

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 615**

51 Int. Cl.:

C07K 14/655 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011** **E 11739109 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 2585486**

54 Título: **Nuevos compuestos octapeptídicos y su utilización terapéutica**

30 Prioridad:

22.06.2010 EP 10290336

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2014

73 Titular/es:

IPSEN PHARMA S.A.S. (33.3%)
65 quai Georges Gorse
92100 Boulogne-Billancourt, FR;
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE C.E.A.
(33.3%) y
THE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)

72 Inventor/es:

CINTRAT, JEAN-CHRISTOPHE;
LIGETI, MELINDA;
ROUSSEAU, BERNARD;
ARTZNER, FRANCK;
TARABOUT, CHRISTOPHE;
PATERNOSTRE, MARIE-THÉRÈSE;
FAY, NICOLAS;
CHERIF-CHEIKH, ROLAND y
VALERY, CÉLINE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 477 615 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 y su utilización terapéutica.

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. 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, 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, hipertensión, 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 incluidas 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.

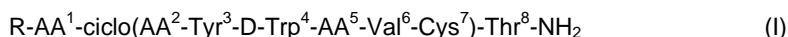
En la actualidad, se dirige una atención creciente a los péptidos que tienen afinidad por los receptores de la somatostatina. Así, se ha estudiado mucho la lanreótida para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la hormona del crecimiento (Cendros JM, Peraire C, Trocóniz IF, Obach R. Pharmacokinetics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

En la solicitud de patente internacional WO-A1-2010037930 se han descrito compuestos octapeptídicos que consisten en el lanreótido modificado en posición 4.

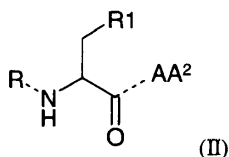
La necesidad de encontrar alternativas a las soluciones existentes constituye por lo tanto un objetivo principal. La presente invención se inscribe en este ámbito.

La solicitante propone, por lo tanto, nuevos compuestos octapeptídicos que presentan una buena afinidad sobre los receptores de la somatostatina.

La presente invención tiene, por lo tanto, como objetivo un compuesto octapeptídico de fórmula general (I):



en la que AA¹ representa un radical de aminoácido unido al radical R y al aminoácido AA² según la fórmula:

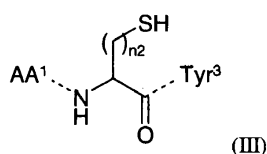


en la que:

R1 representa el radical naftilo opcionalmente sustituido con uno o varios radicales alquilo;

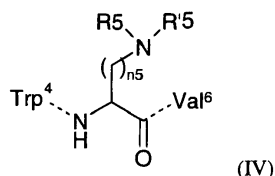
5 R representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo o acetilo;

AA² representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos AA¹ y Tyr³ según la fórmula:



en la que n2 representa un número entero de 1 a 2;

10 AA⁵ representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos Trp⁴ et Val⁶ según la fórmula



en la que R5 y R'5 representan independientemente un átomo de hidrógeno o un radical alquilo o acetilo, y n5 representa un número entero de 1 a 4;

entendiéndose que:

15 si AA² representa un radical de aminoácido cisteína, entonces

bien AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina y AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina;

bien AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina;

20 bien AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina;

si AA² no representa un radical de aminoácido cisteína, entonces AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina,

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

25 o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

Según 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 que tiene X como cadena lateral tendrá como radical, el radical de fórmula -NH-CH(X)-C(O)-.

30 Según 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.

5 Según 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.

10 Según 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:

D-2-Nal¹, Ac-D-2-Nal¹, CH₃-D-2-Nal¹ representan una alanina sustituida en β con un radical naftilo respectivamente no sustituido y sustituido en su función amina con un radical acetilo o metilo en su posición 1;

15 Hcy representa una homocisteína, es decir, una cisteína cuya cadena lateral está alargada en un eslabón de metileno;

Orn representa una ornitina, es decir, una lisina cuya cadena lateral está acortada en un eslabón de metileno;

20 Dab representa el ácido diaminobutírico, es decir una lisina cuya cadena lateral está acortada en dos eslabones de metileno;

Dab representa el ácido diaminopropiónico, es decir una lisina cuya cadena lateral está acortada en tres eslabones de metileno;

Lys(Ac) y (Me)₂Lys representan una lisina sustituida en la función amina de su cadena lateral con, respectivamente, uno o varios radicales acetilo o metilo.

25 Preferentemente, n₅ representa un número entero de 1 a 4 y, de forma aún más preferente, n₅ representa un número entero de 3 a 4.

