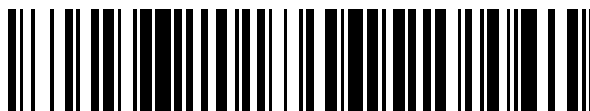


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 430**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2007** **E 07830903 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2081955**

54 Título: **Derivados de metastina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

25.10.2006 JP 2006290536

31.01.2007 JP 2007021387

28.08.2007 JP 2007221911

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

30.06.2015

73 Titular/es:

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)

1-1, DOSHOMACHI 4-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-0045, JP

72 Inventor/es:

ASAMI, TAIJI y
NISHIZAWA, NAOKI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 539 430 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

Derivados de metastina y uso de los mismos

Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de metastina y al uso de los mismos.

5 Antecedentes de la invención

Se conoce la metastina obtenida a partir de ser humano (también denominada péptido KiSS-1) (documento WO00/24890) y la metastina obtenida a partir de ratón o rata (documento WO01/75104). También se conocen preparaciones de liberación sostenida que contienen metastina (documento WO02/85399).

- 10 Según se ha informado, la metastina tiene un efecto supresor de la metástasis del cáncer y es por lo tanto efectiva para prevenir/tratar cánceres (por ejemplo, cáncer pulmonar, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, etc.); la metastina también tiene el efecto de controlar la función pancreática y es efectiva para prevenir/tratar enfermedades pancreáticas (por ejemplo, pancreatitis aguda o crónica, cáncer pancreático, etc.); y además la metastina tiene el efecto de controlar la función placentaria y es efectiva para prevenir/tratar coriocarcinoma, mola hidatídica, mola invasiva, abortos involuntarios, hipoplasia fetal, metabolismo anormal de la glucosa, metabolismo anormal de los lípidos o parto anormal (documentos WO00/24890, WO01/75104 y WO02/85399).

Descripción de la invención

- 20 La presente invención tiene como objeto proporcionar derivados estables de metastina que tienen excelentes actividades biológicas (una actividad supresora de la metástasis del cáncer, una actividad supresora del crecimiento del cáncer, una actividad estimulante de la secreción de hormona gonadotrófica, una actividad estimulante de la secreción de hormonas sexuales, una actividad supresora de la secreción de hormona gonadotrófica, una actividad supresora de la secreción de hormonas sexuales etc.).

- 25 Los presentes inventores han realizado estudios extensivos para resolver las dificultades anteriores y han descubierto como resultado que mediante la sustitución de los aminoácidos constituyentes de la metastina con aminoácidos específicos, se mejora inesperadamente la estabilidad sanguínea, la solubilidad, etc., se reduce la tendencia a la gelificación, se mejora también la farmacocinética y se muestra una excelente actividad supresora de la metástasis del cáncer o una actividad supresora del crecimiento del cáncer. Los presentes inventores también han descubierto que inesperadamente estos derivados de metastina tienen la capacidad de suprimir la secreción de hormona gonadotrófica, suprimir la secreción de hormonas sexuales, etc., que es totalmente diferente de los efectos conocidos hasta la fecha. Tomando como base estos hallazgos, los presentes inventores han continuado realizando investigaciones adicionales y han llevado a cabo la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona las siguientes características, etc.

[1] Un compuesto seleccionado a partir de:

- 35 Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg(Me)Trp-NH₂ (Compuesto n° 903),
Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂ (Compuesto n° 926),
Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂ (Compuesto n° 927), o una sal de los mismos.

[2] El compuesto de acuerdo con [1], el cual es

Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg(Me)Trp-NH₂ o una sal del mismo.

- 40 [3] El compuesto de acuerdo con [1], el cual es

Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂ o una sal del mismo.

[4] El compuesto de acuerdo con [1], el cual es

Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂ o una sal del mismo.

[5] Un medicamento que comprende el compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo.

- 45 La presente invención proporciona adicionalmente las siguientes características, etc.

[6] El compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo para uso en terapia.

[7] El compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo para uso como un agente para suprimir la metástasis del cáncer o para suprimir el crecimiento del cáncer.

[8] El compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo para uso como un agente para prevenir/tratar el cáncer.

5 [9] El compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo para uso como un agente para regular a la baja una hormona gonadotrófica o una hormona sexual.

[10] El compuesto de acuerdo con [1] o una sal del mismo para uso como un agente para prevenir/tratar un cáncer dependiente de hormonas.

10 El derivado de metastina de la presente invención y sus sales tienen una excelente estabilidad sanguínea, además de una excelente acción inhibidora de la metástasis del cáncer o una acción supresora del crecimiento del cáncer y son útiles como agentes para prevenir/tratar cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de mama, etc.). El derivado de metastina de la presente invención y sus sales tienen los efectos de regular funciones del páncreas y son útiles como medicamentos para la prevención/tratamiento de enfermedades pancreáticas (por ejemplo, pancreatitis aguda o crónica, cáncer de páncreas, etc.). El derivado de metastina de la presente invención y sus sales tienen los efectos de regular funciones de la placenta y son útiles como medicamentos para la prevención/tratamiento de coriocarcinoma, mola hidatiforme, mola invasiva, aborto involuntario, hipoplasia fetal, metabolismo anormal de la glucosa, metabolismo anormal de los lípidos o inducción del parto.

20 Además, el derivado de metastina de la presente invención y sus sales tienen los efectos de aumentar el nivel de azúcar, favorecer la secreción de glucagón pancreático y favorecer la formación de orina, y son útiles como agentes para prevenir/tratar la obesidad, hiperlipemia, diabetes mellitus de tipo II, hipoglucemia, hipertensión, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, edema, trastornos urinarios, resistencia a la insulina, diabetes mellitus inestable, atrofia grasa, alergia a la insulina, insulinoma, arteriosclerosis, trastornos trombóticos o lipotoxicidad.

25 Además, el derivado de metastina de la presente invención y sus sales tienen excelentes actividades estimuladoras de la secreción de hormona gonadotrófica, estimulación de la secreción de hormona sexual, inducción de la ovulación o estimulación de la ovulación, y son útiles como agentes ligeramente tóxicos y estables, por ejemplo, agentes para mejorar la función gonadal, agentes para prevenir/tratar el cáncer dependiente de hormonas (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc.), la infertilidad, endometriosis, pubertad precoz, mioma del útero, etc., agentes para inducir o estimular la ovulación, agentes secretagogos de hormona gonadotrófica, anticonceptivos, agentes secretagogos de hormonas sexuales, o similares.

35 El derivado de metastina de la presente invención y sus sales son útiles como agentes para suprimir la secreción de hormona gonadotrófica o suprimir la secreción de hormonas sexuales; agentes para regular a la baja una hormona gonadotrófica o una hormona sexual; agentes para regular a la baja la proteína OT7T175 humana (receptor de metastina) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9; agentes para prevenir/tratar cánceres dependientes de hormonas (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc.; particularmente, cáncer de próstata sensible a hormonas, cáncer de mama sensible a hormonas, etc.); agentes para prevenir/tratar la endometriosis; agentes para inhibir la maduración folicular ovárica; agentes para interrumpir el ciclo menstrual; agentes para tratar un mioma del útero; agentes para tratar la pubertad precoz; anticonceptivos, etc.

40 Además, el derivado de metastina de la presente invención y sus sales son útiles como agentes para potenciar la inmunidad (por ejemplo, agentes profilácticos para la infección después de un trasplante de médula ósea, agentes para potenciar la inmunidad prevista para un cáncer, etc.); inmunoestimuladores (por ejemplo, regeneración del timo, crecimiento de nuevo del timo, mejora del desarrollo de linfocitos T, etc.); agentes para prevenir/tratar la atrofia muscular bulboespinal; agentes para la protección del ovario; agentes para prevenir/tratar la hipertrofia benigna de la próstata (BPH); agentes para prevenir/tratar el trastorno de la identidad sexual; o agentes para la fertilización *in vitro* (FIV). Además, también son útiles como agentes para la prevención/tratamiento de la infertilidad, hipogonadismo, oligospermia, azoospermia, aspermia, astenospermia o necropermia. Además, son útiles para enfermedades dependientes de hormonas (por ejemplo, cáncer dependiente de hormonas sexuales tal como cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de mama, tumor hipofisario, etc.), aumento de tamaño de la glándula próstata, endometriosis, fibroma uterino, pubertad precoz, dismenorrea, amenorrea, síndrome menstrual, síndrome de ovario multilocular, recaída postoperatoria de los cánceres mencionados anteriormente, metástasis de los cánceres mencionados anteriormente, hipopituitarismo, enanismo (el caso en el que la secreción de hormona de crecimiento se ha visto alterada con hiposecreción de la hormona pituitaria, etc.), trastorno menopáusico, quejas indefinidas, trastornos dependientes de hormonas sexuales como trastornos óseos por el metabolismo de fósforo calcio. También es aplicable a la anticoncepción (o infertilidad cuando se utilizan efectos de rebote después de finalizar con el fármaco), etc.

55 Por otra parte, la metastina por sí misma o el ADN que codifica metastina, etc., también son útiles como agentes para suprimir la secreción de hormona gonadotrófica o la secreción de hormona sexual; agentes que regulan a la baja la hormona gonadotropina o la supresión de hormona sexual; agentes que regulan a la baja la proteína OT7T175 humana (receptor de metastina) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID

NO: 9; agentes para prevenir/tratar cánceres dependientes de hormonas (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc.; particularmente, cáncer de próstata sensible a hormonas, cáncer de mama sensible a hormonas, etc.); agentes para prevenir/tratar la endometriosis; agentes para inhibir la maduración folicular ovárica; agentes para interrumpir el ciclo menstrual; agentes para tratar un mioma del útero; agentes para tratar la pubertad precoz; anti-conceptivos, etc.

En los derivados de metastina de la presente invención, se prefieren los siguientes compuestos.

MS10: Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

(Compuesto n° 903)

10 des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Alb⁴,Thr⁵,Cha⁶,Gly⁷Ψ((E)CH=CH)Leu⁸,Arg(Me)⁹,Trp¹⁰]MS10,

Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

(Compuesto n° 926)

des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Thr⁵,Cha⁶,Gly⁷Ψ((E)CH=CH)Leu⁸,Trp¹⁰-MS10,

Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂

15 (Compuesto n° 927)

des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Alb⁴,Thr⁵,Cha⁶,Gly⁷Ψ((E)CH=CH)Leu⁸,Trp¹⁰]MS10

Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂

Las fórmulas estructurales de estos compuestos se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Número de compuesto	Estructura
903	
926	
927	

Los derivados de metastina de la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos públicamente para la síntesis de péptidos. Como métodos para la síntesis de péptidos, se puede utilizar, por ejemplo, la síntesis en fase sólida o la síntesis en fase líquida. Es decir, que el péptido o los aminoácidos parciales que pueden constituir el péptido de la presente invención se condensan de forma repetida con la parte restante para proporcionar el producto que tiene una secuencia deseada. Cuando el producto tiene grupos protectores, estos grupos se eliminan para proporcionar el péptido deseado. Métodos conocidos públicamente para la condensación y la eliminación de los grupos protectores incluyen los descritos, p. ej., en (1) a (5) a continuación.

(1) M. Bodanszky & M.A. Ondetti: *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, Nueva York (1966)

(2) Schroeder & Luebke: *The Peptide*, Academic Press, Nueva York (1965)

(3) Nobuo Izumiya et al: *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), publicado por Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushi tsu no Kagaku (Chemistry de Proteins) IV, 205 (1977)

(5) Haruaki Yajima, compilador: *Zoku Iyakuhiin no Kaihatsu* (A sequel to Development of Pharmaceuticals), vol. 14, Peptide Synthesis, publicado por Hirokawa Shoten.

Una vez concluida la reacción, el producto se puede purificar y aislar mediante una combinación de métodos de purificación convencionales tales como extracción con disolventes, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida y recristalización, para proporcionar el péptido de la presente invención. Cuando el péptido obtenido mediante los métodos anteriores está en forma libre, puede convertirse en una sal apropiada mediante un método conocido públicamente; en cambio cuando el péptido se obtiene en una forma salina, se puede convertir en su forma libre mediante métodos conocidos públicamente.

Para la condensación de los péptidos o aminoácidos protegidos, se puede utilizar una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, pero en particular se prefieren sales de trisfosfonio, sales de tetrametiluronio, carbodiimidas, etc. Ejemplos de sales de trisfosfonio incluyen hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PiBOP), hexafluorofosfato de bromotris(pirrolidino)fosfonio (PiBroP) y hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PiAOP), ejemplos de sales de tetrametiluronio incluyen 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-hexafluorofosfato (HBTU), 2-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-hexafluorofosfato (HATU), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU) y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU); ejemplos de carbodiimidas incluyen DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI.HCl); etc. Para la condensación utilizando estos reactivos, se prefiere la adición de inhibidores de la racemización (por ejemplo, HONB, HOBT, HOAt, HOOBt, etc.). Los disolventes utilizados en la condensación pueden seleccionarse de forma apropiada a partir de disolventes que se sabe que se pueden utilizar para la condensación. Por ejemplo, se utilizan amidas de ácidos tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona anhídrida o hidratada, etc., hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, etc., alcoholes tales como trifluoroetanol, fenol, etc., sulfóxidos tales como dimetil sulfóxido, etc., aminas terciarias tales como piridina, etc., éteres tales como dioxano, tetrahidrofurano, etc., nitrilos tales como acetonitrilo, propionitrilo, etc., ésteres tales como acetato de metilo, acetato de etilo, etc., o mezclas apropiadas de los mismos, etc. La temperatura de la reacción se selecciona de forma apropiada a partir del intervalo conocido por ser aplicable a las reacciones de unión de péptidos y comúnmente se selecciona de forma apropiada a partir del intervalo de aproximadamente -20°C a 50°C. En general, los derivados de aminoácido activados se utilizan generalmente con un exceso de 1,5 a 6 veces. En el caso de síntesis en fase sólida, la condensación se examina utilizando la reacción de ninhidrina; cuando la condensación es insuficiente, se puede completar mediante la repetición de la reacción de condensación sin eliminación de los grupos protectores. Cuando la condensación es aún insuficiente, incluso después de repetir la reacción, los aminoácidos sin reaccionar se acilan con anhídrido acético o acetilimidazol para anular cualquier efecto adverso sobre la reacción posterior.

Ejemplos de grupos protectores utilizados para proteger grupos amino en los aminoácidos de partida, incluyen Z, Boc, terc-pentiloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo, 4-metoxibenciloxycarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxycarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo, Fmoc, tritilo, etc. Ejemplos de grupos protectores para un grupo carboxilo incluyen, además del grupo alquilo C₁₋₆, un grupo cicloalquilo C₃₋₈ y un grupo aralquilo C₇₋₁₄ para R descrita con anterioridad, alilo, 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, grupo fenacilo, benciloxycarbonilhidrazida, terc-butoxycarbonilhidrazida, tritilhidrazida, etc.

El grupo hidroxilo de serina y treonina puede estar protegido, por ejemplo, mediante esterificación o eterificación. Ejemplos de grupos apropiados para esta esterificación incluyen un grupo obtenido a partir de ácido orgánico, tal como un grupo alcanilo C₂₋₄ inferior, tal como un grupo acetilo, un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo, etc. Ejemplos de un grupo apropiado para la eterificación incluyen un grupo bencilo, un grupo tetrahidropiraniilo, un grupo terc-butilo, un grupo tritilo (Trt), etc.

Ejemplos de grupos para proteger el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina incluyen Bzl, 2,6-diclorobencilo (Cl₂-Bzl),

2-nitrobencilo, Br-Z, terc-butilo, etc.

Ejemplos de grupos utilizados para proteger el resto imidazol de la histidina incluyen Tos, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzosulfonilo (Mtr), DNP, Bom, Bum, Boc, Trt, Fmoc, etc. Ejemplos de grupos protectores para el grupo guanidino en la arginina incluyen Tos, Z, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzosulfonilo (Mtr), p-metoxibenzosulfonilo (MBS), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), Boc, Z, NO₂, etc. Ejemplos de grupos protectores para el grupo amino de la cadena lateral incluyen Z, Cl-Z, trifluoroacetilo, Boc, Fmoc, Trt, Mtr, 4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilidenilo (Dde), etc.

Ejemplos de grupos protectores para indolilo de triptófano incluyen formilo (For), Z, Boc, Mts, Mtr, etc.

Ejemplos de grupos protectores para asparagina y glutamina incluyen Trt, xantilo (Xan), 4,4'-dimetoxibenzhidrido (Mbh), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob), etc.

Ejemplos de grupos carboxilo activados en el material de partida incluyen los correspondientes anhídridos de ácido, azidas, ésteres activados [ésteres con alcoholes (por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccimida, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o 1-hidroxiz-7-azabenzotriazol (HOAt)], etc. Ejemplos de formas activadas de los grupos amino en el material de partida, incluyen las fosforamidas correspondientes.

Para eliminar (escindir) los grupos protectores, se utiliza una reducción catalítica bajo flujo de gas hidrógeno, en presencia de un catalizador tal como Pd-negro o Pd-carbono; un tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhídrido, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, bromuro de trimetilsilano (TMSBr), trifluorometanosulfonato de trimetilsililo, ácido tetrafluorobórico, tris(trifluoro)boro, tribromuro de boro o una solución combinada de los mismos, un tratamiento base con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, etc., y una reducción con sodio en amoniaco líquido. La eliminación de los grupos protectores mediante el tratamiento con ácido descrito con anterioridad en general se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente -20°C a 40°C. En el tratamiento con ácido, es eficaz añadir un agente secuestrante de cationes tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, etc., dimetilsulfuro, 1,4-butanoditiol, 1,2-etanoditiol, etc. Además, el grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado como grupo protector para el imidazol de histidina, se elimina mediante un tratamiento con tiofenol. El grupo formilo utilizado como grupo protector del indol de triptófano se elimina mediante el tratamiento con ácido mencionado con anterioridad, en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol, etc., así como también mediante un tratamiento con un álcali tal como una solución diluida de hidróxido de sodio, amoniaco diluido, etc.

La protección de los grupos funcionales que no deben estar implicados en la reacción de los materiales de partida, grupos protectores, eliminación de los grupos protectores y activación de grupos funcionales involucrados en la reacción, se puede seleccionar de forma apropiada a partir de grupos y medios conocidos públicamente.

Los métodos para obtener la amida del péptido incluyen, por ejemplo, síntesis en fase sólida utilizando resinas para la formación de la amida del péptido. En otro método para obtener las amidas del péptido, por ejemplo, se protege en primer lugar el grupo α-carboxilo del aminoácido carboxi terminal mediante amidación; luego se extiende la cadena peptídica desde el lado del grupo amino hasta una longitud deseada. A continuación, se prepara un péptido en donde únicamente se ha eliminado del péptido el grupo protector del grupo α-amino N-terminal en la cadena del péptido y un péptido (o un aminoácido) en donde únicamente se ha eliminado el grupo protector del grupo carboxilo C-terminal. Ambos péptidos se condensan en una mezcla de los disolventes descritos con anterioridad. Los detalles de la reacción de condensación son los mismos que los descritos con anterioridad. Después de la purificación del péptido protegido, obtenido mediante condensación, se eliminan todos los grupos protectores mediante el método descrito con anterioridad para proporcionar el péptido crudo deseado. Este péptido crudo se purifica mediante diversos métodos de purificación conocidos. La liofilización de la fracción principal proporciona la amida del péptido deseado.

Cuando el derivado de metastina de la presente invención está presente en forma de un isómero configuracional, un diastereómero, un confórmero o similares, si se desea, cada uno se puede aislar mediante los medios de separación y purificación descritos con anterioridad. Además, cuando el compuesto de la presente invención es racémico, se puede separar en un isómero S y un isómero R mediante los medios de resolución óptica convencionales.

Cuando existen isómeros estéricos en el derivado de metastina de la presente invención, la presente invención incluye ambos de estos isómeros de forma individual y los isómeros presentes como una mezcla de los mismos.

Además, el derivado de metastina de la presente invención también puede estar hidratado o no hidratado. El derivado de metastina de la presente invención también se puede marcar con un isótopo (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S), etc.

