aceptables.
14. Un proceso para la preparación de los ciclohexapéptidos de la reivindicación 1, que comprende los siguientes pasos:
- 55 a) preparación de un hexapéptido lineal en el que los grupos funcionales opcionales presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos están opcionalmente en forma protegida;
- b) ciclación de dicho hexapéptido por medio de uno o más agentes condensantes;
- c) eliminación opcional de los grupos protectores opcionales;
- 60 d) purificación final del ciclohexapéptido obtenido de esta manera.
15. Proceso según la reivindicación 14, en donde el aminoácido C-terminal del péptido lineal obtenido en el punto a) es lisina.
- 65 16. Un proceso según la reivindicación 14, en donde uno de los residuos de aminoácidos del péptido lineal obtenido en el punto a) es 4-(2-amino-etilcarbamoil-oxi)-prolina, protegido en el grupo amino de la cadena

lateral, preferiblemente 4-hidroxi-prolina con el grupo 4-hidroxilo sin proteger, más preferiblemente en donde el grupo 2-amino-etilcarbamoilo se une al grupo hidroxilo de la 4-hidroxi-prolina, después de la ciclación de la fase b), pero antes de la posible eliminación de los grupos protectores opcionales de la fase c).

- 5 17. Los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, o una sal o complejo farmacéuticamente aceptable para su uso como un medicamento.
- 10 18. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 19. Una composición según la reivindicación 18, caracterizada por estar en una forma para la liberación modificada o la liberación tópica.
- 20 20. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de angiogénesis, retinopatía proliferativa, edema macular, trastornos relacionados con enfermedades de neovascularización coroidea, enfermedades de injerto de vasos, estenosis de injerto venoso, restenosis y oclusiones vasculares después de daño vascular, fistulas enterocutáneas y pancreáticas cutáneas, síndrome del intestino irritable, enfermedades y trastornos inflamatorios, poliquistosis renal, síndrome de vaciado gástrico rápido, síndrome de diarrea acuosa, diarrea relacionada con SIDA, diarrea inducida por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica, hemorragia gastrointestinal, tumores y tumores malignos.
- 25 21. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de acromegalia.
- 30 22. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de tumores gastrointestinales que secretan hormonas, preferiblemente tumores carcinoides.
23. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en combinación con un agente inmunosupresor, con un agente antiinflamatorio, con un agente modulador del receptor del secretagogo de GH, con un antagonista del receptor de GH, con un secretagogo de la insulina, con un promotor de la secreción de insulina, con un sensibilizante de insulina, con una dosis baja de insulina, con un agente que tiene efectos antiangiogénicos o con un agente quimioterapéutico.