Preferentemente, AA² representa un radical de aminoácido cisteína, es decir n₂ es igual a 1.

Preferentemente, AA² no representa un radical de aminoácido cisteína, es decir n₂ es igual a 2.

30 Preferentemente, AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina, es decir, R representa un radical alquilo o acetilo y AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina, es decir n₅ es igual a 4 y R₅ y R'₅ representan átomos de hidrógeno.

Preferentemente, AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina, es decir, R representa un átomo de hidrógeno, y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina, es decir, bien n₅ es un número entero de 1 a 3 o bien n₅ es igual a 4 y R₅ y R'₅ representan un radical alquilo o acetilo.

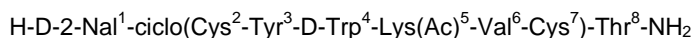
35 Preferentemente, AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina, es decir, R representa un radical alquilo o acetilo, y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina, es decir, bien n₅ es un número entero de 1 a 3 o bien n₅ es igual a 4 y R₅ y R'₅ representan un radical alquilo o acetilo.

Preferentemente, AA¹ representa el radical de aminoácido elegido entre 2-Nal, Ac-2-Nal y CH₃-2-Nal. De forma preferente, AA¹ tiene la configuración D.

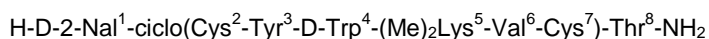
40 Preferentemente, AA² representa el radical de aminoácido elegido entre Cys y Hcy.

Preferentemente, AA⁵ representa el radical de aminoácido elegido entre Lys, Lys(Ac), Orn, (CH₃)₂Lys, Dab y Dap.

Preferentemente, el compuesto octapeptídico de fórmula general (I) se elige entre:



45 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂



Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

CH₃-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dab⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dap⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

De forma más preferente, el compuesto octapeptídico de fórmula general (I) se elige entre:

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-(Me)₂Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂; y

10 Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Dys⁷)-Thr⁸-NH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

De forma aún más preferente, el compuesto octapeptídico de fórmula general (I) se elige entre: H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

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

La invención tiene igualmente como objetivo 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.

20 La invención tiene igualmente como objetivo 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.

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

25 La invención tiene igualmente como objetivo 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.

30 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.

35 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.

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.

40 La administración de una composición según 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 por un experto en el campo al que pertenece la invención.

45 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:

5 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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y el volumen de inyección a 20 μL .

10 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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El analizador es de tipo de cuadrípulo (modelo ZQ2000). Los espectros se registran con el programa informático Mass Lynx 4.0 en el dominio de m/z de 100-1000 para las moléculas orgánicas y de 100-2000 para los péptidos.

HPLC-preparativa:

20 Se utilizan dos sistemas para la purificación de los 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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Los dos sistemas de HPLC preparativa se utilizan en modo isocrático después de la determinación de las condiciones óptimas.

Análisis de RMN:

25 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 y 100 MHz para el carbono 13. 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 = doblete ancho, ddd = doblete ancho, t = triplete, ta = triplete ancho, q = cuadruplete, qd = cuadruplete de dobletes, m = multiplete.

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

35 Las medidas de la masa exacta se llevan a cabo en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (LCT de Micromass®, UK), equipado de una fuente de electropulverización (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 6.500 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 mediante un HPLC equipado de un sistema de introducción automática de muestras (Alliance 2795 de Waters®, UK) con un caudal de 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. El volumen de inyección es de 10 μL . El voltaje del capilar es de 2.800 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 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. El caudal del gas de cono (nitrógeno) es de 20 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. TDC de finalización: 100 mV.

Espectrometría de IR:

45 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 μL 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:

50 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 μbar . Las muestras acuosas se solidifican en nitrógeno líquido antes de ser conectadas a este aparato.

Microscopio:

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).

Reactivos utilizados

- 5 La resina de síntesis peptídica se obtiene de Novabiochem, división de Merck 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.

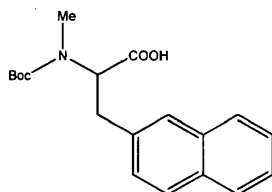
- 10 Los aminoácidos se adquieren en Bachem (Weil am Rhein, Alemania), Fluka (Buchs, Suiza), Acros Organics (Geel, Bélgica) y NeoMPS (Strasbourg, Francia).

Aminoácidos precursores disponibles comercialmente:

Los aminoácidos Fmoc-Lys(Ac)-OH, Acetil- β -(2-naftil)-D-alanina, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Homocys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH y Fmoc-Dap(Boc)-OH están disponibles comercialmente.