A lo largo de la memoria descriptiva, los péptidos se representan de acuerdo con el modo convencional de describir péptidos, es decir, el extremo N-terminal (amino terminal) en el lado izquierdo y el extremo C-terminal (carboxilo terminal) en el lado derecho. En los péptidos, el extremo C-terminal se presenta en general en forma de una amida (-CONH₂), un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (-COO⁻), una alquilamida (-CONHR) o un éster (-COOR), y se prefiere particularmente la forma de amida (-CONH₂). Ejemplos de R en el éster o la alquilamida incluyen un grupo alquilo C₁₋₆ tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc.; un grupo cicloalquilo C₃₋₈ tal como ciclopentilo,

ciclohexilo, etc.; un grupo arilo C₆₋₁₂ tal como fenilo, α -naftilo, etc.; un grupo aralquilo C₇₋₁₄ tal como un grupo fenilalquilo C₁₋₂, por ejemplo, bencilo, fenetilo, etc., o un grupo α -naftilalquilo C₁₋₂ tal como α -naftilmetilo, etc.; un grupo pivaloiloximetilo, los cuales se utilizan ampliamente como éster para uso oral, y similares.

Ejemplos de sales del derivado de metastina de la presente invención incluyen una sal de metal, una sal de amonio, una sal con una base orgánica, una sal con ácido inorgánico, una sal con ácido orgánico, una sal con aminoácido básico o ácido, y similares. Los ejemplos preferidos de sales de metales incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio, etc.; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio, sales de bario, etc.; sales de aluminio; y similares. Los ejemplos preferidos de sales con bases orgánicas incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, dicitohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, etc. Ejemplos preferidos de sales con ácidos inorgánicos incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc. Ejemplos preferidos de sales con ácidos orgánicos incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido benzosulfónico, ácido p-toluensulfónico, etc. Ejemplos preferidos de sales con aminoácidos básicos incluyen sales con arginina, lisina, ornitina, etc., y ejemplos preferidos de sales con aminoácidos ácidos incluyen sales con ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

Entre estas sales, se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, cuando el compuesto tiene un grupo funcional ácido, se prefieren sales inorgánicas tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio, etc.), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio, sales de magnesio, sales de bario, etc.), sales de amonio, y similares. Cuando el compuesto tiene un grupo funcional básico, se prefieren sales con ácidos inorgánicos con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc., y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, etc.

El compuesto de la presente invención también tiene los efectos de regular las funciones del páncreas y es útil como agente terapéutico/preventivo para diversas enfermedades pancreáticas (por ejemplo, pancreatitis aguda o crónica, cáncer pancreático, etc.).

Además, el compuesto de la presente invención también tiene los efectos de incrementar el nivel de azúcar, promover la secreción de glucagón pancreático y promover la formación de orina, y es útil como agente hiperglucémico, agente secretagogo de glucagón pancreático o un agente para promover la formación de orina, p. ej., como medicamentos que incluyen agentes para evitar o tratar la obesidad, hiperlipemia, diabetes mellitus de tipo II, hipoglucemia, hipertensión, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, edema, alteraciones urinarias, resistencia a la insulina, diabetes mellitus inestable, atrofia adiposa, alergia a la insulina, insulinoma, arteriosclerosis, trastornos trombóticos o lipotoxicidad.

Además, el compuesto de la presente invención también posee efectos para estimular la secreción de hormona gonadotrófica (por ejemplo, FSH, LH, etc.), estimular la secreción de hormonas sexuales [por ejemplo, andrógenos (por ejemplo, testosterona, androstendiona, etc.), estrógenos (por ejemplo, estradiol, estrona, etc.), progesteronas, etc.], mejorar la función gonadal e inducir o estimular la ovulación, así como también un efecto sobre la maduración sexual, etc., y por lo tanto, se puede utilizar como un agente para mejorar la función gonadal, un agente para inducir o estimular la ovulación, un agente secretagogo de hormona gonadotrófica o un agente secretagogo de hormona sexual, o un agente para prevenir/tratar cánceres dependientes de hormonas [por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc.], la infertilidad [por ejemplo, menstruación irregular, dismenorrea, amenorrea, amenorrea inducida por la pérdida de peso, amenorrea secundaria, anovulación, hipoovarianismo, hipogonadismo, fallo espermatogénico, hipogonadismo (por ejemplo, impotencia, etc.), atrofia genital, atrofia testicular, trastorno de la función testicular, azoospermia, hipoandrogenemia, etc.], endometriosis, pubertad precoz, mioma del útero, etc.

El compuesto de la presente invención es también útil como:

un agente para prevenir/tratar la hiperlipemia, diabetes mellitus de tipo II, hipertensión, neuropatía diabética, nefropatía diabética o retinopatía diabética; un agente anti ansiedad; un agente antiestrés; un agente antiinsomnio; un agente antimaniaco-depresivo; un agente para prevenir/tratar la hipertensión (p. ej., hipertensión esencial, hipertensión renal, hipertensión sensible a las sales, etc.), angina de pecho (p. ej., angina estable, angina inestable, etc.), infarto de miocardio, trastornos cerebrovasculares (p. ej., trastorno cerebrovascular asintomático, ataque isquémico transitorio, apoplejía, demencia cerebrovascular, encefalopatía por hipertensión, infarto cerebral, etc.), insuficiencia venosa, alteraciones circulatorias periféricas obliterantes, enfermedad de Raynaud, arteriosclerosis que incluye aterosclerosis (p. ej., aneurisma, arteriosclerosis coronaria, arteriosclerosis cerebral, arteriosclerosis periférica, etc.), engrosamiento u oclusión vascular y alteraciones de los órganos después de una intervención (p. ej., intervención coronaria percutánea, colocación de endoprótesis, terapia trombolítica coronaria, etc.), hipertensión portal, trastornos respiratorios (p. ej., asma, hipertensión pulmonar, etc.); un agente para prevenir/tratar una tolerancia a la glucosa alterada (IGT); un secretagogo de insulina, un inhibidor de la transición de IGT a diabetes; un agente para prevenir/tratar complicaciones diabéticas [p. ej., neuropatía, nefropatía, retinopatía, cataratas, macroangiopatía, osteopenia, coma diabético hiperosmolar, enfermedades infecciosas (p. ej., infección respiratoria, infección del tracto urinario, infección del tracto digestivo, infección del tejido blando de la piel, infección de la parte inferior de la pierna),

gangrena diabética, xerostomía, hipacusis, trastorno cerebrovascular, alteración circulatoria periférica], osteoporosis, caquexia (p. ej., caquexia cancerosa, caquexia tuberculosa, caquexia diabética, caquexia por enfermedad sanguínea, caquexia por enfermedad endocrina, caquexia por enfermedad infecciosa o caquexia debida al síndrome de inmunodeficiencia adquirido), hígado graso, síndrome de ovario polístico, enfermedades renales (p. ej., nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomerulosclerosis, síndrome nefrótico, nefroesclerosis por hipertensión, estadio final de enfermedad renal), distrofia muscular, infarto cardíaco, angina de pecho, trastornos cerebrovasculares (p. ej., infarto cerebral, apoplejía), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome X, síndrome metabólico, hiperinsulinemia, trastornos sensoriales inducidos por hiperinsulinemia, tumores (p. ej., leucemia, cáncer de piel), síndrome de intestino irritable, diarrea aguda o crónica, enfermedades inflamatorias (p. ej., espondilitis deformante, artritis deformante, lumbago, gota, inflamación posoperativa o postraumática, inflamación, neuralgia, faringolaringitis, cistitis, hepatitis (incluyendo esteatohepatitis no alcohólica), neumonía, enteritis, trastorno inflamatorio intestinal (incluyendo enfermedades inflamatorias del intestino), colitis ulcerativa, lesión de la mucosa gástrica (incluyendo lesión de la mucosa gástrica inducida por aspirina)), lesiones de la mucosa del intestino delgado, malabsorción, trastorno de la función testicular, síndrome de obesidad visceral, etc.;

Los compuestos descritos en el documento WO2004/063221, los compuestos descritos en el documento WO2006/001499 y los compuestos descritos en el documento WO2007/072997, o sales de los mismos también son útiles para prevenir/tratar enfermedades reumáticas (p. ej., artritis reumatoide, osteoartritis, gota, etc.) o similares.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en combinación con fármacos; p. ej., agentes quimioterapéuticos para tratar cáncer, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterapéuticos, fármacos para inhibir las acciones de factores de crecimiento celular y sus receptores, etc. (de aquí en adelante simplemente denominados agentes concomitantes). Ejemplos de "agentes quimioterapéuticos" incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos anticancerígenos, agentes anticancerígenos derivados de plantas, etc. Específicamente se pueden utilizar los fármacos descritos más adelante.

Además, el compuesto de la presente invención tiene una estabilidad sanguínea, una solubilidad y estabilidad en solución excelentes, en comparación con la metastina natural, tal como metastina 54 (1-54) o la metastina 10 (45-54).

El derivado de metastina de la presente invención o sus sales o profármacos, la metastina por sí misma o el ADN que codifica la metastina, etc., es útil como agente para la supresión de la secreción de hormonas gonadotróficas (p. ej., FSH, LH) o de hormonas sexuales [p. ej., andrógenos (p. ej., testosterona, androstenediona), estrógeno (p. ej., estradiol, estrona), progesterona]; etc.; en particular, es útil para suprimir la secreción de hormonas gonadotróficas o de hormonas sexuales mediante la regulación a la baja de las hormonas gonadotróficas o las hormonas sexuales (en donde la regulación a la baja de las hormonas gonadotróficas o las hormonas sexuales puede ser mediante pérdida de pulso de LHRH o agotamiento de LHRH) o regulación a la baja de la proteína OT7T175 humana (receptor de metastina) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9; particularmente útil como agente para evitar o tratar cánceres dependientes de hormonas (p. ej., cáncer de próstata, cáncer de mama, etc.; especialmente un cáncer de próstata, cáncer de próstata sensible a hormonas, etc.); un agente para evitar o tratar la endometriosis; un agente para inhibir la maduración folicular de los ovarios; un agente que interrumpe el ciclo menstrual; un agente para tratar un mioma del útero; un agente para tratar la pubertad temprana; o como anticonceptivo, etc. Cuando el derivado de metastina de la presente invención o sus sales o profármacos, la metastina por sí misma o el ADN que codifica la metastina, etc., tiene una actividad agonista normal, una dosis eficaz del derivado de metastina suficiente para suprimir la secreción de hormona gonadotrófica u hormona sexual se administra en el sitio o el tejido en el que se van a ejercer los efectos terapéuticos, de modo que el derivado de metastina está presente en una dosis superior a la requerida (es decir, el derivado de metastina se administra en exceso en relación con la dosis eficaz normal con la que el derivado de metastina ejerce los efectos de supresión de metástasis del cáncer, supresión del crecimiento del cáncer, etc.; o el efecto de promocionar la secreción de hormona gonadotrófica, el efecto de promocionar la secreción de hormona sexual, etc.) para mostrar los efectos de supresión de la secreción de hormona gonadotrófica o de la secreción de hormona sexual. Los ejemplos específicos incluyen la administración sostenida o continua de la dosis efectiva normal (que incluyen una técnica de administración para liberar en forma gradual los ingredientes farmacéuticos mediante administración de bolo); y similares. Además cuando el derivado de metastina de la presente invención o su sal o el profármaco del mismo, etc. tiene una actividad antagonista suficiente mayor que la requerida (una actividad superagonista), es posible conservar las actividades más allá de las mostradas mediante la dosis necesaria en el sitio o el tejido en el cual se va a mostrar el efecto terapéutico. Por lo tanto, es suficiente, incluso mediante la administración de una dosis efectiva normal, para suprimir la secreción de hormona gonadotrófica o de hormona sexual, a través de la cual se muestra el efecto de supresión de la secreción de hormonas gonadotróficas o de la secreción de hormonas sexuales.

En otras palabras, se administra una dosis efectiva del derivado de metastina de la presente invención o su sal o profármaco, metastina por sí misma o ADN que codifica la metastina, etc. suficiente para suprimir la secreción de hormona gonadotrófica u hormona sexual de modo que el derivado de metastina está presente en una dosis mayor que la requerida en el sitio o el tejido en el que se van a ejercer los efectos terapéuticos, o sus actividades se pueden conservar más que lo requerido, lo que permite mostrar los efectos de supresión de la secreción de hormona gonadotrófica o la secreción de hormonas sexuales.

El medicamento que comprende el compuesto de la presente invención es de baja toxicidad. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención puede administrarse de forma segura directamente como tal o como una mezcla con vehículos farmacéuticamente aceptables, por vía oral o parenteral (por ejemplo, tópica, rectal, intravenosa, etc.), en forma de preparaciones farmacéuticas tales como comprimidos (que incluyen grageas y comprimidos recubiertos), formas de dosificación en polvo, gránulos, cápsulas (que incluyen cápsulas blandas), formas de dosificación líquidas, inyecciones, supositorios, formas de dosificación de liberación sostenida, etc., de acuerdo con medios conocidos públicamente, empleados generalmente en el proceso de producción de preparaciones farmacéuticas.

El compuesto de la presente invención está contenido en la preparación farmacéutica de la presente invención en aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100% en peso, tomando como base el peso total de la preparación.

Una dosis del compuesto de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto al que se va a administrar, del órgano diana, de las condiciones, de la vía de administración, etc., y en la administración oral, el compuesto se administra en general al paciente (de 60 kg de peso corporal) con cáncer en una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg, con preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg y con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg. En la administración parenteral, una dosis única del compuesto puede variar dependiendo del sujeto al que se va a administrar, del órgano diana, de las condiciones, de la vía de administración, etc., y en la forma de una forma de dosificación inyectable, es ventajoso la administración del compuesto al paciente (de 60 kg de peso corporal) con cáncer generalmente en una dosis diaria de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg y con mayor preferencia de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg. Para otras especies animales, se puede administrar la dosis correspondiente a 60 kg de peso.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables, que se pueden utilizar en la fabricación de la preparación farmacéutica de la presente invención, incluyen varias sustancias vehículo, orgánicas o inorgánicas, utilizadas normalmente como materiales para preparaciones farmacéuticas. Estas sustancias incluyen, por ejemplo, un excipiente, un lubricante, un aglutinante y un agente disgregante en una forma de dosificación sólida, y un disolvente, un auxiliar de disolución, un agente de suspensión, un agente de isotonicidad, un tampón, un agente suavizante, etc., en una forma de dosificación líquida. Además, en caso de ser necesario, aditivos convencionales tales como un agente conservante, un antioxidante, un colorante, un edulcorante, un absorbente, un humectante, etc. se pueden utilizar de forma adecuada en cantidades apropiadas. Ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, almidón, almidón de maíz, celulosa cristalina, ácido silícico anhidro ligero, etc. Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, sílice coloidal, etc.

Ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa cristalina, sacarosa, D-manitol, dextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etc.

Ejemplos de agentes disgregantes incluyen almidón, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetil almidón sódico, L-hidroxipropilcelulosa, etc.

Ejemplos de disolventes incluyen agua para inyecciones, alcohol, propilenglicol, Macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva, etc.

Ejemplos de auxiliares de disolución incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, citrato de sodio, etc.

Ejemplos de agentes de suspensión incluyen tensioactivos tales como estearil trietanolamina, laurilsulfato de sodio, aminopropionato de laurilo, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, monoestearato de glicerina, etc.; polímeros hidrofílicos tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc.

Ejemplos de agentes isotonizantes incluyen glucosa, D-sorbitol, cloruro de sodio, glicerina, D-manitol, etc.

Ejemplos de tampones incluyen soluciones tamponadoras de un fosfato, acetato, carbonato, citrato, etc.

Ejemplos de agentes suavizantes incluyen alcohol bencílico, etc.

Ejemplos de conservantes incluyen p-hidroxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido dehidroacético, ácido sórbico, etc.

Ejemplos de antioxidantes incluyen un sulfito, ácido ascórbico, α -tocoferol, etc.

Además, el compuesto de la presente invención se puede utilizar en combinación con fármacos diferentes del compuesto de la presente invención.

Ejemplos de los fármacos que se pueden utilizar en combinación con el compuesto de la presente invención (de aquí en adelante denominados simplemente fármacos concomitantes), incluyen agentes quimioterapéuticos para tratar cáncer, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterapéuticos, fármacos para inhibir las acciones de factores de crecimiento celular y sus receptores, etc. (de aquí en adelante denominados simplemente agentes con-

comitantes).

Ejemplos de "agentes quimioterapéuticos" incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos anticancerígenos, agentes anticancerígenos derivados de plantas, etc.

- 5 Ejemplos de "agentes alquilantes" incluyen mostaza de nitrógeno, clorhidrato de nitrógeno mostaza-N-óxido, cloram-butil, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, carbocuna, tosilato de improsulfán, busulfán, clorhidrato de nimustina, mitobronitol, melfalán, dacarbazina, ranimustina, fosfato de estramustina de sodio, trietilenmelamina, carmustina, lomustina, estreptozocina, pipobromán, etoglucida, carboplatina, cisplatina, miboplatina, nedaplatina, oxaliplatina, altretamina, ambamustina, clorhidrato de dibrospidio, fotemustina, prednimustina, pumitepa, ribomustina, temozolo-mida, treosulfán, trofosfamida, estimalamer zinostatina, carbocuna, adozelesina, cistemustina, bicelesina, etc.
- 10 Ejemplos de "antimetabolitos" incluyen mercaptopurina, 6-mercaptopurina ribosida, tioinosina, metotrexato, enocita-bina, citarabina, ocfosfato de citarabina, clorhidrato de ancitabina, fármacos 5-FU (por ejemplo, fluorouracilo, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, galocitabina, emitefur, etc.), aminopterina, leucovorina de calcio, tabloide, butocina, folinato de calcio, levofolínato de calcio, cladribina, emitefur, fludarabina, gemcitabina, hidroxycarbamida, pentostati-na, piritrexima, idoxuridina, mitoguazona, tiazofrina, ambamustina, etc.
- 15 Ejemplos de "antibióticos anticancerígenos" incluyen actinomicina D, actinomicina C, mitomicina C, cromomicina A3, clorhidrato de bleomicina, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de aclarrubicina, clorhidrato de pirarrubicina, clorhidrato de epirubicina, neocarzinostatina, mitramicina, sarcomicina, carcinofilina, mitotano, clorhidrato de zorrubicina, clorhidrato de mitoxantrona, clorhidrato de idarrubicina, etc.
- 20 Ejemplos de "agentes anticancerígenos derivados de plantas" incluyen etoposida, fosfato de etoposida, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, teniposida, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, etc.
- Ejemplos de "agentes terapéuticos hormonales" incluyen fosfestrol, dietilstilbestrol, clorotrianiseno, acetato de me-droxiprogesterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, acetato de ciproterona, danazol, alilestrenol, gestriona, mepartricina, raloxifeno, ormeloxifeno, levormeloxifeno, antiestrógenos (por ejemplo, citrato de tamoxi-feno, citrato de toremifeno, etc.), formas de dosificación en píldoras, mepitiostano, testrolactona, aminoglutetimida, agonistas de LH-RH (por ejemplo, acetato de goserelina, buserelina, leuprorelina, etc.), droloxifeno, epitioestanol, sulfonato de etinilestradiol, inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, clorhidrato de fadrozol, anastrozol, retrozol, exemestano, vorozol, formestano, etc.), antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicartamida, nilutamida, etc.), inhi-bidores de la 5 α -reductasa (por ejemplo, finasterida, epristerida, etc.), fármacos de adrenocortico hormona (por ejemplo, dexametasona, prednisolona, betametasona, triamcinolona, etc.), inhibidores de la síntesis de andrógenos (por ejemplo, abiraterona, etc.), retinoide y fármacos que retardan el metabolismo retinoide (por ejemplo, liarozol, etc.), y entre otros, se prefieren los agonistas de LH-RH (por ejemplo, acetato de goserelina, buserelina, leuprorelina, etc.).
- 25 Ejemplos de "agentes inmunoterapéuticos (BRM)" incluyen picibanil, crestina, sizofirán, lentinán, ubenimex, interfe-rones, interleucinas, factor estimulador de colonias de macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos, eritropoyetina, linfotoxina, vacuna BCG, *Corinebacterium parvum*, levamisol, polisacárido K, procodazol, etc.
- 35 Los "factores de crecimiento celular" en los "fármacos para inhibir las acciones de factores de crecimiento celular y sus receptores" pueden ser cualquier sustancia mientras que sea un material para estimular el crecimiento celular y, generalmente, péptidos que tienen un peso molecular de 20.000 o menos y que se unen a sus receptores para mos-trar las acciones a un nivel inferior, se pueden emplear como factores. Ejemplos específicos son (1) EGF (factor de crecimiento epidérmico) o sustancias que tienen sustancialmente la misma actividad que EGF [p. ej., EGF, herglina, etc.], (2) insulina o sustancias que tienen sustancialmente la misma actividad que la insulina [p. ej., insulina, IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina), IGF-2, etc.], (3) FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) o sustancias que tienen sustancialmente la misma actividad que FGF [p. ej., FGF ácido, FGF básico, KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), FGF-10, etc.], (4) otros factores de crecimiento [p. ej., CSF (factor estimulante de colonias), EPO (eritropoyetina), IL-2 (interleucina-2), NGF (factor de crecimiento de nervios), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF β (factor de crecimiento transformante β), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), etc.] y similares.
- 40 Los "receptores de los factores de crecimiento celulares" pueden ser cualquier receptor siempre y cuando sea capaz de unirse a los factores de crecimiento celulares descritos anteriormente, y ejemplos específicos son el receptor de EGF, receptor de hereglina (HER2), receptor de insulina, receptor de IGF, receptor 1 de FGF o receptor 2 de FGF, etc.
- 45 Como "agente que inhibe el efecto del factor de crecimiento celular" se incluye el anticuerpo de HER2 (trastuzumab (Herceptin (marca registrada)), etc.), mesilato de imatinib, ZD1839 o anticuerpo de EGFR (cetuximab (Erbix (marca registrada)), etc.), anticuerpo contra VEGF (p. ej., Bevacizumab (Avastin (marca registrada))), anticuerpo de VEGFR, inhibidor de VEGFR, inhibidor de EGFR (erlotinib (Tarceva (marca registrada)), gefitinib (Iressa (marca registrada)), etc.).
- 55

Además de los agentes mencionados anteriormente, también se emplean L-asparaginasa, aceglatona, clorhidrato de procarbazona, complejo de protoporfirina-cobalto, mercurio-hematoporfirina sódica, inhibidor de topoisomerasa I (p. ej., Irinotecán, Topotecán, etc.), inhibidor de topoisomerasa II (p. ej., Sobzoxán, etc.), agente que induce la diferenciación (p. ej., retinoide, grupo de vitamina D, etc.), inhibidor de la angiogénesis (p. ej., talidomida, SU11248, etc.), α -bloqueante (p. ej., clorhidrato de tamsulosina, naftopidil, urapidil, alfuzosina, terazosina, prazosina, silodosina, etc.), inhibidor de la cinasa de serina-treonina, antagonista del receptor de endotelina (p. ej., atrasentán, etc.), inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib, etc.), inhibidor de Hsp90 (p. ej., 17-AAG, etc.), espironolactona, minoxidil, 11 α -hidroxiprogesterona, inhibidor de la resorción ósea/supresor de la metástasis ósea (p. ej., ácido zoledrónico, ácido alendrónico, ácido pamidrónico, ácido etidrónico, ácido ibandrónico, ácido clodrónico), etc.

10 El uso combinado del compuesto de la presente invención y un fármaco concomitante muestra los siguientes efectos excelentes.

(1) La dosis se puede reducir en comparación con la dosis cuando el compuesto de la presente invención o un fármaco concomitante se administra solo.

15 (2) Un fármaco administrado de forma concomitante con el compuesto de la presente invención se puede seleccionar dependiendo del estado (leve, grave, etc.) de un paciente.

(3) Se puede seleccionar un fármaco concomitante, cuyo mecanismo funcional es diferente del del compuesto de la presente invención, de modo que el período de tratamiento se programa de forma más extensa.

(4) Se puede seleccionar un fármaco concomitante, cuyo mecanismo funcional es diferente del del compuesto de la presente invención, de modo que se pueden lograr efectos terapéuticos sostenidos.

20 (5) Se puede obtener un efecto sinérgico mediante el uso concomitante del compuesto de la presente invención y un fármaco concomitante.

Además, el compuesto de la presente invención puede reducir los valores de testosterona a un nivel de castración inmediatamente después de la medicación. Por tanto, cuando se utiliza el fármaco concomitante tal como un agonista de LH-RH (por ejemplo, acetato de goserelina, buserelina, leuprorelina etc.; con preferencia leuprorelina) en combinación con el compuesto de la presente invención, se pueden reducir los valores de testosterona a un nivel de castración inmediatamente después de la medicación del compuesto de la presente invención. Además, puesto que el uso combinado del fármaco concomitante tal como un agonista de LH-RH (por ejemplo, acetato de goserelina, buserelina, leuprorelina, etc.; con preferencia leuprorelina) y el compuesto de la presente invención da lugar a una conservación prolongada del período dependiente de hormona, su uso puede resultar ventajoso.

30 En lo sucesivo, el uso combinado del compuesto de la presente invención y el fármaco concomitante se denomina "la preparación combinada de la presente invención".

35 Cuando se utiliza la preparación combinada de la presente invención, no se limita un período de dosificación del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante; el compuesto de la presente invención o su composición farmacéutica y el fármaco concomitante o su composición farmacéutica se pueden administrar al sujeto de forma simultánea o mediando ciertos intervalos de tiempo. La dosis del fármaco concomitante se puede modificar según la dosis utilizada clínicamente y se puede seleccionar de forma apropiada dependiendo del sujeto al que se va a administrar, la vía de administración, la enfermedad, la combinación, etc.

40 Un modo de administración de la preparación combinada de la presente invención no se limita de forma particular, pero es suficiente que se utilice el compuesto de la presente invención en combinación con el fármaco concomitante en el momento de la administración. Para tal modo de administración, se puede utilizar, por ejemplo, (1) la administración juntos al mismo tiempo de una forma de dosificación simple obtenida mediante la mezcla del compuesto de la presente invención y el fármaco concomitante, (2) la administración simultánea de dos formas de dosificación preparadas separadamente a partir del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante a través de la misma vía de administración, (3) la administración de dos formas de dosificación preparadas separadamente a partir del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante con ciertos intervalos de tiempo a través de la misma vía de administración, (4) la administración simultánea de dos formas de dosificación preparadas separadamente a partir del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante a través de diferentes vías de administración, (5) la administración de dos formas de dosificación preparadas separadamente a partir del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante con ciertos intervalos de tiempo (por ejemplo, administración del compuesto de la presente invención y del fármaco concomitante en este orden, o administración en un orden inverso) a través de diferentes vías de administración, etc.

55 La preparación combinada de la presente invención tiene baja toxicidad y por lo tanto, se puede administrar de forma segura por vía oral o parenteral (por ejemplo, tópica, rectal, intravenosa, etc.), o en forma de preparaciones farmacéuticas tales como comprimidos (que incluyen grageas y comprimidos recubiertos), formas de dosificación en polvo, gránulos (que incluyen cápsulas blandas), formas de dosificación líquidas, inyecciones, supositorios, formas de dosificación de liberación sostenida, etc., que se obtienen mediante la mezcla del compuesto de la presente invención o (y) el fármaco concomitante descrito con anterioridad con vehículos farmacéuticamente acep-

tables mediante métodos conocidos públicamente. Las formas de dosificación inyectables se pueden administrar por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, en el órgano, o directamente en el foco.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables, que se pueden utilizar en la fabricación de la preparación farmacéutica de la presente invención, incluyen varias sustancias vehículo, orgánicas o inorgánicas, utilizadas normalmente como materiales para preparaciones farmacéuticas. Estas sustancias incluyen, por ejemplo, un excipiente, un lubricante, un aglutinante y un agente disgregante en una forma de dosificación sólida, y un disolvente, un auxiliar de disolución, un agente de suspensión, un agente de isotonicidad, un tampón, un agente suavizante, etc., en una forma de dosificación líquida. Además, en caso de ser necesario, se pueden utilizar en cantidades apropiadas aditivos convencionales tales como un agente conservante, un antioxidante, un colorante, un edulcorante, un adsorbente, un humectante, etc.

Ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, almidón, almidón de maíz, celulosa cristalina, ácido silícico anhídrido ligero, etc.

Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, sílice coloidal, etc.

Ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa cristalina, sacarosa, D-manitol, dextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etc.

Ejemplos de agentes disgregantes incluyen almidón, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, almidón carboximetilo de sodio, L-hidroxipropilcelulosa, etc.

Ejemplos de disolventes incluyen agua para inyecciones, alcohol, propilenglicol, Macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva, etc.

Ejemplos de auxiliares de disolución incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, citrato de sodio, etc.

Ejemplos de agentes de suspensión incluyen tensioactivos tales como esteariltrietanolamina, laurilsulfato de sodio, aminopropionato de laurilo, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, monoestearato de glicerina, etc.; polímeros hidrófilos tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc.

Ejemplos de agentes isotonizantes incluyen glucosa, D-sorbitol, cloruro de sodio, glicerina, D-manitol, etc.

Ejemplos de tampones incluyen soluciones tamponadoras de un fosfato, acetato, carbonato, citrato, etc.

Ejemplos de agentes suavizantes incluyen alcohol bencílico, etc.

Ejemplos de conservantes incluyen p-hidroxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido dehidroacético, ácido sórbico, etc.

Ejemplos de antioxidantes incluyen un sulfito, ácido ascórbico, α -tocoferol, etc.

En la preparación combinada de la presente invención, se puede seleccionar de forma apropiada una proporción del compuesto de la presente invención y el fármaco concomitante, dependiendo del sujeto al que se va a administrar, la vía de administración, la enfermedad, etc.

Por ejemplo, la cantidad del compuesto de la presente invención contenida en la preparación combinada de la presente invención varía dependiendo de la forma de dosificación de la preparación, pero normalmente es de aproximadamente 0,01 a 100% en peso, con preferencia de aproximadamente 0,1 a 50% en peso y con más preferencia de aproximadamente 0,5 a 20% en peso, tomando como base el peso total de la preparación.

La cantidad de fármaco concomitante contenido en la preparación combinada de la presente invención varía dependiendo de la forma de dosificación de la preparación, pero normalmente es de aproximadamente 0,01 a 100% en peso, con preferencia de aproximadamente 0,1 a 50% en peso y con más preferencia de aproximadamente 0,5 a 20% en peso, tomando como base el peso total de la preparación.

La cantidad de aditivos tales como un vehículo, etc., contenidos en la preparación combinada de la presente invención varía dependiendo de la forma de dosificación de la preparación, pero normalmente es de aproximadamente 1 a 99,99% en peso, con preferencia de aproximadamente 10 a 90% en peso, tomando como base el peso total de la preparación.

Estas cantidades pueden ser las mismas, también cuando el compuesto de la presente invención y el fármaco concomitante se preparan de forma separada, respectivamente.

Estas preparaciones se pueden fabricar mediante métodos conocidos públicamente por sí mismos, utilizados convencionalmente en general.

Por ejemplo, el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante se pueden preparar en una forma de dosificación inyectable mediante formulación con un agente dispersante (por ejemplo, Tween 80 (fabricado por Atlas Powder Company, EE.UU.), HCO 60 (fabricado por Nikko Chemicals Co., Ltd.), polietilenglicol, carboximetil celulosa, alginato de sodio, hidroxipropilmetil celulosa, dextrina, etc.), un estabilizante (por ejemplo, ácido ascórbico, piro-sulfito de sodio), un agente tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80, macrogol, etc.), un agente solubilizante (por ejemplo, glicerina, etanol, etc.), un agente tamponador (por ejemplo, ácido fosfórico o su sal de metal alcalino, ácido cítrico o su sal de metal alcalino, etc.), un agente de isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol, sorbitol, glucosa, etc.), un agente de ajuste del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc.), un conservante (por ejemplo, p-oxibenzoato de etilo, ácido benzoico, metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, etc.), un solubilizante (por ejemplo, glicerina concentrada, meglumina, etc.), un auxiliar de la disolución (por ejemplo, propilenglicol, sacarosa, etc.), un agente suavizante (por ejemplo, glucosa, alcohol bencílico, etc.), para preparar en forma de una inyección acuosa; o mediante disolución, suspensión o emulsión con un aceite vegetal, tal como aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, etc., un auxiliar de disolución tal como propilenglicol o similares para preparar en forma de una inyección aceitosa.

Una forma de dosificación oral se puede producir de manera convencional agregando al compuesto de la presente invención o al fármaco concomitante, por ejemplo, un excipiente (por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, etc.), un agente disgregante (por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, etc.), un aglutinante (por ejemplo, almidón, goma arábiga, carboximetil celulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropil celulosa, etc.), un lubricante (por ejemplo, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol 6000, etc.) y otros aditivos, comprimiendo la mezcla resultante y, en caso de ser necesario, recubriendo el producto comprimido para los fines de enmascarar el sabor, degradación entérica o liberación sostenida mediante técnicas conocidas públicamente. Los agentes de recubrimiento para este fin incluyen, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa, etil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Prulonic F68, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, succinato acetato de hidroximetil celulosa, Eudragit (fabricado por Rohm Company, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico) y colorantes (por ejemplo, óxido de hierro, dióxido de titanio). La forma de dosificación oral puede ser una forma de dosificación de liberación inmediata o una forma de dosificación de liberación sostenida.

Por ejemplo, en un supositorio, el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante se prepara en una composición aceitosa o acuosa sólida, semisólida o líquida mediante técnicas conocidas públicamente. Las bases aceitosas utilizadas para la composición descrita con anterioridad incluyen glicéridos de ácidos grasos superiores [por ejemplo, manteca de cacao, uilepsols (fabricados por Dynamite Nobel Company, Alemania), etc.], ácidos grasos moderados [por ejemplo, miglioles (fabricados por Dynamite Nobel Company, Alemania), etc.], aceites vegetales (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de semilla de algodón, etc.) y similares. Las bases acuosas incluyen, por ejemplo, polietilenglicoles y propilenglicol. Las bases para geles acuosos incluyen, por ejemplo, gomas naturales, derivados de celulosa, polímeros vinílicos, polímeros acrílicos, etc.

Ejemplos de la forma de dosificación de liberación sostenida anterior incluyen microcápsulas de liberación sostenida y similares.

Las microcápsulas de liberación sostenida se pueden obtener mediante métodos conocidos públicamente, y con preferencia se preparan en forma de, por ejemplo, una forma de dosificación de liberación sostenida mediante el método [2] mostrado a continuación y luego se administran.

Con preferencia, el compuesto de la presente invención se prepara en una forma de dosificación para administración oral tal como una forma de dosificación sólida (por ejemplo, forma de dosificación en polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas) o en una forma de dosificación para administración rectal tal como un supositorio, etc. En particular se prefiere una forma de dosificación para administración oral.

El fármaco concomitante se puede preparar en la forma de dosificación descrita con anterioridad, dependiendo del tipo de fármaco.

A continuación, se describirá de forma específica [1] una preparación inyectable del compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante y su producción, [2] una preparación de liberación sostenida o de liberación inmediata del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante y su producción y [3] una preparación disgregante sublingual, bucal u oral rápida oral del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante y su producción.

[1] Preparación Inyectable y su Producción

Se prefiere una preparación inyectable obtenida mediante la disolución del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante en agua. La preparación inyectable puede contener un benzoato y/o un salicilato.

La preparación inyectable se obtiene mediante la disolución del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante y opcionalmente un benzoato y/o un salicilato en agua.

Ejemplos del benzoato y/o salicilato descrito con anterioridad incluyen una sal de metal alcalino tal como sales de sodio y potasio, etc., una sal de metal alcalinotérreo tal como sales de calcio y magnesio, etc., una sal de amonio,

una sal de meglumina, una sal de un ácido orgánico tal como trometamol, y similares.

La concentración del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante en la preparación inyectable es de aproximadamente 0,05 a 50% p/v, con preferencia de aproximadamente 0,3 a 20% p/v. La concentración del benzoato y/o salicilato es 0,5 a 50% p/v, con preferencia 3 a 20% p/v.

- 5 Además, aditivos utilizados generalmente en una preparación inyectable, tales como un estabilizante (ácido ascórbico, piro-sulfito de sodio, etc.), un agente tensioactivo (polisorbato 80, macrogol, etc.), un agente solubilizante (glicerina, etanol, etc.), un agente tamponador (ácido fosfórico y su sal de metal alcalino, ácido cítrico y su sal de metal alcalino, etc.), un agente de isotonicidad (cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc.), un agente dispersante (hidroxipropilmetil celulosa, dextrina), un agente de ajuste del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc.),
10 un conservante (por ejemplo, p-oxibenzoato de etilo, ácido benzoico, etc.), un solubilizante (glicerina concentrada, meglumina, etc.), un auxiliar de disolución (por ejemplo, propilenglicol, sacarosa, etc.), un agente suavizante (glucosa, alcohol bencílico, etc.) se añaden de forma apropiada a la preparación. Cualquiera de estos aditivos se añade en una cantidad empleada generalmente en una preparación inyectable.

- 15 La preparación inyectable se ajusta a un pH de 2 a 12, con preferencia de 2,5 a 8,0 mediante la adición de un agente de ajuste del pH.

La preparación inyectable se obtiene mediante la disolución del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante y opcionalmente un benzoato y/o salicilato, y, en caso de ser necesario, los aditivos anteriores en agua. Estos componentes se pueden disolver en cualquier orden según la misma forma que se utiliza en una preparación inyectable convencional.

- 20 Con preferencia, se calienta una solución acuosa para inyección, y se utiliza como una preparación inyectable después de la esterilización mediante filtración o sometiendo a autoclave como una preparación inyectable convencional, para proporcionar una preparación inyectable.

Con preferencia, una preparación inyectable acuosa se somete a autoclave, por ejemplo, de 100 a 121°C durante 5 a 30 minutos.

- 25 Además, la preparación puede estar en forma de solución a la cual se imparte una actividad antibacteriana para poder utilizarla como una forma de dosificación múltiple en dosis divididas.

[2] Preparación de Liberación Sostenida o de Liberación Inmediata y su Producción

- Una preparación preferida de liberación sostenida comprende un núcleo que comprende el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante, que se recubre en forma opcional con un material no hidrosoluble o un polímero hinchado. Por ejemplo, se prefiere una preparación de liberación sostenida para la administración oral de una forma de dosificación una vez al día.

- Ejemplos de material no hidrosoluble utilizado para el agente de recubrimiento incluyen éteres de celulosa tales como etil celulosa, butil celulosa, etc., ésteres de celulosa tales como acetato de celulosa, propionato de celulosa, etc., poli(ésteres vinílicos) tales como poli(acetato de vinilo), poli(butirato de vinilo), etc., polímeros de ácido acrílico
35 tales como un copolímero de ácido acrílico/ácido metacrílico, un copolímero de metacrilato de metilo, un copolímero de metacrilato de etoxietilo/metacrilato de cinamoetilo/metacrilato de aminoalquilo, un poli(ácido acrílico), un poli(ácido metacrílico), un copolímero de alquilamida y ácido metacrílico, un poli(metacrilato de metilo), un polimetacrilato, un copolímero de metacrilato de aminoalquilo, un poli(anhídrido metacrílico), un copolímero de metacrilato de glicidilo, en particular, una serie de Eudragits (Rohm & Pharma) tal como Eudragit RS-100, RL-100, RS-30D, RL-30D, RL-PO y RS-PO (copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo/metacrilato de clorotrimetilo/etil amonio) y Eudragit NE-30D (copolímero de metacrilato de metilo/acrilato de etilo), etc., aceites hidrogenados tales como aceite de ricino hidrogenado (por ejemplo, LUBRI WAX (Freund Industrial Co., Ltd.), etc.), ceras tales como cera de carnauba, un éster de glicerina de ácido graso, parafina, etc., ésteres de poliglicerina de ácido graso, etc.

- 40 El polímero hinchado es con preferencia un polímero que tiene un grupo ácido eliminable y muestra un hinchamiento dependiente del pH, y se prefiere un polímero que tiene un grupo ácido eliminable, que experimenta poco hinchamiento a un pH ácido, tal como el del estómago, pero que se hincha mucho a pH neutro, tal como en el intestino grueso y delgado.

- Ejemplos de un polímero de este tipo que tiene un grupo ácido eliminable y muestra hinchamiento dependiente del pH, incluyen un polímero entrelazado de poli(ácido acrílico) tal como los Carbómeros 934P, 940, 941, 974P, 980, 1342, etc., policarbofilo y policarbofilo de calcio (fabricados por BF Goodrich Chemicals), Hivis Wakos 103, 104, 105 y 304 (fabricados todos por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), etc.