15

Síntesis del aminoácido N-Metil-Boc-D-2-Nal-OH

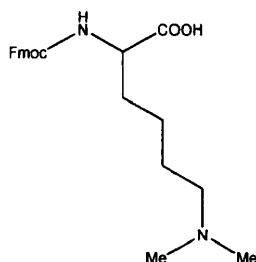


- 20 A una suspensión de 2,4 g (60 mmoles) de NaH (60% en aceite mineral) en 80 mL de THF anhidro llevado a 0°C, se le añaden 3,2 g (10 mmoles) de Boc-D-2-Nal-OH disueltos en 20 mL de THF anhidro. El medio de reacción se agita durante 15 minutos a 0°C y después se añaden gota a gota 10 mL (160 mmoles) de MeI. A continuación se prosigue la reacción durante 4 horas a 0°C, entonces se vuelven a añadir 5 mL de MeI, a continuación se lleva el medio de reacción a temperatura ambiente y se deja con agitación durante toda la noche. El medio de reacción se neutraliza a 0°C con 20 mL de una disolución saturada de NH₄Cl y después se evaporan el THF y el MeI mediante un evaporador rotatorio. A continuación se añaden 100 mL de hexano, se recupera la fase gaseosa y se lava 2 veces con 100 mL de hexano. Se añade 100 mL de acetato de etilo y se acidifica (pH 2) la fase acuosa, a continuación se extrae la fase acuosa 3 veces con 100 mL de acetato de etilo. A continuación se reúnen las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y después se evaporan. El producto esperado se cristaliza a continuación en una mezcla de hexano/acetato de etilo (1,82 g, 55%).

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD): δ 1,22 (s, 6H, tBu), 1,27 (s, 3H, tBu), 2,72 (s, 3H, Me), 3,42-3,49 (m, 1 H), 4,78 (dd, 1H, J = 4,1, J = 11,5), 4,97 (dd, 1H, J = 4,7, J = 11,5), 7,37-7,46 (m, 3H), 7,67 (s, 1 H), 7,76-7,82 (m, 3H).

EM (ionización por electropulverización (ESI)): m/z 330.0 [M+H]⁺

Síntesis del aminoácido Fmoc N ϵ , ϵ dimetil lisina (según Int J. Peptide Res. Ther. (2006), 12, 187-193)



- 35 Se disuelven 203 mg (0,5 mmoles) de hidrocloreto de Fmoc-Lys-OH en 10 mL de etanol y la disolución se pone a 0°C. Se añaden 86 μ L (1,1 mmoles) de formaldehído (disolución al 37%) y el conjunto se mantiene a 0°C durante 15 minutos. A continuación se añaden 95 mg (1,5 mmoles) de NaBH₃CN y se prosigue la reacción durante 15 minutos a 0°C antes de volver a añadir 86 μ L de formaldehído y 95 mg de NaBH₃CN y de dejar que la reacción prosiga durante 4 horas a 0°C. Se añaden 10 mL de una disolución de HCl 1N, el precipitado obtenido se filtra, la disolución se lleva

a continuación a sequedad y el compuesto obtenido se purifica por cromatografía (eluyente: MeOH/H₂O 95/5) para obtener 110 mg del compuesto esperado (con una cantidad muy pequeña de lisina trimetilada).