El agente de recubrimiento utilizado en la preparación de liberación sostenida puede contener además un material hidrófilo.

Ejemplos de material hidrófilo incluyen un polisacárido que puede tener un grupo sulfato, tal como pululano, dextrina,

alginatos de metal alcalino, etc., un polisacárido que tiene un grupo hidroxialquilo o un grupo carboxialquilo tal como hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica, etc., metil celulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, etc.

- 5 La cantidad de material no hidrosoluble contenido en el agente de recubrimiento de la preparación de liberación sostenida es de aproximadamente 30 a aproximadamente 90% (p/p), con preferencia de aproximadamente 35 a aproximadamente 80% (p/p), con más preferencia de aproximadamente 40 a aproximadamente 75% (p/p), y el contenido en polímero hinchado es de aproximadamente 3 a aproximadamente 30% (p/p), con preferencia de aproximadamente 3 a aproximadamente 15% (p/p). El agente de recubrimiento puede contener además un material hidrófilo y la cantidad de material hidrófilo contenido en el agente de recubrimiento es de aproximadamente 50% (p/p) o
- 10 menos, con preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 40% (p/p), con más preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 35% (p/p). Según se utiliza en la presente memoria, el % (p/p) anterior se entiende que significa un % en peso tomando como base la composición del agente de recubrimiento, que es el resto de la solución de agente de recubrimiento después de la eliminación de cualquier disolvente (por ejemplo, agua, un alcohol inferior tal como metanol, etanol, etc.).
- 15 La preparación de liberación sostenida se elabora mediante la preparación de un núcleo que contiene un fármaco como el ilustrado a continuación, seguido por el recubrimiento del núcleo resultante con una solución de agente de recubrimiento obtenida calentando-fundiendo un material no hidrosoluble o un polímero hinchado o mediante la disolución o dispersión de tal material en un disolvente.

I. Producción del Núcleo que Contiene el Fármaco

- 20 La forma de un núcleo que contiene un fármaco que se va a recubrir con un agente de recubrimiento (a continuación simplemente denominado un núcleo) no está limitada específicamente, pero con preferencia se prepara una forma particular tal como gránulos, gránulos finos o similares.

Cuando el núcleo es de gránulos o gránulos finos, éstos tienen un tamaño de partícula medio de preferentemente aproximadamente 150 a aproximadamente 2000 μm , con más preferencia de aproximadamente 500 a aproximadamente 1400 μm .

El núcleo se puede preparar de forma convencional. Por ejemplo, un fármaco se mezcla con un excipiente, aglutinante, agente disgregante, lubricante, estabilizante apropiado, etc., y luego se somete a granulación por extrusión húmeda, granulación sobre un lecho fluidizado, o similares.

- 30 El contenido en fármaco en el núcleo es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 95% (p/p), con preferencia de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 80% (p/p), con más preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 70% (p/p).

Ejemplos del excipiente contenido en el núcleo incluyen un sacárido tal como sacarosa, lactosa, manitol, glucosa, etc., almidón, celulosa cristalina, fosfato de calcio, almidón de maíz, etc. Entre ellos, se prefieren celulosa cristalina y almidón de maíz.

- 35 Ejemplos del aglutinante utilizado incluyen poli(alcohol vinílico), hidroxipropil celulosa, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, Pluronic F68, goma arábiga, gelatina, almidón, etc. Ejemplos del agente disgregante incluyen carboximetil celulosa de calcio (ECG505), croscarmelosa de sodio (Ac-Di-Sol), polivinilpirrolidona entrelazada (crospovidona), hidroxipropil celulosa sustituida inferior (L-HPC), etc. Entre ellos, se prefieren hidroxipropil celulosa, polivinilpirrolidona e hidroxipropil celulosa poco sustituida. Ejemplos del lubricante y del anticoagulante incluyen talco, estearato de magnesio y sus sales inorgánicas, y ejemplos del lubricante incluyen polietilenglicol, etc. Ejemplos del estabilizante incluyen un ácido tal como ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, etc.

- Además de la técnica descrita con anterioridad, el núcleo se puede preparar mediante la utilización de otras técnicas tales como una técnica de granulación en tambor giratorio, una técnica de recubrimiento en plato giratorio, una técnica de recubrimiento sobre un lecho fluidizado y una técnica de granulación por fundición, en donde un fármaco o una mezcla del fármaco con un excipiente, un lubricante, etc. se agrega por porciones a partículas de un vehículo inerte, tales como semillas para el núcleo junto con vaporización de un aglutinante disuelto en un disolvente apropiado tal como agua, un alcohol inferior (por ejemplo, metanol, etanol, etc.) o similares. Ejemplos de las partículas de un vehículo inerte incluyen las preparadas a partir de sacarosa, lactosa, almidón, celulosa cristalina y ceras y, con preferencia, estos vehículos tienen un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 1500 μm .

- Con el fin de separar el fármaco contenido en el núcleo de un agente de recubrimiento, la superficie del núcleo se puede cubrir con un material protector. Ejemplos del material protector incluyen el material hidrófilo descrito con anterioridad y un material no hidrosoluble. El material protector preferido es polietilenglicol o un polisacárido que tiene un grupo hidroxialquilo o un grupo carboxialquilo, con más preferencia, hidroxipropilmetil celulosa e hidroxipropil celulosa. El material protector puede contener como estabilizante, un ácido tal como ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, etc., y un lubricante tal como talco. Cuando se utiliza el material protector, la cantidad que se va a recubrir del mismo es de aproximadamente 1 a aproximadamente 15% (p/p), con

preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% (p/p), con más preferencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 8% (p/p) tomando como base el núcleo.

El material protector se puede recubrir mediante un método de recubrimiento convencional y específicamente, el núcleo se recubre por vaporización con el material protector mediante una técnica de recubrimiento sobre lecho fluidizado, una técnica de recubrimiento sobre un plato giratorio, etc.

II. Recubrimiento del Núcleo con un Agente de Recubrimiento

El núcleo obtenido en el apartado I anterior se recubre con una solución de agente de recubrimiento preparada mediante fusión en caliente del material no hidrosoluble y el polímero hinchado dependiente del pH descrito con anterioridad y un material hidrófilo, o mediante la disolución o dispersión de los mismos en un disolvente para obtener una preparación de liberación sostenida.

Como un método de recubrimiento del núcleo con la solución del agente de recubrimiento se utiliza, por ejemplo, el método de recubrimiento por vaporización, etc.

La proporción de composición del material no hidrosoluble, polímero hinchado y material hidrófilo en la solución del agente de recubrimiento se puede seleccionar apropiadamente para que esté dentro de las cantidades de los componentes respectivos contenidos en el recubrimiento.

La cantidad de agente de recubrimiento es de aproximadamente 1 a aproximadamente 90% (p/p), con preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 50% (p/p), con más preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 35% (p/p), tomando como base el núcleo (excluyendo el recubrimiento del material protector).

Como disolvente para la solución de agente de recubrimiento, se pueden utilizar agua y un disolvente orgánico por separado o como una mezcla de los mismos. Cuando se utiliza una mezcla, la proporción de agua y de disolvente orgánico (agua/disolvente orgánico: una proporción en peso) puede variar dentro del intervalo de 1 a 100%, y con preferencia de 1 a aproximadamente 30%. El disolvente orgánico no se limita de forma particular siempre que pueda disolver el material no hidrosoluble, y ejemplos del disolvente incluyen un alcohol inferior tal como alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol n-butilico, etc., una alcanona inferior tal como acetona, acetonitrilo, cloroformo, cloruro de metileno, etc. En particular, se prefiere un alcohol inferior, siendo más preferido alcohol etílico y alcohol isopropílico. Agua y una mezcla de agua y un disolvente orgánico se utilizan con preferencia como disolventes para la solución del agente de recubrimiento. En este caso, se puede añadir a la solución del agente de recubrimiento, en caso de ser necesario, un ácido tal como ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, con el fin de estabilizar la solución del agente de recubrimiento.

Para llevar a cabo el recubrimiento mediante vaporización, el recubrimiento se puede realizar utilizando un método de recubrimiento convencional. Específicamente, el núcleo se vaporiza con una solución de agente de recubrimiento mediante una técnica de recubrimiento sobre lecho fluidizado, una técnica de recubrimiento sobre un plato giratorio o similares. En este momento, también se puede añadir un lubricante tal como talco, óxido de titanio, estearato de magnesio, estearato de calcio, anhídrido silícico ligero, etc., y un plastificante tal como éster graso de glicerina, aceite de ricino endurecido, citrato de trietilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, etc.

Después del recubrimiento con un agente de recubrimiento, también se puede añadir por mezcla, en caso de ser necesario, un agente antiestático tal como talco.

La preparación de liberación inmediata puede ser un líquido (solución, suspensión, emulsión, etc.) o un sólido (partículas, píldoras, comprimidos, etc.). Se puede utilizar una preparación oral y una preparación parenteral tal como una preparación inyectable, y se prefiere una preparación oral.

La preparación de liberación inmediata puede contener normalmente un vehículo, aditivos y un excipiente (de aquí en adelante abreviado como excipientes) que se utilizan de forma convencional en el campo farmacéutico, en adición a un fármaco que es un ingrediente activo. Los excipientes farmacéuticos no se limitan de forma específica siempre que sean excipientes que se utilizan en forma convencional en el campo farmacéutico. Ejemplos del excipiente para una preparación oral sólida incluyen lactosa, almidón, almidón de maíz, celulosa cristalina (Avicel PH101, fabricada por Asahi Kasei Corporation, etc.), azúcar en polvo, azúcar granulado, manitol, anhídrido silícico ligero, carbonato de magnesio, carbonato de calcio, L-cisteína, etc., siendo preferidos el almidón de maíz y el manitol. Se puede emplear cualquiera de estos excipientes solo o en combinación entre sí. Las cantidades de los excipientes son, por ejemplo, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 99,4% p/p, con preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 98,5% p/p, con más preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 97% p/p, tomando como base el peso total de la preparación de liberación inmediata. El contenido en fármaco en la preparación de liberación inmediata se puede seleccionar de forma apropiada a partir del intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 95%, con preferencia de aproximadamente 1% a aproximadamente 60% para la cantidad total de la preparación de liberación inmediata.

Cuando la preparación de liberación inmediata es una preparación sólida oral, la preparación contiene un agente disgregante añadido a los componentes descritos con anterioridad. Ejemplos del agente disgregante incluyen carbo-

ximetilcelulosa de calcio (ECG505 fabricada por GOTOKU CHEMICAL Co., Ltd.), croscarmelosa de sodio (por ejemplo, Ac-Di-Sol fabricada por Asahi Kasei Corporation), crospovidona (por ejemplo, COLIDON CL fabricada por BASF), hidroxipropil celulosa poco sustituida (Shin-Etsu chemical Co., Ltd.), carboximetil almidón (MATSUTANI CHEMICAL INDUSTRY Co., Ltd.), carboximetil almidón sódico (EXORITAB fabricado por KIMURA SANGYO), almidón α parcial (PCS fabricado por Asahi Kasei Corporation), etc. Por ejemplo, se puede utilizar el agente disgregante que desintegra los gránulos mediante la absorción de agua o el hinchamiento después del contacto con agua, o formando un canal entre el componente activo que comprende el núcleo y un excipiente. Cualquiera de estos agentes disgregantes se pueden utilizar solos o combinados entre sí. La cantidad de agente disgregante utilizado puede seleccionarse de forma apropiada dependiendo del tipo y de la cantidad del fármaco utilizado o de una preparación particular, diseñada para la liberación pretendida. Por ejemplo, la cantidad es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 30% p/p, con preferencia de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15% p/p, tomando como base el peso total de la preparación de liberación inmediata.

Cuando la preparación de liberación inmediata es una preparación sólida oral, puede contener en forma opcional aditivos utilizados normalmente en una preparación sólida, sumados a los componentes descritos con anterioridad. Ejemplos de los aditivos incluyen aglutinantes (por ejemplo, sacarosa, gelatina, goma arábiga en polvo, metil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, pululano, dextrina, etc.), lubricantes (polietilenglicol, estearato de magnesio, talco, anhídrido silícico ligero (por ejemplo, aerosil (NIP-PON AEROSIL)), agentes tensioactivos (por ejemplo, agentes tensioactivos aniónicos tal como alquilsulfato de sodio, agentes tensioactivos no iónicos tales como ésteres grasos de polioxietileno, ésteres grasos de polioxietilén sorbitán, derivados del aceite de ricino polioxietilenado, etc.), colorantes (por ejemplo, colorantes de alquitrán, caramelo, colcotar, óxido de titanio, riboflavinas), en caso de ser necesario, correctores (por ejemplo, edulcorantes, saborizantes, etc.), adsorbentes, conservantes, agentes humectantes, agentes antiestáticos, etc. Además, también se puede añadir como estabilizante un ácido orgánico tal como ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico o similares.

Como el aglutinante anterior, se utilizan con preferencia hidroxipropil celulosa, polietilenglicol y polivinilpirrolidona, etc.

La preparación de liberación inmediata se puede preparar mezclando los componentes descritos con anterioridad y amasando la mezcla, en caso de ser necesario, y luego moldeándola de acuerdo con una técnica convencional para dar forma a preparaciones farmacéuticas. La mezcla anterior se puede preparar de forma convencional, por ejemplo, mezclando, amasando, etc. Específicamente, cuando la preparación de liberación inmediata está en forma de partículas, la preparación se puede preparar mezclando los componentes con un granulador vertical, un amasador multifuncional (fabricado por HATA IRON WORKS CO., LTD), un granulador de lecho fluidizado FD-5S (fabricado por POWREX CORPORATION) o similares, y luego granulando el resultado mediante granulación por extrusión húmeda o granulación sobre lecho fluidizado, mediante una técnica similar a la que se utiliza para preparar el núcleo de la preparación de liberación sostenida descrita con anterioridad.

La preparación de liberación inmediata y la preparación de liberación sostenida así obtenidas pueden derivar en compuestos como tales, o, junto con excipientes farmacéuticamente apropiados, en preparaciones farmacéuticas, separadamente de forma convencional, para preparar preparaciones respectivas para administrar combinadas entre sí de forma simultánea o mediando ciertos intervalos de tiempo. Alternativamente, ambas preparaciones pueden derivar en compuestos para una forma de dosificación simple para administración oral (por ejemplo, gránulos, gránulos finos, comprimidos, cápsulas) como tales, o, junto con excipientes farmacéuticamente apropiados. Ambas preparaciones en forma de gránulos o gránulos finos se pueden cargar también en una cápsula simple para administración oral.

[3] Preparación Sublingual, Bucal u Oral de Desintegración Rápida y su Producción

Una preparación sublingual, bucal u oral de desintegración rápida puede existir en forma de una preparación sólida tal como un comprimido, o en forma de un parche mucoso oral (película) o una película de desintegración oral.

La preparación sublingual, bucal u oral de desintegración rápida es con preferencia una preparación que contiene el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante y un excipiente. La preparación también puede contener agentes auxiliares tales como un agente lubricante, un agente de isotonicidad, un vehículo hidrófilo, un polímero hidrodispersable, un estabilizante, etc. Además para los fines de promover la absorción y aumentar la biodisponibilidad, la preparación también puede contener derivados de β -ciclodextrina o derivados de β -ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil- β -ciclodextrina, etc.), y similares.

Ejemplos del excipiente anterior incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, almidón, celulosa cristalina, anhídrido silícico ligero, etc. Ejemplos del lubricante incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, sílice coloidal, etc., siendo preferidos estearato de magnesio y sílice coloidal. Ejemplos del agente de isotonicidad incluyen cloruro de sodio, glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, glicerina y urea, siendo preferido en particular el manitol. Como vehículo hidrófilo, se encuentran, por ejemplo, un vehículo hidrófilo de hinchamiento tal como celulosa cristalina, etil celulosa, polivinilpirrolidona entrelazada, anhídrido silícico ligero, ácido silícico, fosfato de dicalcio, carbonato de calcio, etc., siendo preferida la celulosa cristalina (por ejemplo, celulosa microcristalina, etc.). Como

polímero hidrodispersable, se encuentran, por ejemplo, una goma (por ejemplo, goma tragacanto, goma acacia, goma guar), alginato (por ejemplo, alginato de sodio), derivados de celulosa (por ejemplo, metil celulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), gelatina, almidón hidrosoluble, poli(ácido acrílico) (por ejemplo, carbómero), poli(ácido metaacrílico), poli(ácido vinílico), polietilenglicol, polivinilpirrolidona, policarbofilo, ascorbato, sales de palmitato, etc., prefiriéndose hidroxipropilmetil celulosa, poli(ácido acrílico), alginato, gelatina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol. Se prefiere en particular la hidroxipropilmetil celulosa. Como estabilizante, se encuentra, por ejemplo, cisteína, tiosorbitol, ácido tartárico, ácido cítrico, carbonato de sodio, ácido ascórbico, glicina, sulfito de sodio, etc., siendo particularmente preferidos el ácido cítrico y el ácido ascórbico.

La preparación sublingual, bucal u oral de desintegración rápida se puede preparar mezclando el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante y un excipiente mediante un método conocido por sí mismo. Además, si se desea, también se pueden mezclar por adición los agentes auxiliares descritos con anterioridad, tal como el agente lubricante, el agente isotonzante, el vehículo hidrófilo, el polímero hidrodispersable, el estabilizante, el colorante, el edulcorante, el conservante, etc. Después de mezclar los componentes descritos con anterioridad de forma simultánea o mediando ciertos intervalos de tiempo, la mezcla se comprime en comprimidos para obtener el comprimido sublingual, bucal u oral de desintegración rápida. Con el fin de obtener una dureza apropiada, se puede utilizar un disolvente tal como agua, un alcohol, etc. para hidratar o humedecer los componentes antes o después de formar los comprimidos, seguido de un secado.

Para preparar el parche mucoso oral (película), el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante y el polímero hidrodispersable (con preferencia, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), excipiente, etc., descritos con anterioridad se disuelven en un disolvente tal como agua, etc. y luego la solución resultante se vierte en forma de película. Además, se pueden añadir a la preparación aditivos tales como un agente plastificante, un estabilizante, un antioxidante, un conservante, un colorante, un agente tamponador, un edulcorante, etc. Se puede añadir un glicol tal como polietilenglicol, propilenglicol, etc. para impartir una elasticidad apropiada a una película, y también se puede añadir un polímero bioadhesivo (por ejemplo, policarbofilo, carbopol) para aumentar la adhesión de la película al revestimiento de la mucosa oral. El vertido se puede realizar vertiendo una solución sobre una superficie no adhesiva, esparciendo la solución utilizando un sistema de recubrimiento tal como una cuchilla raspadora, con un grosor uniforme (con preferencia, aproximadamente 10 a 1000 micrones), y luego secando la solución para formar una película. La película así formada se seca a temperatura ambiente o mientras que se calienta, y luego se corta en piezas, teniendo cada una un área de superficie deseada.

Una preparación oral de desintegración rápida preferida es, por ejemplo, una preparación de difusión rápida en forma de malla sólida, que comprende el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante y el vehículo hidrosoluble o hidrodifusible inerte para el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante. La malla se forma mediante la sublimación de un disolvente procedente de la composición sólida que comprende una solución del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante en un disolvente apropiado.

Además del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante, la composición de la preparación oral de desintegración rápida puede contener con preferencia un agente formador de matriz y componentes secundarios.

Ejemplos del agente formador de matriz incluyen gelatinas, dextrinas y proteínas animales o vegetales procedentes de semilla de soja, trigo, psilium, etc.; materiales pegajosos tales como goma arábiga, goma guar, agar, goma de xantano, etc.; polisacáridos; alginatos; carboximetilcelulosas; carragenanos; dextrinas; pectinas; polímeros sintéticos tales como polivinilpirrolidonas; materiales derivados de complejos de gelatina-goma arábiga, etc. El agente formador de matriz además incluye sacáridos tales como manitol, dextrosa, lactosa, galactosa, trehalosa, etc.; sacáridos cíclicos tales como ciclodextrinas, etc.; sales inorgánicas tales como fosfato de sodio, cloruro de sodio, silicato de aluminio, etc.; aminoácidos que tienen de 2 a 12 átomos de carbono tales como glicina, L-alanina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-hidroxiprolina, L-isoleucina, L-leucina, L-fenilalanina, etc.

Antes de la solidificación se pueden incorporar en una solución o una suspensión uno o varios agentes formadores de matriz. Los agentes formadores de matriz pueden estar presentes en adición a un agente tensioactivo, o pueden estar presentes en ausencia de un agente tensioactivo. Los agentes formadores de matriz no sirven únicamente para formar una matriz en sí, sino que también ayudan a mantener la difusión del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante en la solución o suspensión.

La composición puede contener un componente secundario tal como un agente conservante, un antioxidante, un agente tensioactivo, un agente espesante, un colorante, un agente de ajuste del pH, un saborizante, un edulcorante, un agente para enmascarar el sabor, etc. Como colorante apropiado, se puede utilizar, por ejemplo, óxido de hierro rojo, negro y amarillo, colorantes FD & C disponibles en ERIS & EVERALD tales como FD & C Azul nº 2 y FD & C Rojo nº 40, etc. Ejemplos del saborizante preferido incluyen saborizante de menta, frambuesa, regaliz, naranja, limón, pomelo, caramelo, vainilla, cereza, uva y una combinación de los mismos. Ejemplos de agentes apropiados para el ajuste del pH incluyen ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y ácido maleico. Ejemplos de edulcorante apropiado incluyen aspartamo, acesulfamo K y taumatina. Ejemplos de agente enmascarador del sabor apropiado incluyen bicarbonato de sodio, resinas de intercambio iónico, compuestos de inclusión de ciclodextrina, adsorbentes y apomorfina microencapsulada.

La preparación contiene generalmente el compuesto de la presente invención o el fármaco concomitante en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso, con preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30% en peso y con preferencia la preparación (el comprimido sublingual, bucal, etc. descrito con anterioridad) permite la disolución en agua del 90% o más del compuesto de la presente invención o del fármaco concomitante en un período de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos, con preferencia de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos, con más preferencia de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 5 minutos, o es una preparación oral de desintegración rápida que se desintegra al cabo de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 segundos, con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 segundos, con más preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 segundos, después de haber sido colocada en la cavidad oral.

La cantidad del excipiente anterior es de aproximadamente 10 a aproximadamente 99% en peso, con preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 90% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad de β -ciclodextrina o de derivado de β -ciclodextrina es de aproximadamente 0 a aproximadamente 30% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad de lubricante es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10% en peso, con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 5% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad del agente de isotonicidad es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 90% en peso, con preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 70% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad del vehículo hidrófilo es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso, con preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 30% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad del polímero hidrodispersable es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30% en peso, con preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 25% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. La cantidad de estabilizante es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% en peso, con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 5% en peso, tomando como base el peso total de la preparación. En caso de ser necesario, la preparación descrita con anterioridad puede contener además aditivos tales como un colorante, un edulcorante, un conservante, etc.

Una dosis de las preparaciones combinadas de la presente invención varía dependiendo del tipo del compuesto de la presente invención, de la edad, el peso corporal, las afecciones, la forma de dosificación, la vía de administración, el período de dosificación, etc.

Una dosis del compuesto de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto al que se va a administrar, el órgano diana, las afecciones, la vía de administración, etc. y en una administración oral, el compuesto se administra en general al paciente (de 60 kg de peso corporal) con cáncer en una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg, con preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg y con más preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg. En la administración parenteral, una dosis simple del compuesto puede variar dependiendo del sujeto al que se va a administrar, el órgano diana, las afecciones, la vía de administración, etc. y en forma de una dosis inyectable, es ventajoso administrar el compuesto en forma intravenosa al paciente (de 60 kg de peso corporal) con cáncer, en general en una dosis diaria de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30 mg, con preferencia de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg, y con más preferencia de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg. Para otras especies animales, la dosis correspondiente se puede administrar convertida de un peso de 60 kg. Por supuesto, la dosis puede variar dependiendo de las afecciones individuales descritas con anterioridad; en tal caso, puede ser suficiente una dosis menor que la dosis proporcionada con anterioridad, o se puede utilizar una dosis superior al intervalo dado con anterioridad.

Es posible fijar cualquier intervalo de una dosis para el fármaco concomitante, mientras que no cause efectos secundarios adversos. Una dosis diaria del fármaco concomitante puede variar dependiendo de la gravedad de la enfermedad, edad, sexo, peso corporal y susceptibilidad del sujeto, periodo e intervalos de dosificación, características, formulación, tipo y componentes activos de la preparación farmacéutica, etc. y no se limita de forma particular. Por ejemplo, en una administración oral, la dosis es de aproximadamente 0,001 a 2000 mg, con preferencia de aproximadamente 0,01 a 500 mg, y con más preferencia de aproximadamente 0,1 a 100 mg por kg de peso corporal de mamíferos en términos de un fármaco; normalmente, esta dosis se administra dividida en 1 a 4 veces al día.

Cuando se administran las preparaciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden administrar de forma concomitante. Alternativamente, en primer lugar se administra el fármaco concomitante y luego el compuesto de la presente invención, o se administra en primer lugar el compuesto de la presente invención y luego el fármaco concomitante. Cuando se administran mediando ciertos intervalos de tiempo, los intervalos varían dependiendo del componente activo que se va a administrar, la forma de dosificación y la vía de administración; por ejemplo, cuando se administra en primer lugar el fármaco concomitante, el compuesto de la presente invención se puede administrar dentro del intervalo de 1 minuto a 3 días, con preferencia de 10 minutos a 1 día, con más preferencia de 15 minutos a 1 hora después de la administración del fármaco concomitante. Cuando se administra en primer lugar el compuesto de la presente invención, el fármaco concomitante se puede administrar dentro del intervalo de 1 minuto a 1 día, con preferencia de 10 minutos a 6 horas, con más preferencia de 15 minutos a 1 hora después de la administración del compuesto de la presente invención.

Como método preferido de administración, por ejemplo, se administra de forma oral desde aproximadamente 0,001 a 200 mg/kg del fármaco concomitante en forma de una preparación de dosificación oral y después de aproximada-

mente 15 minutos, se administra de forma parenteral como una dosis diaria de aproximadamente 0,005 a 0,5 mg/kg el compuesto de la presente invención en forma de una preparación parenteral.

Como metastinas se utilizan, por ejemplo, la metastina humana descrita en el documento WO 00/24890, la metastina de ratón o rata descrita en el documento WO 01/75104, etc.

- 5 Ejemplos específicos de metastina humana incluyen un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 47-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y que consiste en 8 a 54 residuos de aminoácidos, y similares.

10 El "péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 47-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y que consiste en 8 a 54 residuos de aminoácidos" puede ser cualquier péptido, con la condición de que sea un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 47-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y que consiste en 8 a 54 residuos de aminoácidos, pero significa que estos péptidos tienen sustancialmente la misma actividad fisiológica (por ejemplo, una actividad de unión al receptor, una acción de transducción de señales, una acción de aumento del nivel de azúcar, una acción estimulante de la secreción de glucagón pancreático, una acción que favorece la formación de orina, etc.). Específicamente, se utiliza (i) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, (ii) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 47-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal representada por SEQ ID NO: 1 y que consiste en 8 a 15 residuos de aminoácidos, etc.

20 Más específicamente, la metastina humana utilizada incluye (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 54 (1-54)), (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 40-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 15 (40-54); SEQ ID NO: 15), (iii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 45-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 10 (45-54); SEQ ID NO: 16), (iv) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 46-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 9 (46-54); SEQ ID NO: 17), (v) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 47-54 en el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 8 (47-54); SEQ ID NO: 18), etc.

30 Como metastina de ratón (A), se utiliza, por ejemplo, (i) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 134-141 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 y que consiste en 8 a 52 residuos de aminoácidos. Ejemplos específicos de la metastina de ratón (A) utilizada incluyen (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 90-141 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 132-141 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, (iii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 127-141 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, y similares.

40 Como metastina de ratón (B), se utiliza, por ejemplo, (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 138-145 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 y que consiste en 8 a 52 residuos de aminoácidos. Ejemplos específicos de la metastina de ratón (B) utilizada incluyen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 94-145 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5, y similares. Como metastina de rata, se utiliza, por ejemplo, (i) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 112-119 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7 y que consiste en 8 a 52 residuos de aminoácidos. Ejemplos específicos de la metastina de rata utilizada incluyen (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 68-119 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7, (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 110-119 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7, (iii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 105-119 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7, y similares.

50 A lo largo de la memoria descriptiva, las metastinas se representan de acuerdo con el modo convencional de descripción de péptidos, es decir, el extremo N-terminal (amino terminal) en el lado izquierdo y el extremo C-terminal (carboxilo terminal) en el lado derecho. En el péptido representado por SEQ ID NO: 1, el extremo C-terminal puede presentarse en cualquier forma entre un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (-COO⁻), una amida (-CONH₂) y un éster (-COOR). En este documento, los ejemplos de R del grupo éster o alquilamida incluyen un grupo alquilo C₁₋₆ tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc.; un grupo cicloalquilo C₃₋₈ tal como ciclopentilo, ciclohexilo, etc.; un grupo arilo C₆₋₁₂ tal como fenilo, α-naftilo, etc.; un grupo aralquilo C₇₋₁₄ tal como un grupo fenil-alquilo C₁₋₂, por ejemplo, bencilo, fenetilo, etc., o un grupo α-naftil-alquilo C₁₋₂ tal como α-naftilmetilo, etc.; un grupo pivaloiloximetilo, que se utilizan ampliamente como un éster para uso oral, y similares.

Además, las metastinas incluyen péptidos, en donde el grupo amino en el residuo de metionina del extremo N-terminal se protege con un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo alcanilo C₂₋₆, por ejemplo, un grupo formilo, grupo acetilo, etc.); aquellos en donde la región en el extremo N-terminal se escinde *in*

vivo y el grupo glutamilo formado de este modo está piroglutaminado; aquellos en donde un sustituyente (por ejemplo, -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidino, etc.) en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula se protege con un grupo protector apropiado (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo alcanóilo C₂₋₆, por ejemplo, un grupo formilo, grupo acetilo, etc.), o péptidos conjugados tales como glicopéptidos unidos a cadenas de azúcar.

Para las sales de la metastina de la presente invención, se prefieren sales con bases fisiológicamente aceptables (por ejemplo, sales de metales alcalinos) o ácidos (por ejemplo, ácidos orgánicos o ácidos inorgánicos), etc., en especial se prefieren sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables. Ejemplos de tales sales incluyen sales con, por ejemplo, ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico); sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido benzosulfónico) y similares.

Como ADNs que codifican metastinas, se utilizan, por ejemplo, ADNs que codifican metastina humana descrita en el documento WO 00/24890, ADNs que codifican metastina de rata o ratón descrita en el documento WO 01/75104, etc.

Los ADNs que codifican las metastinas pueden ser cualquiera entre ADN genómico, genoteca de ADN genómico, ADNc derivado de las células y tejidos descritos con anterioridad, genoteca de ADNc derivado de las células y tejidos descritos con anterioridad y ADN sintético. El vector que se va a utilizar para la genoteca puede ser cualquiera entre bacteriófago, plásmido, cósmido y fagémido. El ADN también se puede amplificar de forma directa mediante reacción en cadena de la polimerasa y transcriptasa inversa (de aquí en adelante abreviada como RT-PCR) utilizando el ARN total o una fracción de ARNm preparada a partir de las células y tejidos descritos con anterioridad.

El ADN que codifica metastina humana, precursor de metastina de ratón (A), precursor de metastina de ratón (B) o precursor de metastina de rata puede ser cualquier ADN, con la condición de que cada uno sea un ADN que contenga una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, o un ADN que tiene una secuencia de bases que se puede hibridar con la secuencia de bases representada por cualquier secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones muy rigurosas y que codifique la metastina humana, metastina de ratón (A), metastina de ratón (B) o metastina de rata descritas con anterioridad.

Ejemplos específicos del ADN que se puede hibridar con la secuencia de bases representada por cualquiera entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 incluyen ADNs que contienen una secuencia de bases que tiene al menos aproximadamente 70% de homología, con preferencia al menos aproximadamente 80% de homología, con más preferencia al menos aproximadamente 90% de homología y con la mayor preferencia al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de bases representada por cualquiera entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.

La homología en la secuencia de bases se puede medir empleando el algoritmo de puntuación por homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) con las siguientes condiciones (un valor de expectativa = 10; se permiten huecos; filtrado = ACTIVADO; puntuación de apareamiento = 1; puntuación de apareamiento erróneo = -3).

La hibridación se puede realizar mediante métodos conocidos públicamente por sí mismos o mediante modificaciones de estos métodos, por ejemplo, según el método descrito en Molecular Cloning, 2^a (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). También se puede utilizar una genoteca comercialmente disponible, según las instrucciones adjuntas al protocolo del fabricante. Con preferencia, la hibridación se puede realizar en condiciones muy rigurosas.

Las condiciones muy rigurosas utilizadas en la presente memoria son, por ejemplo, las de una concentración de sodio de aproximadamente 19 a 40 mM, con preferencia de aproximadamente 19 a 20 mM a una temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, con preferencia de aproximadamente 60 a 65°C. En particular, son más preferidas las condiciones de hibridación con una concentración de sodio de aproximadamente 19 mM a una temperatura de aproximadamente 65°C.

Específicamente, como ADN que codifica la metastina humana que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, se utiliza el ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2. Por consiguiente, para la secuencia de bases que codifica la metastina humana que consiste en las diferentes secuencias de aminoácidos descritas con anterioridad, se puede seleccionar una secuencia de bases correspondiente a cada una de las secuencias de aminoácidos parciales en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, a partir de la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2.

Como ADN que codifica el precursor de la metastina de ratón (A) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, se emplea un ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 4 y similares. Por consiguiente, para la secuencia de bases que codifica el precursor de la metastina de ratón (A) que consiste en las diversas secuencias de aminoácidos descritas con anterioridad, se puede seleccionar una

secuencia de bases correspondiente a cada una de las secuencias de aminoácidos parciales en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, a partir de la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 4.

Como ADN que codifica el precursor de la metastina de ratón (B) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5, se emplea un ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 6 y similares. Por consiguiente, para la secuencia de bases que codifica el precursor de la metastina de ratón (B) que comprende varias secuencias de aminoácidos descritas con anterioridad, se puede seleccionar una secuencia de bases correspondiente a cada una de las secuencias de aminoácidos parciales en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5, a partir de la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 6.

Como ADN que codifica la metastina de rata que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7, se emplea un ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 8 y similares. Por consiguiente, para la secuencia de bases que codifica la metastina de rata que consiste en las diversas secuencias de aminoácidos descritas con anterioridad, se puede seleccionar una secuencia de bases correspondiente a cada una de las secuencias de aminoácidos parciales en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7, a partir de la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 8.

Más específicamente, para el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 54 (1-54)), se utiliza un ADN que contiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2, etc.

Para el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 40-54 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 15 (40-54); SEQ ID NO: 15), se utiliza un ADN que contiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 19, etc.

Para el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 45-54 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 10 (45-54); representada por SEQ ID NO: 16), se utiliza un ADN que contiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 20, etc.

Para el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 46-54 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 9 (46-54); representada por SEQ ID NO: 17), se utiliza un ADN que contiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 21, etc.

Para el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 47-54 del extremo N-terminal en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 1 (metastina humana 8 (47-54); representada por SEQ ID NO: 18), se utiliza un ADN que contiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 22, etc.

Como receptor de metastina, se utilizan sus péptidos parciales o sales de los mismos, por ejemplo, un receptor de la metastina humana, sus péptidos parciales o sales de los mismos descritos en el documento WO 00/24890, un receptor de la metastina de ratón o rata, sus péptidos parciales o sales de los mismos descritos en el documento WO 01/75104, etc.

Específicamente, como receptor de metastina se utiliza una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.

La secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 incluye, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70% de homología, con preferencia al menos aproximadamente 80% de homología, con más preferencia al menos aproximadamente 90% de homología y con la mayor preferencia al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.

La homología de las secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de puntuación por homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) con las siguientes condiciones (un valor de expectativa = 10; se permiten los huecos; matriz = BLOSUM62; filtrado = DES- ACTIVADO).

Como proteína que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, se prefiere una proteína que tenga sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 y que tenga una actividad de la misma naturaleza que la de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, etc.

Como actividad de sustancialmente la misma naturaleza, se puede nombrar, por ejemplo, una actividad de unión al ligando, una actividad de transducción de señales y similares. La "misma naturaleza sustancialmente" se entiende que significa que la naturaleza de estas actividades es equivalente en términos de calidad. Por tanto, las actividades tales como la actividad de unión al ligando, la actividad de transducción de señales, etc. son con preferencia equiva-

lentes (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 100 veces, con preferencia de aproximadamente 0,5 a 10 veces, con más preferencia 0,5 a 2 veces), pero pueden estar presentes y se permiten diferencias en factores cuantitativos tales como un nivel de estas actividades, o tal como un peso molecular de la proteína.

- 5 Las actividades tales como una actividad de unión al ligando, una actividad de transducción de señales, etc., se pueden someter a ensayo mediante métodos conocidos públicamente por sí mismos, con modificaciones y se pueden determinar de acuerdo con métodos para determinar un ligando o métodos de escrutinio descritos, por ejemplo, en los documentos WO 00/24890 o WO 01/75104.

- 10 Ejemplos del receptor de metastina utilizado incluyen proteínas que comprenden (i) la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, de la cual se eliminan al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la mayor preferencia se eliminan varios (1 o 2)); (ii) la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, a la cual se añaden al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la mayor preferencia se agregan varios (1 o 2)); (iii) la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, en la que se sustituyen con otros aminoácidos al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la mayor preferencia se sustituyen varios (1 o 2)); o (iv) una combinación de estas secuencias de aminoácidos; y similares.

- 20 A lo largo de la memoria descriptiva, los receptores de metastina se representan de acuerdo con el modo convencional de descripción de péptidos, esto es, el extremo N-terminal (amino terminal) en el lado izquierdo y el extremo C-terminal (carboxilo terminal) en el lado derecho. En los receptores de metastina que incluyen el receptor de metastina representado por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, el extremo C-terminal se puede presentar en forma de cualquier grupo: carboxilo (-COOH), carboxilato (-COO-), amida (-CONH₂) y éster (-COOR). En la presente memoria, los ejemplos de R del grupo éster incluyen un grupo alquilo C₁₋₆ tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc.; un grupo cicloalquilo C₃₋₈ tal como ciclopentilo, ciclohexilo, etc.; un grupo arilo C₆₋₁₂ tal como fenilo, α-naftilo, etc.; un grupo aralquilo C₇₋₁₄ tal como un grupo fenil-alquilo C₁₋₂, por ejemplo, bencilo, fenetilo, etc., o un grupo α-naftil-alquilo C₁₋₂ tal como α-naftilmetilo, etc.; y un grupo pivaloiloximetilo, que se utilizan ampliamente como éster para uso oral, y similares.

- 25 Cuando los receptores de metastina contienen un grupo carboxilo (o un carboxilato) en una posición distinta a la del extremo C-terminal, el grupo carboxilo se puede amidar o esterificar y tales amidas o ésteres también se incluyen dentro de la proteína del receptor de la presente invención. En este caso, el grupo éster utilizado puede ser el mismo grupo que el de los ésteres del extremo C-terminal descritos con anterioridad.

- 30 Además, los receptores de metastina incluyen aquellos en los que el grupo amino en el residuo de metionina del extremo N-terminal se protege con un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo alcanóilo C₂₋₆, por ejemplo, grupo formilo, grupo acetilo, etc.); aquellos en los que la región en el extremo N-terminal se escinde *in vivo* y el grupo glutamilo formado de este modo está piroglutaminado; aquellos en los que un sustituyente (por ejemplo, -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidino, etc.) en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula se protege con un grupo protector apropiado (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo alcanóilo C₂₋₆, por ejemplo, un grupo formilo, grupo acetilo, etc.), o proteínas conjugadas tales como glicopéptidos unidos a cadenas de azúcar.

- 35 Ejemplos específicos de los receptores de metastina incluyen un receptor de metastina humana que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, un receptor de metastina de rata que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 11, un receptor de metastina de ratón que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 13, etc.

- 40 Los péptidos parciales del receptor de metastina (en la presente memoria denominados simplemente el péptido parcial) pueden ser cualquier péptido, con la condición de que sean péptidos parciales del receptor de metastina descrito con anterioridad; se utilizan aquellos tales como moléculas de proteínas del receptor de metastina, que son los sitios expuestos en la parte exterior de la membrana celular y que tienen actividad de unión al ligando.