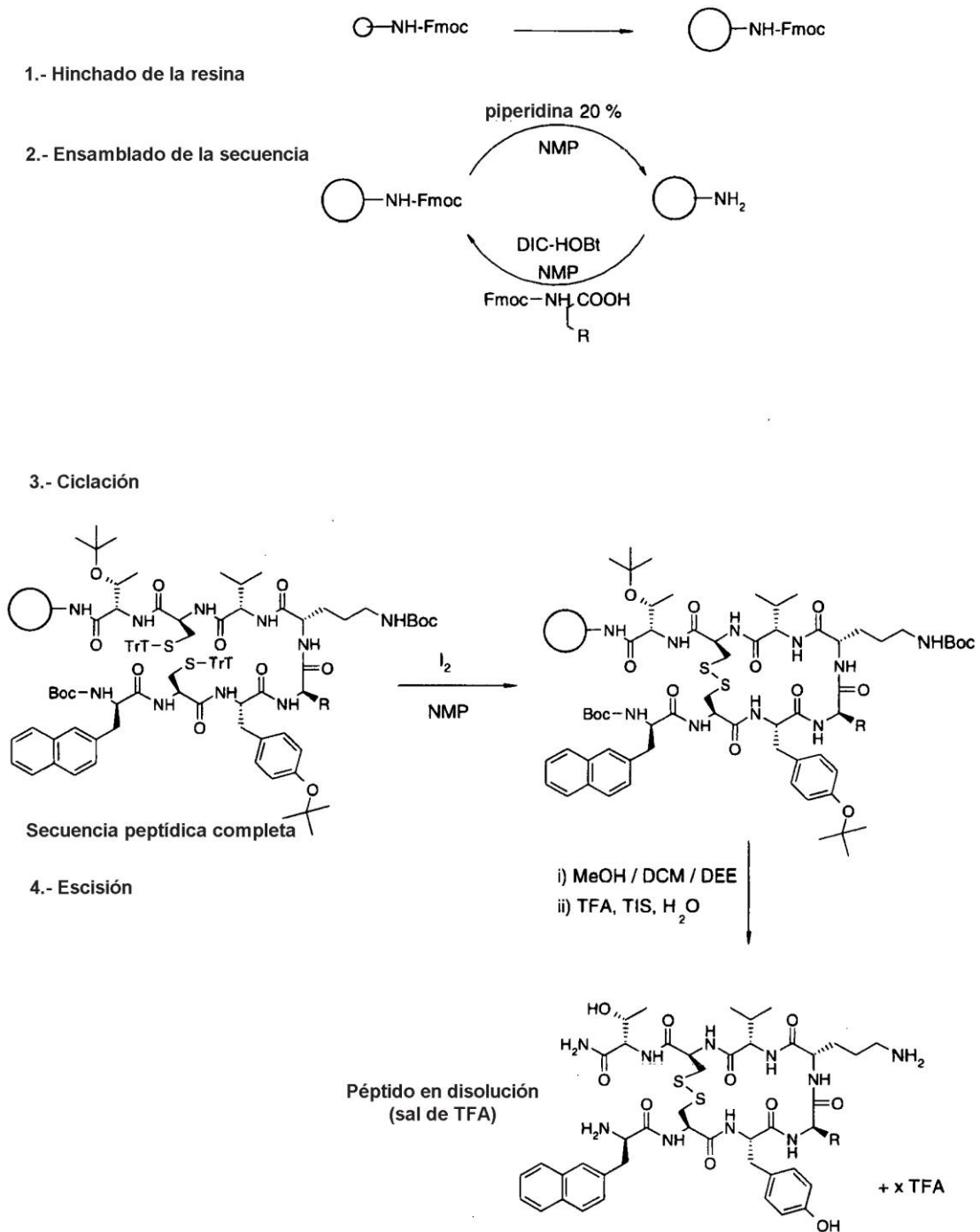
RMN de ¹H (CD₃OD): δ 1,4-1,9 (m, 6H); 2,7 (s, 6H); 2,91 (t, J = 7,7, 2H); 4,02 (dd, J = 5,3, J = 7,1, 1H); 4,19 (t, J = 6,8, 1H); 4,22-4,35 (m, 2H); 7,28- 7,32 (m, 2H); 7,38 (t, J = 7,2, 2H); 7,63-7,72 (m, 2H); 7,79 (d, J = 7,5, 2H).

5 EM (ESI) m/z: 397,0 [M+H]⁺

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/ Humidificación de la resina:

La resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-fluorenilmetoxicarbonil-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-(4-metil)-benzohidrilamina - 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, 2,2 eq) 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 mn, 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 los 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 mUg de resina, seguido de tres lavados con NMP (10 mUg 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 mUg 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, que debe realizarse 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 mUg 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 mUg 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 someterlo 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" puesto que está injertada con cadenas alquílicas C₁₈. La fase móvil está 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 porcentaje 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.

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 iónico

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 1,6N, después tres veces con 10 mL de ácido acético 0,16M. 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-D-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

5 Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-Orn(Boc)-OH, después Fmoc-D-Trp-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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 8,65 min

HRMS (H₂O) m/z = 1082,46102 [M+H]⁺ (calc. 1082,45866)

15 RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 0,3-0,44 (m, 1H); 0,49-0,64 (m, 1H); 0,76 (d, J = 8, 3H); 0,78 (d, J = 7, 3H); 1-1,12 (m, 1H); 1,06 (d, J = 6,5, 3H); 1,45-1,57 (m, 1H); 1,94-2,07 (m, 1H); 2,31 (dd, J = 4, J = 14,7, 1H); 2,36-2,5 (m, 3H); 2,54-2,68 (m, 2H); 2,77 (d, J = 7,5, 2H); 2,82-2,95 (m, 2H); 3,19 (dd, J = 9, J = 13,6, 1H); 3,33 (dd, J = 6, J = 13,6, 1H); 3,74 (dd, J = 4, J = 10,8, 1H); 3,82 (d, J = 9,6, 1H); 4,04-4,14 (m, 2H); 4,17 (d, J = 3,8, 1H); 4,24 (dd, J = 6, J = 8,7, 1H); 4,49 (t, J = 7,5, 1H); 4,61-4,76 (m, 3H); 6,69 (d, J = 8,5, 2H); 6,97 (d, J = 8,5, 2H); 6,97-7,05 (m, 2H); 7,1 (bt, J = 7,5, 1H); 7,29-7,45 (m, 4H); 7,65 (bs, 1H); 7,72-7,81 (m, 3H).

20 *Ejemplo 2: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Nε,ε-dimetil-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-(Me)₂Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)*

25 Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del **agrupamiento** Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-(Me)₂-Lys(Boc)2-OH, después Fmoc-D-Trp-OH, después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-β-(2-naftil)-D-Ala-OH.

30 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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Nε,ε-dirnetil-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 10,48 min

HRMS (H₂O) m/z = 1124,50620 [M+H]⁺ (calc. 1124,50561)

35 RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ -0,03-0,1 (m, 1H); 0,17-0,31 (m, 1H); 0,76 (d, J = 7,2, 3H); 0,78 (d, J = 7, 3H); 0,97-1,18 (m, 3H); 1,07 (d, J = 6,3, 3H); 1,38-1,51 (m, 1H); 1,95-2,07 (m, 1H); 2,25-2,33 (m, 1H); 2,36-2,69 (m, 5H); 2,63 (s, 6H); 2,78 (bd, J = 7,3, 2H); 2,78-2,95 (m, 2H); 3,13 (dd, J = 9,5, J = 12,8, 1H); 3,27 (dd, J = 5,9, J = 13,3, 1H); 3,7 (dd, J = 2,1, J = 9,9, 1H); 3,81 (d, J = 9,6, 1H); 4,05-4,16 (m, 3H); 4,18 (d, J = 3,6, 1H); 4,5 (t, J = 7,5, 1H); 4,64-4,73 (m, 3H); 6,7 (d, J = 8,4, 2H); 6,95-7,05 (m, 4H); 7,1 (t, J = 7,5, 1H); 7,33 (t, J = 8,4, 2H); 7,36-7,45 (m, 3H); 7,63 (bs, 1H); 7,70-7,75 (m, 1H); 7,77 (d, J = 8,6, 1H).

40 *Ejemplo 3: N-Metil-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Nε,ε-dimetil-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (CH₃-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)*

45 Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-Orn(Boc)-OH, después Fmoc-D-Trp-OH, después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Boc-N-Metil-D-(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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto N-Metil-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 8,83 min

50 HRMS (H₂O) m/z = 1110,48991 [M+H]⁺ (calc. 1110,48996)

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): δ -0,05-0,1 (m, 1H); 0,2-0,32 (m, 1H); 0,76 (d, J = 6,4, 3H); 0,78 (d, J = 6,4, 3H); 0,94-1,16 (m, 3H); 1,08 (d, J = 6,4, 3H); 1,35-1,48 (m, 1H); 1,96-2,09 (m, 1H); 2,16 (dd, J = 3,8, J = 14,8, 1H); 2,35 (dd, J = 9,3, J = 14,8, 1H); 2,39-2,64 (m, 4H); 2,52 (s, 3H); 2,69-2,96 (m, 4H); 3,16 (dd, J = 10,2, J = 13,3, 1H); 3,38 (dd, J = 5, J = 13,3, 1H); 3,65 (dd, J = 3,5, J = 11, 1H); 3,78 (d, J = 9,8, 1H); 4,06-4,19 (m, 3H); 4,22 (d, J = 4, 1H); 4,5 (t, J = 7,6, 1H); 4,55-4,75 (m, 3H); 6,68 (d, J = 8,5, 2H); 6,95-7,03 (m, 3H); 7,09 (t, J = 7,2, 1H); 7,29 (dd, J = 1,3, J = 8,4, 1H); 7,33 (d, J = 8,2, 1H); 7,37-7,44 (m, 3H); 7,62 (bs, 1H); 7,68-7,73 (m, 1H); 7,75-7,8 (m, 2H).