- 45 Específicamente, el péptido parcial del receptor de metastina que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 es un péptido que contiene las partes analizadas para ser dominios extracelulares (dominios hidrófilos) en el análisis de gráfico hidrófobo. También se puede utilizar un péptido que contiene un dominio hidrófobo en parte. Además, el péptido puede contener cada dominio de forma separada o una pluralidad de dominios juntos.

- 50 En el receptor de metastina, los péptidos parciales preferidos son los que tienen un número de aminoácidos de al menos 20, con preferencia al menos 50 y con más preferencia al menos 100, en la secuencia de aminoácidos descrita con anterioridad, que constituye el receptor de metastina.

55 El péptido parcial puede ser un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita con anterioridad, de la cual se eliminan al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con más

preferencia se eliminan varios (1 o 2) aminoácidos); a la cual se añaden al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con más preferencia se añaden varios (1 o 2) aminoácidos); o, en donde se sustituyen al menos 1 o 2 aminoácidos (con preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con más preferencia se sustituyen varios (1 o 2) aminoácidos). En el péptido parcial, el extremo C-terminal puede ser cualquier forma entre un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (-COO⁻), una amida (-CONH₂) y un éster (-COOR), como en el receptor de metastina descrito con anterioridad.

Además, los péptidos parciales incluyen péptidos, en donde el grupo amino en el residuo de metionina del extremo N-terminal se protege con un grupo protector; aquellos en donde la región en el extremo N-terminal se escinde *in vivo* y el grupo glutamilo así formado está piroglutaminado; aquellos en donde un sustituyente en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula se protege con un grupo protector apropiado, o péptidos conjugados tales como glicopéptidos unidos a cadenas de azúcar, como en los receptores de metastina descritos con anterioridad.

Para las sales del receptor de metastina o el péptido parcial, se prefieren sales con ácidos fisiológicamente aceptables, en especial sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables. Ejemplos de las sales incluyen sales con, por ejemplo, ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico); sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido benzosulfónico) y similares.

Como ADN que codifica el receptor de metastina o sus péptidos parciales, se utilizan, por ejemplo, un ADN que codifica el receptor de metastina humano o sus péptidos parciales descritos en el documento WO 00/24890, un ADN que codifica el receptor de metastina de ratón o rata o sus péptidos parciales descritos en el documento WO 01/75104, etc.

Los ADNs que codifican el receptor de metastina o sus péptidos parciales pueden ser cualquiera entre ADN genómico, genoteca de ADN genómico, ADNc derivado de las células y tejidos descritos con anterioridad, genoteca de ADNc derivada de las células y tejidos descritos con anterioridad y ADN sintético. El vector que se va a utilizar para la genoteca puede ser cualquiera entre bacteriófago, plásmido, cósmido y fagémido. El ADN también se puede amplificar en forma directa mediante reacción en cadena de la polimerasa y transcriptasa inversa (de aquí en adelante abreviada como RT-PCR) utilizando el ARN total o una fracción de ARNm preparado a partir de las células y tejidos descritos con anterioridad.

Específicamente, el ADN que codifica el receptor de la metastina humana, el receptor de metastina de ratón o el receptor de metastina de rata puede ser cualquier ADN, con la condición de que cada uno sea un ADN que comprende cada secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14, o un ADN que comprende una secuencia de bases que se puede hibridar con la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14 en condiciones muy rigurosas y que codifica un receptor que tiene la actividad de sustancialmente la misma naturaleza (por ejemplo, una actividad de unión al ligando, una actividad de transducción de señales, etc.) que la del receptor de la metastina humana, el receptor de la metastina de ratón o el receptor de la metastina de rata que consisten en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14.

Ejemplos del ADN que se puede hibridar con la secuencia de bases representada por cualquiera entre SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14, incluyen ADNs que comprenden una secuencia de bases que tiene al menos aproximadamente 70% de homología, con preferencia al menos aproximadamente 80% de homología, con más preferencia al menos aproximadamente 90% de homología y con la mayor preferencia al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de bases representada por cualquiera entre SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14.

La homología en la secuencia de bases se puede medir utilizando el algoritmo de puntuación por homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) con las siguientes condiciones (un valor de expectativa = 10; se permiten huecos; filtrado = ACTIVADO; puntuación de apareamiento = 1; puntuación de apareamiento erróneo = -3).

La hibridación se puede realizar mediante métodos conocidos públicamente por sí mismos o mediante modificaciones de estos métodos, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning, 2ª (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). También se puede utilizar una genoteca comercialmente disponible, de acuerdo con las instrucciones adjuntas al protocolo del fabricante. Con preferencia, la hibridación se puede realizar con condiciones muy rigurosas.

Las condiciones muy rigurosas utilizadas en la presente memoria son, por ejemplo, aquellas con una concentración de sodio de aproximadamente 19 a 40 mM, con preferencia de aproximadamente 19 a 20 mM, a una temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, con preferencia de aproximadamente 60 a 65°C. En particular, son más preferidas las condiciones de hibridación con una concentración de sodio de aproximadamente 19 mM a una temperatura de aproximadamente 65°C.

Más específicamente, como ADN que codifica el receptor de la metastina humana que consiste en la secuencia de

aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9, se utiliza el ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 10.

Como ADN que codifica el receptor de la metastina de rata que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 11, se utiliza el ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 12.

- 5 Como ADN que codifica el receptor de la metastina de ratón que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 13, se utiliza el ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 14.

Los receptores de metastina, sus péptidos parciales o sales de los mismos y los ADNs que codifican los receptores de metastina o sus péptidos parciales se pueden obtener o producir mediante los métodos descritos en los documentos WO 00/24890 o WO 01/75104.

- 10 La presente invención se describirá en detalle haciendo referencia a EJEMPLOS, EJEMPLOS DE FORMULACIÓN Y EJEMPLOS DE ENSAYOS, pero no se pretende limitarla a los mismos, y se puede realizar cualquier modificación sin desviarse del alcance de la presente invención.

- 15 En los siguientes EJEMPLOS, la expresión "temperatura ambiente" normalmente hace referencia a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. En porcentajes, el rendimiento se muestra por mol/% de mol y el disolvente utilizado en cromatografía por % en volumen, y el resto en % en peso. En espectros de RMN de protón, los datos de protones OH o NH, etc. que sean muy anchos y sin identificar, no se muestran.

Las otras abreviaturas utilizadas en la memoria descriptiva tienen el siguiente significado.

Abreviaturas	Descripción
10Ψ,CSNH:	el -CONH ₂ C-terminal en la posición 10 se sustituye con -CSNH ₂ .
20 1Ψ2,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 1 y 2 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
2Ψ3,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 2 y 3 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
3Ψ4,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 3 y 4 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
4Ψ5,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 4 y 5 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
6Ψ7,CSNH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 6 y 7 se sustituye con el enlace -CSNH-.
25 6Ψ7,NHCO:	el enlace -CONH- entre las posiciones 6 y 7 se sustituye con el enlace -NHCO-.
6Ψ7,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 6 y 7 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
6Ψ7,CH ₂ O:	el enlace -CONH- entre las posiciones 6 y 7 se sustituye con el enlace -CH ₂ O-.
7Ψ8,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 7 y 8 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
8Ψ9,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 8 y 9 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
30 9Ψ10,CH ₂ NH:	el enlace -CONH- entre las posiciones 9 y 10 se sustituye con el enlace -CH ₂ NH-.
Aad:	ácido 2-aminoadípico
Abu:	ácido 2-aminobutanoico
Abz(2):	ácido 2-aminobenzoico
Abz(3):	ácido 3-aminobenzoico
35 Ac:	acetilo
AcONB:	N-acetoxi-5-norbornen-2, 3-dicarboximida
Acp:	ácido 6-aminocaproico
AcOEt:	acetato de etilo
AcOH:	ácido acético
40 Aib:	ácido α-aminoisobutanoico
Ala(2-Qui):	2-quinolilalanina

	Ala(3-Bzt):	3-benzotienilalanina
	Ala(cBu):	ciclobutilalanina
	Ala(cPr):	ciclopropilalanina
	Ala(Pip):	(4-piperidin-1-il)alanina
5	Alb:	albizziina, ácido 2-amino-3-ureidopropiónico
	Ambz(4):	4-aminometilbenzoílo
	Arg(Ac):	N ^ω -acetilarginina
	Arg(Boc ₂ ,Me):	N ^{ω,ω'} -bis-terc-butoxicarbonil-N ^ω -metilarginina
	Arg(Et):	N ^ω -etilarginina
10	Arg(Me):	N ^ω -metilarginina
	Arg(asyMe ₂) o Arg(Me ₂) _{asym} :	N ^{ω,ω} -dimetilarginina asimétrica
	Arg(symMe ₂) o Arg(Me ₂) _{sym} :	N ^{ω,ω'} -dimetilarginina simétrica
	Arg(NO ₂):	N ^ω -nitroarginina
	Arg(Pbf):	N ^ω -2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuranosulfonilarginina
15	Arg(n-Pr):	N ^ω -propilarginina
	Arg(Tos):	N ^ω -tosilarginina
	Asp(NHMe):	N ^ω -metilasparagina
	Asp(NMe ₂):	N ^{ω,ω} -dimetilaspargina
	Asp(NHPen):	N ^ω -pentilasparagina
20	Asp(NHcPr):	N ^ω -ciclopropilasparagina
	Asp(NHBzl):	N ^ω -bencilasparagina
	AzaGly:	azaglicina
	AzaPhe:	azafenilalanina
	Aze(2):	ácido azetidin-2-carboxílico
25	Aze(3):	ácido azetidin-3-carboxílico
	β-Ala:	β-alanina
	Boc:	terc-butoxicarbonilo
	Boc ₂ O:	dicarbonato de di-terc-butilo
	Br-Z:	2-bromobenciloxicarbonilo
30	Bu ^t :	terc-butilo
	Bzl:	bencilo
	CDI:	1,1'-carbonildiimidazol
	Cha:	ciclohexilalanina
	CIP:	tetrafluoroborato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolio
35	Cit:	citulina
	Cl ^t resin:	resina de 2-clorotritilo
	Cl-Z:	2-clorobenciloxicarbonilo

	Dab:	ácido 2,4-diaminobutanoico
	Dap:	ácido 2,3-diaminopropiónico
	Dap(Ac):	ácido N ^β -acetil-β-diaminopropiónico
	Dap(For):	ácido N ^β -formil-β-diaminopropiónico
5	Dap(Gly):	ácido N ^β -glicil-β-diaminopropiónico
	Dap(GnGly):	ácido N ^β -(N-guanidinoglicil)-β-diaminopropiónico
	DCM:	diclorometano
	DEA:	dietilamina
	DIEA:	N,N-diisopropiletilamina
10	DIPCDI:	1,3-diisopropilcarbodiimida
	DMAP:	4-dimetilaminopiridina
	DMF:	N,N-dimetilformamida
	EDC:	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EDT:	1,2-etanoditiol
15	Fmoc:	9-fluorenilmetoxycarbonilo
	For:	formilo
	γ-Abu:	ácido 4-aminobutanoico
	γ-MeLeu, Leu(me):	γ-metilleucina
	GlyΨ((E)CH=CH)Leu:	El -CONH- entre Gly y Leu está sustituido con alqueno de tipo (E).
20	GlyΨ(CH ₂ CH ₂)Leu:	El -CONH- entre Gly y Leu está sustituido con el enlace -CH ₂ CH ₂ -.
	GlyΨ(CH ₂ S)Leu:	El -CONH- entre Gly y Leu está sustituido con el enlace -CH ₂ S-.
	Gn:	guanidino
	GuAmb:	4-guanidinometilbenzoílo
	Har:	homoarginina
25	Har(Me):	N ^ω -metilhomoarginina
	His(3Me):	3-metilhistidina π-metilhistidina
	HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
	HOObt:	3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina
30	HONB:	N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboximida
	Hph:	homofenilalanina
	Hyp:	trans-4-hidroxiprolina
	Hyp(Bzl):	O-bencil-trans-4-hidroxiprolina
	IndPr:	3-(indol-3-il)propionilo
35	Izc:	ácido imidazolidin-2-carboxílico
	Lys(Me ₂):	N ^{ε,ε} -dimetilisina
	MBHA:	p-metilbenzhidrilamina

	MeOH:	metanol
	Mtt:	4-metiltrilito
	N((CH ₂) ₃ Gn)Gly:	N-(3-guanidinopropil)glicina
	Nal(1):	1-naftilalanina
5	Nal(2):	2-naftilalanina
	Nar:	norarginina
	Nar(Me):	N ^ω -metilnorarginina
	Nle:	norleucina
	NMeAla:	N ^α -metilalanina
10	NMeArg:	N ^α -metilarginina
	NMeAsn:	N ^α -metilasparagina
	NMeLeu:	N ^α -metilleucina
	NMePhe:	N ^α -metilfenilalanina
	NMeSer:	N ^α -metilserina
15	NMeTrp:	N ^α -metilriptofano
	NMeTyr:	N ^α -metiltirosina
	Nva:	norvalina
	OBu ^t :	terc-butoxi
	Orn:	ornitina
20	Orn(Mtt):	N ^δ -(4-metiltrilit)ornitina
	PAL:	ácido 5-(4-(9-fluorenilmetoxycarbonil)aminometil-3,5-dimetoxifenoxi)valérico
	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	pGlu:	ácido piroglutámico
	Phe(2Cl):	2-clorofenilalanina
25	Phe(2F):	2-fluorofenilalanina
	Phe(3,4Cl ₂):	3,4-diclorofenilalanina
	Phe(3,4F ₂):	3,4-difluorofenilalanina
	Phe(3CF ₃):	3-trifluorometilfenilalanina
	Phe(3Cl):	3-clorofenilalanina
30	Phe(3F):	3-fluorofenilalanina
	Phe(4Cl):	4-clorofenilalanina
	Phe(4CN):	4-cianofenilalanina
	Phe(4F):	4-fluorofenilalanina
	Phe(4Gn):	4-guanidinofenilalanina
35	Phe(4NH ₂):	4-aminofenilalanina
	Phe(4NO ₂):	4-nitrofenilalanina
	Phe(4CN):	4-cianofenilalanina

	Phe(F ₅):	pentafluorofenilalanina
	Phe(2Me):	2-metilfenilalanina
	Phe(3Me):	3-metilfenilalanina
	Phe(4Me):	4-metilfenilalanina
5	PheΨ(CH ₂ CH ₂)AzaGly:	El -CONH- entre Phe y AzaGly está sustituido con el enlace -CH ₂ CH ₂ -.
	PheΨ(E)CH=CH)Gly: (E).	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace de tipo alqueno (E).
	PheΨ(CH ₂ CH ₂)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH ₂ CH ₂ -.
	PheΨ(CH ₂ S)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH ₂ S-.
10	PheΨ((R)CH(OH)-((E)CH=)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH(OH)-CH-, el resto -CH(OH)- toma la configuración (R), y el resto entre el átomo de carbono en el resto -CH- y el átomo de carbono α de la Gly es alqueno de tipo (E).
	PheΨ((S)CH(OH)-((E)CH=)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH(OH)-CH-, el resto -CH(OH)- toma la configuración (S), y el resto entre el átomo de carbono en el resto -CH- y el átomo de carbono α de la Gly es alqueno de tipo (E).
15	PheΨ((R)CH(OH)-(CH ₂)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH(OH)-CH ₂ - y el resto -CH(OH)- toma la configuración (R).
	PheΨ((S)CH(OH)-(CH ₂)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH(OH)-CH ₂ - y el resto -CH(OH)- toma la configuración (S).
20	PheΨ(CH ₂ O)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -CH ₂ O-.
	PheΨ(COCH ₂)Gly:	El enlace -CONH- entre Phe y Gly está sustituido con el enlace -COCH ₂ -.
	PheΨ(CSNH)-NH ₂ :	La fenilalanilamida C-terminal está sustituida con fenilalaniltioamida.
	Phg:	fenilglicina
	PhOH:	fenol
25	PhSMe:	tioanisol
	Pic(2):	ácido pipercolínico
	Pie(3):	ácido 3-piperidincarboxílico
	Pip:	ácido pipercolínico
	Pro:	prolina
30	Pro(4F):	trans-4-fluoroprolina
	Pro(4NH ₂):	cis-4-aminoprolina
	Pya(2):	2-piridilalanina
	Pya(3):	3-piridilalanina
	Pya(4):	4-piridilalanina
35	PyAOP:	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfonio
	PyBOP:	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfonio
	PyBrop:	hexafluorofosfato de bromo-tris(pirrolidin)fosfonio
	Pzc(2):	ácido piperazin-2-carboxílico
	Sar:	N-metilglicina
40	Ser(Ac):	O-acetilserina

	Ser(Me):	O-metilserina
	Thi:	2-tienilalanina
	Thz:	tioprolina
	Tic:	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxílico
5	TIS:	triisopropilsilano
	Tie:	terc-leucina
	Tos:	tosilo
	Trp(For):	N ⁱⁿ -formilriptófano
	Trt:	tritulo
10	Tyr(Me):	O-metiltirosina
	Tyr(PO ₃ H ₂):	O-fosfotirosina
	TyrΨ(CH ₂ NH)Asn:	el -CONH- entre Tyr y Asn está sustituido con el enlace -CH ₂ NH-.
	TFA:	ácido trifluoroacético
	TFE:	trifluoroetanol
15	Z:	benciloxicarbonilo

En la memoria descriptiva y los dibujos, cuando los códigos de las bases y los aminoácidos se indican mediante abreviaturas, éstas se basan en las abreviaturas de acuerdo con la Comisión IUPAC-IUB de Nomenclatura Bioquímica o los códigos comunes de la técnica. Para aminoácidos que pueden tener el isómero óptico, se presenta la forma L a menos que se indique lo contrario.

- 20 Los números de identificación de secuencia en el listado de secuencias de la memoria descriptiva indican las siguientes secuencias, respectivamente.

[SEQ ID NO: 1]

Muestra la secuencia de aminoácidos de la metastina obtenida a partir de humanos (Metastina).

[SEQ ID NO: 2]

- 25 Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica la metastina humana.

[SEQ ID NO: 3]

Muestra la secuencia de aminoácidos del precursor de la metastina de ratón (A).

[SEQ ID NO: 4]

- 30 Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica el precursor de la metastina de ratón de (A), que es la secuencia de bases en el plásmido pCMV-mKiSS-1 hospedada en el transformante DH10B/pCMV-mKiSS-1 de *Escherichia coli*.

[SEQ ID NO: 5]

Muestra la secuencia de aminoácidos del precursor de la metastina de ratón (B).

[SEQ ID NO: 6]

- 35 Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica el precursor de la metastina de ratón (B), que es la secuencia de bases en el plásmido pCR2.1-mKiSS-1.4A hospedado en el transformante DH5α/pCR2.1-mKiSS-1.4A de *Escherichia coli*.

[SEQ ID NO: 7]

Muestra la secuencia de aminoácidos del precursor de la metastina obtenido a partir de rata.

- 40 [SEQ ID NO: 8]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica el precursor de la metastina de rata.

[SEQ ID NO: 9]

Muestra la secuencia de aminoácidos de OT7T175 humana (receptor de metastina).

[SEQ ID NO: 10]

- 5 Muestra la secuencia de bases del ADN que codificado OT7T175 humana (receptor de metastina).

[SEQ ID NO: 11]

Muestra la secuencia de aminoácidos de OT7T175 de rata (receptor de metastina).

[SEQ ID NO: 12]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica OT7T175 de rata (receptor de metastina).

- 10 [SEQ ID NO: 13]

Muestra la secuencia de aminoácidos de OT7T175 de ratón (receptor de metastina).

[SEQ ID NO: 14]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica OT7T175 de ratón (receptor de metastina).

[SEQ ID NO: 15]

- 15 Muestra la secuencia de aminoácidos de la metastina humana 15 (40-54).

[SEQ ID NO: 16]

Muestra la secuencia de aminoácidos de la metastina humana 10 (45-54) (MS10).

[SEQ ID NO: 17]

Muestra la secuencia de aminoácidos de la metastina humana 9 (46-54).

- 20 [SEQ ID NO: 18]

Muestra la secuencia de aminoácidos de la metastina humana 8 (47-54).