Ejemplo 4: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dab⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-Dab(Boc)-OH, después Fmoc-D-Trp-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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Dab⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 8,68 min

HRMS (H_2O) m/z = 1068,44355 [M+H]⁺ (calc. 1068,44301)

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): 0,76 (d, J = 6,7, 3H); 0,77 (d, J = 6,7, 3H); 1,06 (d, J = 6,4, 3H); 1,21-1,36 (m, 1H); 1,37-1,47 (m, 1H); 1,78-1,9 (m, 2H); 1,96-2,08 (m, 1H); 2,34 (dd, J = 3,8, J = 14,8, 1H); 2,46 (dd, J = 9,7, J = 14,8, 1H); 2,54-2,68 (m, 2H); 2,78 (d, J = 7,4, 2H); 2,91 (d, J = 8,3, 2H); 3,16 (dd, J = 9,2, J = 13,5, 1H); 3,29 (dd, J = 5,6, J = 13,5, 1H); 3,82 (d, J = 9,8, 1H); 3,86 (dd, J = 3,2, J = 11, 1H); 4,03-4,13 (m, 2H); 4,13-4,21 (m, 2H); 4,49 (t, J = 7,4, 1H); 4,63-4,78 (m, 3H); 6,69 (d, J = 8,4, 2H); 6,97 (d, J = 8,5, 2H); 6,99-7,06 (m, 2H); 7,11 (t, J = 7,5, 1H); 7,35 (dd, J = 1, J = 8,5, 1H); 7,37 (d, J = 8,2, 1H); 7,38-7,44 (m, 2H); 7,65 (bs, 1H); 7,70-7,82 (m, 3H).

Ejemplo 5: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dap⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-Dap(Boc)-OH, después Fmoc-D-Trp-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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Dap⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 8,65 min

HRMS (H_2O) m/z = 1054,42780 [M+H]⁺ (calc. 1054,42736)

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): 0,76 (d, J = 6,7, 3H); 0,77 (d, J = 6,7, 3H); 1,06 (d, J = 6,4, 3H); 1,21-1,36 (m, 1H); 1,37-1,47 (m, 1H); 1,78-1,9 (m, 2H); 1,96-2,08 (m, 1H); 2,34 (dd, J = 3,8, J = 14,8, 1H); 2,46 (dd, J = 9,7, J = 14,8, 1H); 2,54-2,68 (m, 2H); 2,78 (d, J = 7,4, 2H); 2,91 (d, J = 8,3, 2H); 3,16 (dd, J = 9,2, J = 13,5, 1H); 3,29 (dd, J = 5,6, J = 13,5, 1H); 3,82 (d, J = 9,8, 1H); 3,86 (dd, J = 3,2, J = 11, 1H); 4,03-4,13 (m, 2H); 4,13-4,21 (m, 2H); 4,49 (t, J = 7,4, 1H); 4,63-4,78 (m, 3H); 6,69 (d, J = 8,4, 2H); 6,97 (d, J = 8,5, 2H); 6,99-7,06 (m, 2H); 7,11 (t, J = 7,5, 1H); 7,35 (dd, J = 1, J = 8,5, 1H); 7,37 (d, J = 8,2, 1H); 7,38-7,44 (m, 2H); 7,65 (bs, 1H); 7,70-7,82 (m, 3H).

Ejemplo 6: H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-N-Ac-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys(Ac)⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) 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-Lys(Ac)-OH, después Fmoc-D-Trp-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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-N-Ac-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 10,58 min

HRMS (H_2O) m/z = 1138,4886 [M+H]⁺ (calc. 1138,4854)

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$): δ 0,45-0,59 (m, 1H); 0,62-0,73 (m, 1H); 1,10 (d, J = 6,7, 3H); 1,13 (d, J = 6,7, 3H); 1,3-1,45 (m, 3H); 1,36 (d, J = 6,4, 3H); 1,7-1,82 (m, 1H); 2,07 (s, 3H); 2,35-2,45 (m, 1H); 2,87 (d, J = 6,9, 1H); 3-3,28 (m, 4H); 3,54 (d, J = 7,1, 1H); 4,08 (dd, J = 3,1, J = 10,7, 1H); 4,19 (d, J = 9,4, 1H); 4,37-4,47 (m, 2H); 4,5 (d, J = 3,4, 1H); 4,75-4,8 (m, 2H); 5,25-5,29 (m, 2H); 6,99 (d, J = 8,4, 2H); 7,26-7,39 (m, 5H); 7,63 (d, J = 8,1, 1H); 7,67-7,76 (m, 4H); 8 (s, 1H); 8,07-8,12 (m, 3H).