[SEQ ID NO: 19]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica la metastina humana 15 (40-54).

[SEQ ID NO: 20]

- 25 Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica la metastina humana 10 (45-54).

[SEQ ID NO: 21]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica la metastina humana 9 (46-54).

[SEQ ID NO: 22]

Muestra la secuencia de bases del ADN que codifica la metastina humana 8 (47-54).

- 30 El transformante DH10B/pCMV-mKiSS-1 de *Escherichia coli* está depositado desde el 24 de Enero del 2000 en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (el antiguo Ministerio de Comercio Internacional e Industria, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH)), ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal 305-8566), Japón, con el número de orden FERM BP-7003 y desde el 16 de Diciembre de 1999 en el Instituto de Fermentación (IFO), ubicado en 2-17-85, Juso-Honmachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka, Japón, con el número de orden IFO 16348.

- 35 El transformante DH5α/pCR2.1-mKiSS-1.4A de *Escherichia coli* está depositado desde el 6 de Marzo de 2000 en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (el antiguo Ministerio de Comercio Internacional e Industria, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH)), ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal 305-8566), Japón, con el número de orden FERM BP-7073 y desde el 16 de Febrero de 2000 en el Instituto
- 40

de Fermentación (IFO), ubicado en 2-17-85, Juso-Honmachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka, Japón, con el número de orden IFO 16360.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Producción de N-metil-N,N'-Bis-Boc-1-guanilpirazol

- 5 Bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 720 mg de NaH al 60% en aceite en 20 ml de DMF seco y 20 ml de solución en DMF seco de 5,59 g de N,N'-Bis-Boc-1-guanilpirazol comercialmente disponible, se añadieron a la solución a 0°C, seguido por agitación durante 10 minutos. Después se añadieron 1,68 ml de yoduro de metilo, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de la eliminación del disolvente por destilación, el residuo se disolvió en AcOEt y la solución se lavó con una solución acuosa de HCl 1 N, una solución saturada acuosa de NaHCO₃ y luego con una solución saturada acuosa de NaCl. Después del secado sobre Na₂SO₄, el disolvente se concentró y el concentrado se purificó mediante cromatografía instantánea en columna (acetato de etilo/n-hexano = 1/4) utilizando gel de sílice 60 (200 ml) para proporcionar 5,35 g (rendimiento 91,6%) de N-metil-N,N'-bis-Boc-1-guanilpirazol.

- 15 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,00 (br s, 1H), 7,69 (br s, 1H), 6,42 (dd, 1H, J=2,7, 1,5 Hz), 3,25 (s, 3H), 1,53 (s, 9H), 1,30 (s, 9H)

Análisis elemental como C₁₅H₂₄N₄O₄

Calculado: C, 55,54; H, 7,46; N, 17,27

Encontrado: C, 55,36; H, 7,48; N, 17,06

Rf1: 0,64, Rf2: 0,79

- 20 Disolvente de desarrollo para TLC:

Rf1 (acetato de etilo/n-hexano = 1/2), Rf2 (metanol/cloroformo = 2/98)

Tiempo de elución sobre HPLC: 26,7 minutos.

Condiciones de elución:

Columna: Wakosil-II 5C18 HG (4,6 x 100 mm)

- 25 Eluyente: Elución por gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 100/0-20/80, utilizando TFA al 0,1% en agua como eluyente A y acetonitrilo que contiene 0,1% de TFA como eluyente B (40 minutos).

Caudal: 1,0 ml/min.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Producción de N-metil-N,N'-Bis-Z-1-guanilpirazol

- 30 En una atmósfera de argón, se disolvieron 40 mg de NaH al 60% en aceite en 5 ml de DMF seco y se añadieron a la solución a 0°C 5 ml de solución en DMF seca de 380 mg de N,N'-Bis-Z-1-guanilpirazol comercialmente disponible, seguido por agitación durante 10 minutos. Después se añadieron 125 µl de yoduro de metilo, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Una vez separado el disolvente por destilación, el residuo se disolvió en AcOEt y la solución se lavó con una solución acuosa de HCl 1 N, una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y luego con una solución saturada acuosa de NaCl. Después del secado sobre Na₂SO₄, el disolvente se concentró para proporcionar 393 mg del producto crudo. A partir del producto crudo, se purificaron 170 mg mediante cromatografía instantánea en columna (acetato de etilo/n-hexano = 1/4) utilizando gel de sílice 60 (75 ml) para proporcionar 152 mg (rendimiento 89,5%) de N-metil-N,N'-bis-Z-1-guanilpirazol.

- 40 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,97 (br s, 1H), 7,61 (d, 1H, J=1,0 Hz), 7,37-7,32 (m, 4H), 7,29-7,26 (m, 4H), 7,16-7,13 (m, 2H), 6,36 (dd, 1H, J=2,8, 1,6 Hz), 5,18 (s, 2H), 5,04 (s, 2H), 3,22 (s, 3H)

Análisis elemental como C₂₁H₂₀N₄O₄

Calculado: C, 64,28; H, 5,14; N, 14,28

Encontrado: C, 64,09; H, 5,24; N, 14,43

Rf1: 0,50, Rf2: 0,86

45

Disolvente de desarrollo para TLC:

Rf1 (acetato de etilo/n-hexano=1/2)

Rf2 (metanol/cloroformo=2/98)

Tiempo de elución sobre HPLC: 28,9 minutos,

5 Condiciones de elución:

Columna: Wakosil-II 5C18 HG (4,6 x 100 mm)

Eluyente: Elución por gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 100/0-20/80, utilizando TFA al 0,1% en agua como eluyente A y acetonitrilo que contiene 0,1% de TFA como eluyente B (40 minutos).

Caudal: 1,0 ml/min.

10 EJEMPLO DE REFERENCIA 3

(Síntesis C): Producción de

des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Thr⁵,Phe⁶Ψ(CH₂CH₂)Gly⁷,Arg(Me)⁹,Trp¹⁰]MS¹⁰ (Compuesto nº 850)

Después de que 4,44 g (0,45 mmol/g) de resina Rink amida MBHA disponible comercialmente se había hinchado en DMF, la resina se trató con 50 mL de solución al 20% de piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc. La resina resultante se lavó con DMF y se trató en DMF con 4,21 g (8 mmol) de Fmoc-Trp(Boc)-OH, 1,27 mL (8 mmol) de DIPCDI y 1,31 g (8 mmol) de HOOBt a temperatura ambiente durante 90 minutos, mientras que se introducía Trp(Boc) para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Fmoc-Trp(Boc). De forma similar, se introdujo Orn(Mtt) para proporcionar 2 mmol de la resina Rink amida MBHA-Fmoc-Orn(Mtt)-Trp(Boc). Después de que la resina obtenida se había lavado e hinchado en tolueno, se añadieron 30 mL de TFA/TIS/TFE/tolueno (1/5/47/47), seguido de agitación durante 30 minutos y eliminación de la solución mediante filtración. Este procedimiento se repitió hasta que desapareció el color amarillo causado por grupos libres de Mtt en una solución de TFA/TIS/TFE/tolueno (1/5/47/47) cuando se añadió la solución; por tanto el grupo Mtt se había eliminado. La resina resultante Rink amida MBHA-Fmoc-Orn-Trp(Boc) se neutralizó con solución al 5% de DIEA/tolueno. Después de lavar con tolueno, se añadieron 15 mL de tolueno-TFE (4:1) y 1,95 g (6 mmol) de N-metil-N',N'-bis-Boc-1-guanilpirazol obtenido en el EJEMPLO DE REFERENCIA se añadieron a la resina. DIEA se añadió a la mezcla para ajustar el pH de la solución a 10. La solución se agitó durante 15 horas para proporcionar resina Rink Amida MBHA-Fmoc-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc) (2 mmol). Después de que la resina obtenida se había secado en MeOH, se pesaron 0,03 mmol y se volvieron a hinchar en DMF. Se introdujo Leu de la misma manera que como se ha descrito anteriormente para proporcionar 0,03 mmol de resina Rink Amida MBHA-Fmoc-Leu-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc). Después de desproteger Fmoc en solución al 20% de piperidina/DMF, la solución se trató en DMF con 51,5 mg (0,12 mmol) de Fmoc-Phe-Ψ(CH₂CH₂)Gly-OH obtenido en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4, 19,1 μl (0,12 mmol) de DIPCDI y 240 μl de solución de HOAt/DMF 0,5 M a temperatura ambiente durante 150 minutos. La resina se lavó con DMF y a continuación se trató con 10,9 μl (0,12 mmol) de Ac₂O y 20,9 μl (0,12 mmol) de DIEA para cubrir los grupos amino residuales. Posteriormente, la resina se agitó durante una noche en 2 mL de solución en DMF de Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-OH (0,06 mmol) sintetizada de forma convencional por el proceso en fase líquida, 31,2 mg (0,06 mmol) de PyA-OP, 120 μl (0,06 mmol) de solución de HOAt/DMF 0,5 M y 10,5 μl (0,06 mmol) de DIEA para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Phe-Ψ(CH₂CH₂)Gly-Leu-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc). Después del secado, se añadieron 1,5 mL de TFA/PhSMe/m-cresol/H₂O/TIS/EDT (80/5/5/5/2,5/2,5) a la resina y se agitó durante 90 minutos.

Se añadió éter dietílico a cada solución de la reacción para proporcionar el precipitado y después de la centrifugación, el material sobrenadante se retiró; este proceso se repitió dos veces para el lavado. El residuo se extrajo con una solución acuosa de ácido acético y el extracto se filtró para retirar la resina. A continuación, se realizó una elución en gradiente de densidad lineal (60 minutos) para A/B: 71,5/28,5-61,5/38,5 con un caudal de 15 mL/min empleando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA sobre una HPLC preparativa empleando una columna YMC Pack R&D-ODS-5-B S-5, 120A (30 x 250 mm). Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 5,5 mg de polvo blanco.

Espectro de masas (M+H)⁺ 1209,7 (calcd. 1209,6)

Tiempo de elución en HPLC: 12,2 min.

Condiciones de elución:

Columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MGII (4,6 x 100 mm)

50 Eluyente: Elución por gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 80/20-30/70, empleando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA (25 min)

Caudal: 1,0 mL/min.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Synthesis de Fmoc-Phe-Ψ(CH₂CH₂)-Gly-OH

Después de disolver 97,4 mg (0,269 mmol) de Boc-Phe-Ψ[(E)CH=CH]-Gly-OBu^t que es un compuesto conocido en la bibliografía, en 10 mL de AcOEt, se añadieron 10 mg de Pd/C al 10% y la mezcla se agitó en un flujo de gas hidrógeno a temperatura ambiente durante 4 horas. El catalizador Pd se retiró mediante filtración a través de celite, y el material filtrado se concentró a presión reducida. Posteriormente, el residuo se disolvió en 4 mL de TFA y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El TFA se eliminó por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en 2,25 mL de acetonitrilo:H₂O (2:1). Enfriando con hielo, una solución en acetonitrilo (3 mL) de 236 μL (1,69 mmol) de TEA y 95,1 mg (0,282 mmol) de Fmoc-OSu se añadió gota a gota secuencialmente y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 2 horas. Después de añadir 20 mL de HCl 0,1 N acuoso, el total se extrajo con AcOEt. La capa orgánica se lavó dos veces con HCl 0,1 N acuoso y después se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de concentrar a presión reducida, el producto se purificó mediante cromatografía instantánea en columna (acetato de etilo/n-hexano = 3/2) usando Wakosil C-300 para proporcionar 118 mg (cuantitativo) de Fmoc-Phe-Ψ(CH₂CH₂)-Gly-OH.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

(Síntesis G): Producción de

des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Thr⁵,Gly⁷Ψ((E)CH=CH)Leu⁸,Arg(Me)⁹,Trp¹⁰]MS¹⁰ (Compuesto n° 892)

HCl.H-Ser-OMe, 3,5 g (22,6 mmol) se suspendió en (40 mL) de cloroformo. Enfriando con hielo, se añadieron secuencialmente DIEA (8,7 mL, 49,7 mmol) y PbF₂-Cl (5,86 g, 20,3 mmol) y se agitó durante una noche, a la vez que la temperatura se elevaba gradualmente a la temperatura ambiente. Después de detener la reacción añadiendo solución acuosa saturada de ácido cítrico, el cloroformo se eliminó por destilación a presión reducida y el total se extrajo con AcOEt. La capa orgánica se lavó secuencialmente con solución acuosa saturada de ácido cítrico, solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y solución acuosa saturada de cloruro sódico y después se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de una concentración a presión reducida, se realizó una cromatografía instantánea empleando AcOEt:n-hexano = 1:1 para proporcionar PbF₂-Ser-OMe (6,94 g, 82,7%).

En atmósfera de argón y enfriando con hielo, 923 μL (2,03 mmol) de una solución en tolueno de azodicarboxilato de dietilo 2,2 M se añadió a una solución de 500 mg (1,35 mmol) de PbF₂-Ser-OMe, 522 mg (2,03 mmol) de PPh₃ en THF (20 mL). La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente y después el THF se eliminó por destilación a presión reducida. Se realizó una cromatografía instantánea empleando AcOEt:n-hexano = 1:1 para proporcionar 481 mg de éster metílico de aziridina (cuantitativo).

En atmósfera de argón, 429 μL (0,644 mmol) de una solución en tolueno de DIBAL-H 1,5 M se añadió gota a gota a una solución en tolueno (10 mL) de éster metílico de aziridina (198 mg, 0,56 mmol) a -78°C. Después de agitar durante 20 minutos a la misma temperatura, la reacción se detuvo con solución acuosa de HCl 0,1 N. El total se extrajo con éter dietílico y la capa orgánica se lavó secuencialmente con solución acuosa de HCl 0,1 N y solución acuosa saturada de cloruro sódico. Después de secar sobre MgSO₄ anhidro, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el aldehído como una sustancia oleosa. Por otro lado, se añadieron secuencialmente 146 μL (0,84 mmol) de DIEA y 197 μL (0,84 mmol) de (EtO)₂P(O)CH₂CO₂Bu^t enfriando con hielo, a una suspensión de 35,6 mg (0,84 mmol) de LiCl anhidro en acetonitrilo (2 mL). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos y después se añadió gota a gota una solución en acetonitrilo (4 mL) del aldehído obtenido anteriormente, seguido de agitación a 0°C durante 3 horas. Después el total se extrajo con AcOEt, la capa orgánica se lavó secuencialmente con solución acuosa saturada de ácido cítrico, solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y solución acuosa saturada de cloruro de sodio, y después se secó sobre MgSO₄ anhidro. La mezcla se concentró a presión reducida y el concentrado se recrystalizó en éter dietílico/n-hexano para proporcionar 86,5 mg del enoato de aziridina deseada. El agua madre se concentró a presión reducida y se sometió a cromatografía instantánea usando AcOEt:n-hexano = 1:19 para proporcionar 82,4 mg adicionales del enoato de aziridina deseada (rendimiento total: 71,5%).

En atmósfera de argón, 1,59 mL (3,17 mmol) de una solución en THF 2,0 M de i-BuMgCl se añadió gota a gota a -78°C a una solución en THF anhidro (6 mL) de 284 mg (3,17 mmol) de CuCN y 269 mg (6,34 mmol) de LiCl anhidro. La temperatura se elevó a 0°C y la mezcla se agitó durante 10 minutos. La mezcla se enfrió de nuevo a -78°C, y 402 μL (3,17 mmol) de BF₃·Et₂O y una solución en THF anhidro (6 mL) de 334 mg (0,792 mmol) de enoato de aziridina se añadió gota a gota secuencialmente. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos. Después de enfriar rápidamente con solución acuosa saturada de cloruro de amonio : 28% de solución acuosa de amonio (1:1), la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la solución de la reacción se volvió azul. El total se extrajo con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de concentrar a presión reducida, el residuo se disolvió en solución acuosa de TFA (10 mL) al 95% y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El TFA se eliminó por destilación a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con éter dietílico. El residuo recrystalizó en éter dietílico/n-hexano para proporcionar 254 mg de PbF₂-GlyΨ[(E)-CH=CH]Leu-OH

como un polvo blanco (75,7%).

A continuación, 180 mg (0,425 mmol) de Pbf-GlyΨ[(E)-CH=CH]Leu-OH y 352 μL (3 mmol) de tioanisol se disolvieron en TFA (2,65 mL), la solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El TFA se eliminó por destilación a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en acetonitrilo: H₂O (2:1,9 mL). Enfriando con hielo, se añadió trietilamina hasta que la solución se volvió básica y se añadió a la misma 168 mg (0,446 mmol) de Fmoc-OSu. Elevando la temperatura a temperatura ambiente, la mezcla se agitó durante 4 horas y el total se extrajo con AcOEt. La capa orgánica se lavó secuencialmente con solución acuosa de HCl 0,1 N y solución acuosa saturada de cloruro sódico, y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de una concentración a presión reducida, se realizó una cromatografía instantánea empleando AcOEt:n-hexano = 3,5:6,5 para proporcionar 145 mg de Fmoc-GlyΨ[(E)-CH=CH]Leu-OH (89%).

Después, 287 mg (0,1 mmol) de resina Rink amida MBHA-Fmoc-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc) (0,349 mmol/g) se hincharon en DMF, la mezcla se trató con solución al 20% de piperidina/DMF para escindir el grupo Fmoc. Posteriormente, la resina se trató en DMF con 133 mg (0,338 mmol) de Fmoc-GlyΨ[(E)-CH=CH]Leu-OH, 58,9 μL (0,338 mmol) de DIEA, 676 μL (0,338 mmol) de solución 0,5 M de HOAt/DMF y 176 mg (0,338 mmol) de PyAOP a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de lavar la resina con DMF, el péptido N-terminal se extendió mediante la síntesis en fase sólida con Fmoc para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Ac-D-Tyr(Bu^t)-Hyp(OBu^t)-Asn(Trt)-Thr(Bu^t)-Phe-GlyΨ[(E)CH=CH]Leu-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc). Después de secar la resina, se añadieron a la misma 4 mL de TFA/PhSMe/m-cresol/H₂O/TIS/EDT (80/5/5/2,5/2,5) y la mezcla se agitó durante 180 minutos. A cada solución de la reacción se añadió éter dietílico para proporcionar el precipitado y después de centrifugar, se retiró el material sobrenadante; este proceso se repitió dos veces para el lavado. El residuo se extrajo con una solución acuosa saturada de ácido acético y el extracto se filtró para eliminar la resina. A continuación, se realizó una elución en gradiente de densidad lineal (60 minutos) para A/B: 71,5/28,5-61,5/38,5 con un caudal de 15 mL/min empleando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA sobre HPLC preparativa, empleando YMC Pack R&D-ODS-5-8 S-5, columna 120A (30 x 250 mm). Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 19,6 mg de polvo blanco.

Espectro de masas (M+H)⁺ 1207,5 (calcd. 1207,6)

Tiempo de elución sobre HPLC: 14,6 min.

Condiciones de la elución:

Columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MGII (4,6 x 100 mm)

Eluyente: Elución en gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 80/20-30/70, utilizando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA (25 min)

Caudal: 1,0 mL/min.