Ejemplo 7: N-Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-N-Ac-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys(Ac)⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) 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-Lys(Ac)-OH, después Fmoc-D-Trp-OH, después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Ac- 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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto N-Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-N-Ac-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 12,75 min

HRMS (H_2O) m/z = 1202,4800 [M+Na]⁺ (calc. 1202,4779)

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$): δ 0,28-0,40 (m, 1H); 0,41-0,58 (m, 1H); 0,86 (d, J = 6,7, 3H); 0,89 (d, J = 6,7, 3H); 1,13 (d, J = 6,4, 3H); 1,55-1,65 (m, 1H); 1,81 (s, 3H); 1,85 (s, 3H); 2,16-2,22 (m, 1H); 2,73-2,94 (m, 7H); 3-3,07 (m, 1H); 3,29 (dd, J = 5,7, J = 13,8, 1H); 3,89 (dd, J = 3,1, J = 11, 1H); 4 (d, J = 9,3, 1H); 4,13-4,22 (m, 2H); 4,24 (d, J = 3,8, 1H); 4,53 (dd, J = 6,9, J = 8, 1H); 4,77 (dd, J = 5,7, J = 8,9, 1H); 5,22 (dd, J = 4,7, J = 9,6, 1H); 5,29 (dd, J = 7,3, J = 7,9, 1H); 6,69 (d, J = 8,4, 2H); 6,99-7,11 (m, 5H); 7,36 (d, J = 8, 1H); 7,41-7,49 (m, 4H); 7,73-7,82 (m, 4H),

Ejemplo 8: H-D-2-Nal¹-ciclo(HomoCys²-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del agrupamiento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) 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-D-Trp-OH, después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, después Fmoc-L-HomoCys(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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto H-D-2-Nal¹-ciclo(HomoCys²-Tyr³-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 10,27 min

HRMS (H_2O) m/z = 1132,4719 [M+Na]⁺ (calc. 1132,4749)

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): δ 0,29-0,45 (m, 1H); 0,46-0,56 (m, 1H); 0,79 (d, J = 6,7, 3H); 0,82 (d, J = 6,7, 3H); 1,08 (d, J = 6,4, 3H); 1,15-1,63 (m, 5H); 1,92-2,06 (m, 1H); 2,49-2,62 (m, 2H); 2,65-2,91 (m, 5H); 3,08 (dd, J = 11,1, J = 12,8, 2H); 3,21 (s, 1H); 3,37 (dd, J = 5,1, J = 13, 2H); 3,74 (d, J = 9,3, 2H); 3,92 (dd, J = 4,1, J = 9,6, 2H); 4,05-4,21 (m, 6H); 4,25 (d, J = 3,9, 2H); 4,42 (dd, J = 6,5, J = 8,8, 2H); 4,56 (dd, J = 5,3, J = 9,3, 2H); 6,68 (d, J = 8,5, 2H); 6,91-7,12 (m, 5H); 7,29-7,44 (m, 5H); 7,62 (s, 1H); 7,75-7,83 (m, 3H).

Ejemplo 9: N-Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ (Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂)

Se obtiene el péptido abierto según el protocolo descrito anteriormente por la sucesión de acoplamiento, desprotección del **agrupamiento** Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) 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-D-Trp-OH, después Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, después Fmoc-L-Cys(Trt)-OH y finalmente Ac- 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 según el método de operación descrito anteriormente, para conducir al compuesto N-Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂.

HPLC: tr = 10,77 min

HRMS (H_2O) m/z = 1138,4884 [M+H]⁺ (calc. 1138,4854)

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): δ 0,29-0,40 (m, 1H); 0,42-0,58 (m, 1H); 0,81 (t, J = 6,7, 6H); 1,11 (d, J = 6,3, 3H); 1,1-1,23 (m, 2H); 1,44-1,55 (m, 1H); 1,9 (s, 3H); 1,95-2,03 (m, 1H); 2,37-2,45 (m, 2H); 2,47-2,62 (m, 2H); 2,65-2,78 (m, 3H); 2,87-2,99 (m, 2H); 3,07-3,2 (m, 2H); 3,8 (dd, J = 3,5, J = 10,5, 1H); 3,86 (d, J = 9,1, 1H); 4,13-4,22 (m, 3H); 4,47 (t, J = 7,4, 1H); 4,59-4,78 (m, 2H); 6,69 (d, J = 8,4, 2H); 6,94 (d, J = 8,4, 2H); 7,03-7,16 (m, 3H); 7,34-7,46 (m, 5H); 7,63 (s, 1H); 7,75-7,8 (m, 3H).

42. 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 [^{125}I -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 0,5mM y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se vuelve a poner en suspensión en tampón de fosfato (PBS) y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se vuelve a poner en suspensión en tampón Tris 50mM 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 vuelve a poner en suspensión en tampón Tris 50mM 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 [^{125}I -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 proteína/pocillo) se incuban con la [^{125}I -Tyr11]SRIF-14 (0,05 a 0,1 nM) durante 50 a 90 minutos a 37°C (condiciones dependientes del subtipo de receptor) en un medio tampón HEPES 50mM pH 7,4, que comprende 0,2% de albúmina bovina de suero (BSA), MgCl_2 5mM, Trasylol 200 KIU/mL, Bacitracine 0,02 mg/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,02 mg/mL.

La [^{125}I -Tyr11]SRIF-14 enlazada se separa de [^{125}I -Tyr11]SRIF-14 libre por filtración a través de placas de fibra de vidrio GF/C (Unifilter, Perkin Elmer) impregnada previamente con 0,1% de polietilenimina (P.E.I.), usando un Filtermate 96 (Perkin Elmer). Los filtros se lavan con tampón Tris-HCl 50mM, 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

Los ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 2 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 5 μM .

Los ejemplos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 2 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 700 nM.

Los ejemplos 1, 2, 3, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 2 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 6 nM.

Los ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 5 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 5 μM .

Los ejemplos 1, 2, 3, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 5 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 500 nM.

Los ejemplos 3, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 5 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 10 nM.

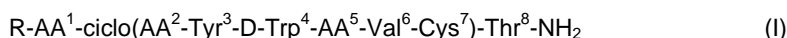
Los ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 3 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 1 μM .

Los ejemplos 2, 3, 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 3 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 200 nM.

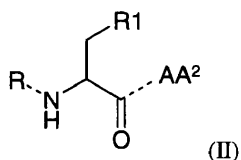
Los ejemplos 8 y 9 tienen una afinidad por el subtipo 3 de receptores de la somatostatina inferior o igual a 100 nM.

REIVINDICACIONES

1.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I):



en la que AA¹ representa un radical de aminoácido unido al radical R y al aminoácido AA² según la fórmula:



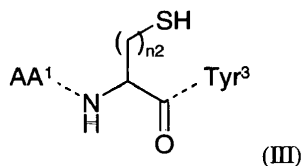
5

en la que:

R1 representa el radical naftilo opcionalmente sustituido con uno o varios radicales alquilo;

R representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo o acetilo;

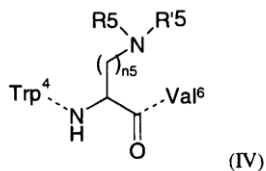
AA² representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos AA¹ y Tyr³ según la fórmula:



10

en la que n2 representa un número entero de 1 a 2;

AA⁵ representa un radical de aminoácido unido a los aminoácidos Trp⁴ y Val⁶ según la fórmula



15

en la que R5 y R'5 representan independientemente un átomo de hidrógeno o un radical alquilo o acetilo, y n5 representa un número entero de 1 a 6;

entendiéndose que:

si AA² representa un radical de aminoácido cisteína, entonces

bien AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina;

bien AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina;

20

bien AA¹ no representa un radical de naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de lisina;

si AA² no representa un radical de cisteína, entonces AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina,

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

o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.

25

2.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que n5 representa un número entero de 1 a 4.

3.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que AA² representa un radical de aminoácido cisteína.

30

4.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que AA² no representa un radical de aminoácido cisteína.

- 5.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ representa un radical de aminoácido lisina.
- 6.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que AA¹ representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina.
- 5 7.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que AA¹ no representa un radical de aminoácido naftilalanina y AA⁵ no representa un radical de aminoácido lisina.
- 8.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 1 ó 2, en la que AA¹ representa el radical de aminoácido elegido entre 2-Nal, Ac-2-Nal y CH₃-2-Nal.
- 10 9.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 1 ó 2, en la que AA² representa el radical de aminoácido elegido entre Cys y Hcy.
- 10.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 1 ó 2, en la que AA⁵ representa el radical de aminoácido elegido entre Lys, Lys(Ac), Orn, (CH₃)₂Lys, Dab y Dap.
11. Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 1 ó 2, elegido entre:
- 15 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys(Ac)⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys(Ac)⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-(Me)₂Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- 20 CH₃-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dab⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Dap⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.
- 12.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 11, elegido entre:
- 25 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Orn⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂;
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-(Me)₂Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂;
 H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂; y
 Ac-D-2-Nal¹-ciclo(Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂
- o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.
- 30 13.- Compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según la reivindicación 12, de fórmula H-D-2-Nal¹-ciclo(Hcy²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable de este compuesto.
- 14.- Medicamento que comprende un compuesto de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 13.
- 15.- Composición terapéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 13, como principio activo en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 16.- Utilización de un compuesto octapeptídico de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 13 para fabricar un medicamento.
- 17.- Utilización según la reivindicación 16, caracterizada porque el medicamento está destinado a tratar una patología elegida entre las enfermedades relacionadas con la hormona del crecimiento.