EJEMPLO 1

Producción de des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Alb⁴,Thr⁵,Cha⁶,Gly⁷Ψ[(E)CH=CH]Leu⁸,Arg(Me)⁹,Trp¹⁰]MS¹⁰ (Compuesto n° 903)

Después de que 4,32 g (1,5 mmol) de la resina Rink amida MBHA-Fmoc-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc) (0,347 mmol/g) se había dividido en tres partes iguales y se había hinchado en DMF, la mezcla se trató con solución al 20% de piperidina/DMF para escindir el grupo Fmoc. Posteriormente, cada resina se trató en DMF con 590 mg (1,5 mmol) de Fmoc-GlyΨ[(E)-CH=CH]Leu-OH, 261 μL (1,5 mmol) de DIEA, 3,0 mL (1,5 mmol) de solución de HOAt/DMF 0,5 M y 782 mg (1,5 mmol) de PyAOP a temperatura ambiente durante 12 horas. Después se lavó la resina con DMF y se combinó, Cha, Thr(Bu^t), Alb, Hyp(Bu^t) y D-Tyr(Bu^t) se introdujeron en este orden en la resina obtenida, mediante la síntesis en fase de sólida con Fmoc empleando Fmoc-aminoácido/DIPCDI/HOAt para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Fmoc-D-Tyr(Bu^t)-Hyp(OBu^t)-Asn(Trt)-Thr(Bu^t)-Cha-GlyΨ[(E)CH=CH]Leu-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc). La resina así obtenida se desprotegió mediante tratamiento con 20% de piperidina/DMF y se lavó. La resina se suspendió a continuación en DMF y se añadieron 548 μL (6,0 mmol) de Ac₂O y 1,04 mL (6,0 mmol) de DIEA, respectivamente, seguido de agitación durante 20 minutos. La resina se lavó con DMF. Después de esto, se confirmó que la reacción se había llevado a cabo, la resina se lavó en MeOH y se secó para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Ac-D-Tyr(Bu^t)-Hyp(Bu^t)-Alb-Thr(Bu^t)-Cha-GlyΨ[(E)CH=CH]Leu-Arg(Boc₂,Me)-Trp(Boc). La resina resultante se dividió en 1 g, 2 g y 2,2 g, a los cuales se añadieron 25 mL, 50 mL y 50 mL de TFA : tioanisol : m-cresol : H₂O : EDT : TIS (80:5:5:2,5:2,5), respectivamente. Después de agitar durante 180 minutos a temperatura ambiente, la solución de la reacción se añadió gota a gota con enfriamiento rápido, a la vez que se eliminaba la resina haciéndola pasar a través de un filtro de vidrio, formando de este modo polvo blanco de péptido crudo. El péptido crudo obtenido se purificó separadamente 10 veces sobre HPLC preparativa empleando una columna de SHISEIDO CAPCELL PAK MGII (50 x 250 mm). Se realizó una elución en gradiente de densidad lineal (60 minutos) para A/B: 68/32-58/42 con un caudal de 45 mL/min, empleando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA sobre la HPLC preparativa. El producto eluido se fraccionó en tubos de ensayo de aproximadamente 14 mL cada uno. Supervisando cada fracción sobre HPLC, se identificaron solo las fracciones que contenían

el producto. Las fracciones se reunieron y se liofilizaron para proporcionar 352,2 mg de polvo blanco.

En AcCN-agua, 352,2 mg (286,7 μ mol) de la muestra purificada obtenida se disolvieron y 1,195 mL (1,433 mmol equivalente) de resina AG 1x8 AcO se añadieron a la solución. A la vez que se agitaba manualmente de forma ocasional, la solución se dejó reposar durante una hora, y se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE que tenía un diámetro de poro de 3 μ m. El filtrado se transfirió a un frasco de recuperación y el disolvente se eliminó por destilación. A continuación, se añadieron 3 mL de ácido acético al residuo. Después de someter la mezcla a ultrasonidos durante 5 minutos con un aparato de ultrasonidos, se añadieron 12 mL de agua a la solución. A la vez que se enfriaba sobre un baño de hielo, la solución de ácido acético al 20% resultante se liofilizó para proporcionar 321,8 mg de polvo blanco.

5 Espectro de masas (M+H)⁺ 1228,4 (calcd. 1228,7)

Tiempo de elución sobre HPLC: 20,2 min.

Condiciones de la elución:

Columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MGII (4,6 x 100 mm)

15 Eluyente: Elución en gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 95/5-45/55, utilizando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA (25 min)

Caudal: 1,0 mL/min.

El análisis de los aminoácidos (ácido clorhídrico al 20% que contenía ácido tioglicólico al 4%, 110°C, hidrólisis durante 24 horas; los números entre paréntesis muestran los valores teóricos): Thr 0,95 (1); Tyr 0,95 (1); Cha 1,00 (1)

EJEMPLO 2

20 Producción de des(1)-Ac-[D-Tyr2,Hyp3,Thr5,Cha6,Gly7 Ψ ((E)CH=CH)Leu8,Trp10]MS10 (Compuesto nº 926)

Usando como material de partida 3,33 g (1,5 mmol) de resina Rink amida MBHA-Fmoc (0,45 mmol/g), se realizó la síntesis en fase sólida con Fmoc para proporcionar resina Rink amida MBHA-Fmoc-Arg(Pbf)-Trp(Boc). Después de que la resina Rink amida MBHA-Fmoc-Arg(Pbf)-Trp(Boc) se había hinchado en DMF, la mezcla se trató con solución al 20% de piperidina/DMF para escindir el grupo Fmoc. Posteriormente, la resina se trató en DMF con 1,57 g (4,0 mmol) de Fmoc-Gly Ψ [(E)-CH=CH]Leu-OH, 1,39 mL (8,0 mmol) de DIEA, 8,0 mL (4,0 mmol) de solución de HOAt/DMF 0,5 M y 2,09 g (4,0 mmol) de PyAOP a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de lavar la resina con DMF, el péptido N-terminal se extendió mediante la síntesis en fase sólida con F-moc para proporcionar la resina Rink amida MBHA-Fmoc-Cha-Gly Ψ [(E)CH=CH]Leu-Arg(Pbf)-Trp(Boc). Después de desproteger el grupo Fmoc N-terminal mediante tratamiento con piperidina/DMF al 20%, la resina se trató en DMF con Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-OH 2,48 g (4,5 mmol), 734 mg (4,5 mmol) de HOOBt y 716 mL (4,5 mmol) de DIPCDI durante 60 horas. La resina Rink amida MBHA-Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-Gly Ψ [(E)CH=CH]Leu-Arg(Pbf)-Trp(Boc) resultante se lavó en MeOH y se secó. Al total de la resina resultante se añadieron 60 mL de TFA : tioanisol : m-cresol: H₂O: EDT: TIS (80:5:5:2,5:2,5). Después de agitar durante 90 minutos a temperatura ambiente, la solución de la reacción se añadió gota a gota bajo enfriamiento rápido, a la vez que se eliminaba la resina haciéndola pasar a través de un filtro de vidrio, formándose de este modo polvo blanco del péptido crudo.

El péptido crudo obtenido se purificó separadamente cinco veces sobre HPLC preparativa empleando una columna SHISEIDO CAPCELL PAK MGII (50 x 250 mm). La elución con gradiente de densidad lineal (60 minutos) para A/B: 69/31-59/41 o 68/32-58/42 se realizó con un caudal de 45 mL/min, utilizando eluyente A: TFA 0,1% en agua y eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA sobre HPLC preparativa. El producto eluido se fraccionó en tubos de ensayo de aproximadamente 14 mL cada uno. Supervisando cada fracción sobre la HPLC, se identificaron solo las fracciones que contenían el producto. Las fracciones se reunieron y se liofilizaron para proporcionar un polvo blanco.

El total se disolvió en acetonitrilo-agua y se añadieron 0,824 mL (1,005 mmol equivalente) de la resina AG 1x8 AcO a la solución. A la vez que se agitaba manualmente de forma ocasional, la solución se dejó reposar durante una hora, y se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE que tenía un diámetro de poro de 3 μ m. El filtrado se transfirió a un frasco de recuperación y el disolvente se eliminó por destilación. A continuación, se añadieron 2 mL de ácido acético al residuo. Después de someter la mezcla a ultrasonidos durante 5 minutos con un aparato de ultrasonidos, se añadieron 8 mL de agua a la solución. A la vez que se enfriaba sobre un baño de hielo, la solución de ácido acético al 20% resultante se liofilizó para proporcionar 304,7 mg de polvo blanco.

Espectro de masas (M+H)⁺ 1199,6 (calcd. 1199,7)

50 Tiempo de elución sobre HPLC: 20,2 min.

Condiciones de la elución:

Columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MGII (4,6 x 100 mm)

Eluyente: Elución en gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 95/5-45/55, utilizando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA (25 min)

Caudal: 1,0 mL/min.

- 5 El análisis de los aminoácidos (ácido clorhídrico al 20% que contenía ácido tioglicólico al 4%, 110°C, hidrólisis durante 24 horas; los números entre paréntesis muestran los valores teóricos): Asp: 0,93 (1); Thr 0,89 (1); Tyr 0,96 (1); Cha 1,00 (1); Arg 0,98 (1)

EJEMPLO 3

Producción de des(1)-Ac-[D-Tyr²,Hyp³,Alb⁴,Thr⁵,Cha⁶,Gly⁷ψ((E)CH=CH)Leu⁸,Trp¹⁰]MS¹⁰

(Compuesto nº 927)

- 10 Después de disolver 3,66 g (0,55 mmol) de resina Rink amida MBHA-Fmoc se hinchó en DMF, la cadena peptídica se extendió mediante síntesis en fase sólida con Fmoc. El grupo Fmoc N-terminal de la resina Rink amida MBHA-Fmoc-D-Tyr(Bu^t)-Hyp(Bu^t)-Alb-Thr(Bu^t)-Cha-Glyψ[(E)-CH=CH]Leu-Arg(Pbf)-Trp(Boc) así obtenida se desprotegió mediante tratamiento con 20% de piperidina/DMF. A continuación, la resina se suspendió en aproximadamente 10 mL de DMF, y 208 µl (2,2 mmol) de Ac₂O y 383 µl (2,2 mmol) de DIEA se añadieron respectivamente, seguido de
15 agitación durante 20 minutos. La resina se lavó con DMF. Después de confirmar que la reacción se había llevado a cabo, la resina se lavó en MeOH y se secó.

- A 5,9695 g de la resina resultante, se añadieron 50 mL de TFA : tioanisol : m-cresol : H₂O : EDT : TIS (80:5:5:5:2,5:2,5) y la mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Mientras que se eliminaba la resina haciéndola pasar por un filtro de vidrio, la solución de la reacción se añadió gota a gota a éter enfriado rápidamente con agitación para formar polvo blanco del péptido crudo. La resina se lavó a fondo con una solución de desprotección y después se devolvió a la solución de reacción. La resina se trató de nuevo con el mismo volumen de la solución de desprotección a temperatura ambiente durante 20 horas y se añadió éter del mismo modo gota a gota para formar polvo blanco del producto.

- 25 La mezcla de polvo blanco y éter se separó por centrifugación, respectivamente. El éter se retiró mediante decantación y este proceso se repitió dos veces hasta eliminar el ácido y el agente secuestrante. El residuo se secó y se extrajo con solución acuosa de ácido acético. El extracto se hizo pasar a través de un filtro de disco de 0,45 µm para eliminar las partículas finas, seguido de concentración en un evaporador. El residuo se diluyó en solución acuosa de acetonitrilo y se liofilizó para proporcionar un total 1,646 g de polvo de color blanco a marrón.

- 30 El péptido crudo obtenido se purificó separadamente seis veces sobre HPLC preparativa empleando una columna SHISEIDO CAPCELL PAK MGII (50 x 250 mm). La elución en gradiente de densidad lineal (60 minutos) para A/B: 68/32-58/42 se realizó con un caudal de 45 mL/min utilizando eluyente A: TFA 0,1% en agua y eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA sobre HPLC preparativa. El producto eluido se fraccionó en tubos de ensayo de aproximadamente 14 mL cada uno. Supervisando cada fracción sobre la HPLC, se identificaron solo las fracciones que contenían el producto. Las fracciones se reunieron y se liofilizaron para proporcionar 436,9 mg de un polvo blanco.

- 35 En AcCN-agua, 416,9 mg (343,3 µmol) de la muestra purificada obtenida y 1,430 mL (1,717 mmol equivalente) de la resina AG 1x8 AcO se añadieron a la solución.

- Mientras que se agitaba ocasionalmente de forma manual, la solución se dejó reposar durante una hora y se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE que tenía un diámetro de poro de 3 µm. El filtrado se transfirió a un frasco de recuperación y el disolvente se eliminó por destilación. A continuación, se añadieron 4 mL de ácido acético al residuo. Después de someter la mezcla a ultrasonidos durante 5 minutos con un aparato de ultrasonidos, se añadieron 16 mL de agua a la solución. A la vez que se enfriaba sobre un baño de hielo, la solución resultante de ácido acético al 20% se liofilizó para proporcionar 368,4 mg de polvo blanco.

Espectro de masas (M+H)⁺ 1214,6 (calcd. 1214,7)

Tiempo de elución sobre HPLC: 20,1 min.

- 45 Condiciones de la elución:

Columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MGII (4,6 x 100 mm)

Eluyente: Elución en gradiente de densidad lineal con eluyentes A/B = 95/5-45/55, utilizando como eluyente A: 0,1% de TFA-agua y como eluyente B: acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA (25 min)

Caudal: 1,0 mL/min.

- 50 El análisis de los aminoácidos (ácido clorhídrico al 20% que contenía 4% de ácido tioglicólico, 110°C, hidrólisis durante 24 horas; los números entre paréntesis muestran los valores teóricos): Thr 0,95 (1); Tyr 0,97 (1); Cha 1,00 (1);

Arg 0,99 (1)

Los compuestos sintetizados en los EJEMPLOS 1 a 3 se muestran en la TABLA 2 a continuación, en términos de sus estructuras, propiedades fisicoquímicas, etc.

La descripción de "Síntesis" en la tabla indica que:

- 5 los compuestos descritos en los EJEMPLOS 1-3 se sintetizaron mediante Síntesis G descrita en la columna de "Síntesis".

La descripción de "condición de HPLC" en la tabla indica que:

los compuestos descritos en los EJEMPLOS 1-3 se pueden eluir con las condiciones d, descritas en la columna "Condiciones de HPLC".

TABLA 2

Nº de compuesto	Estructura	M+H ⁺ (obs.)	M+H ⁺ (cal.)	HPLC (min.)	Condición de HPLC	Método de síntesis
903	des(1)-Ac-[D-Tyr2,Hyp3,Alb4,Thr5,Cha6,Gly7Ψ((E)CH=CH)Leu8,Arg(Me)9,Trp10]MS10	1228.4	1228.7	20.2	d	G
926	des(1)-Ac-[D-Tyr2,Hyp3,Thr5,Cha6,Gly7Ψ((E)CH=CH)Leu8,Trp10]MS10	1199.6	1199.7	20.2	d	G
927	des(1)-Ac-[D-Tyr2,Hyp3,Alb4,Thr5,Cha6,Gly7Ψ((E)CH=CH)Leu8,Trp10]MS10	1214.6	1214.7	20.1	d	G
	d:5-55% AcCN/25min caudal: 1 ml/min					
	SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MQII (4.6 x 100mm)					

EJEMPLO DE ENSAYO 1

Medición de la Actividad Agonista sometiendo a Ensayo Cambios en el Nivel de Iones de Calcio Intracelular

1) Preparación de líneas celulares de expresión estable de metastina humana y de metastina de rata

5 Líneas celulares de expresión estable de metastina humana y metastina de rata se obtuvieron transfectando el plásmido de expresión para células animales en células CHO/dhfr⁻ empleando el kit de transfección CellPfect Transfection (fabricado por GE Healthcare). En primer lugar, 240 µL de Tampón A (adjunto al kit de CellPfect Transfection) se añadieron a 9,6 µg de ADN plasmídico disuelto en 240 µL de agua destilada, seguido de agitación. Después de dejar reposar la mezcla durante 10 minutos, se añadieron 480 µL de Tampón B (adjunto al kit de CellPfect Transfection) a la mezcla que se agitó fuertemente para formar liposomas que contenían el ADN. A continuación, 4 x 10⁵ células CHO/dhfr⁻ (obtenidas a partir del ATCC) se inocularon sobre una placa Petri de 60 mm. Después de cultivar las células en medio F12 de Ham (fabricado por Nissui Seiyaku Co., Ltd.) complementado con 10% de suero de ternera fetal (fabricado por BIO WHITTAKER, Inc.) a 37°C durante 2 días en 5% de gas dióxido de carbono, se añadieron gota a gota 480 mL de los liposomas a las células sobre la placa Petri. Después de cultivar las células en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) durante 6 horas, las células se lavaron dos veces con medio F12 de Ham exento de suero y 3 mL de 15% de glicerol se añadió a las células sobre la placa Petri, seguido de un tratamiento durante 2 minutos. Las células se lavaron de nuevo dos veces con medio F12 de Ham exento de suero, seguido de incubación en medio F12 de Ham complementado con 10% de suero de ternera fetal en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) durante 15 horas. Las células se dispersaron mediante tratamiento con tripsina para recuperarlas de la placa Petri. Las células recuperadas se inocularon sobre una placa de 6 pocillos a 1,25 x 10⁴ células cada pocillo y se inició la incubación en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, fabricado por Nissui Seiyaku) que contenía 10% de suero de ternera fetal dializado (fabricado por JRH BIOSCIENCES, Inc.). Los transformantes de CHO transfectados con el plásmido se cultivaron en el medio, pero las células no transfectadas murieron gradualmente, a medida que se cambiaba el medio los Días 1 y 2 después de iniciar la incubación para eliminar las células muertas. Se aislaron aproximadamente 20 colonias de los transformantes de CHO que continuaron creciendo los Días 8 a 10 después de la incubación. A partir de las células en estas colonias, se seleccionaron células que mostraban una reactividad elevada con la metastina peptídica ligando (de aquí en adelante, denominadas simplemente cepas h175KB19 y h175KB29) para facilitar el siguiente experimento.

2) Siembra de células

30 La línea celular CHO con expresión de metastina humana (la cepa h175KB19 se describe en una sección aparte) y la línea celular CHO con expresión de metastina de rata (la cepa h175KB29 se describe en una sección aparte) se sembraron en una placa de 96 pocillos (tipo 3904, fabricada por Corning) a 3 x 10⁴ células/pocillo, seguido de incubación en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) durante 24 horas. Como medio se empleó medio MEMα (exento de ácido nucleico, fabricado por Nikken Bio Medical Laboratory) complementado con 10% de suero de ternera fetal dializado (fabricado por Thermo, MultiSer).

3) Carga de Fluo-4 NW en las células

40 En un tampón de ensayo, se preparó una 1 x solución salina equilibrada de Hank (HBSS, fabricada por GIBCO) complementada con 0,1% de BSA, HEPES 20 mM (pH 7,4, fabricada por GIBCO) y Probenecid 1 mM (fabricado por Molecular Probes). El medio en los pocillos de la placa sembrada con las células se retiró y se añadieron 100 µL de tampón de ensayo (se mantuvo caliente a 37°C) a cada pocillo. Después de cargar 10 mL del tampón de ensayo (el volumen para someter a ensayo dos placas) en una botella con mezcla de colorante Fluo-4NW (Componente A, kit de ensayo con calcio y Fluo-4 NW (paquete inicial), fabricado por Molecular Probes), la mezcla se agitó cuidadosamente para preparar la solución de carga de Fluo-4 NW. Esta solución de carga se cargó en cada pocillo con 50 µL en cada uno, y reaccionó en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) durante 30 minutos para cargar el Fluo-4 NW en las células. Posteriormente, las células se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos y después se utilizaron para el ensayo.

4) Medición de la actividad agonista

50 Para supervisar la actividad agonista de un compuesto del ensayo, el compuesto del ensayo diluido en el tampón del ensayo descrito anteriormente, se distribuyó en una placa de 96 pocillos (tipo 3363, fabricada por Corning) a 80 µL cada pocillo para preparar la placa del compuesto. La placa de células cargadas con Fluo-4 NW y la placa del compuesto se colocaron en un lector de placas por formación de imagen fluorométrica (FLIPR, fabricado por Molecular Devices) y se añadió 50 µL a cada pocillo a través de una pipeta automática en el FLIPR. La respuesta agonista cuando se estimulaba con el compuesto se vigiló a través de una cámara CCD en el FLIPR, en términos de cambios en los niveles de iones de calcio intracelular (cambios en la fluorescencia de Fluo-4 NW).

55 La actividad agonista específica de metastina humana (45-54)* se refiere al valor obtenido sustrayendo el cambio en la fluorescencia en el grupo control sin ningún aditivo, del cambio en la fluorescencia inducido por metastina (45-54). La actividad agonista específica de un compuesto del ensayo se refiere al valor obtenido sustrayendo el cambio en la fluorescencia observado en el grupo control en ausencia de ningún compuesto del ensayo, del cambio en la fluo-

rescencia observado cuando se añadía el compuesto del ensayo. El nivel de compuesto que mostraba el 50% de actividad de respuesta agonista (valor CE_{50}) se calculó a partir de la curva de dosis-respuesta. Cuando la respuesta máxima de la actividad agonista específica de la metastina humana (45-54) era del 100%, la CE_{50} se calculó sobre un compuesto del ensayo que mostraba 70% o más de actividad máxima, en comparación con la respuesta máxima.

- 5 * El péptido utilizado y sintetizado a partir de los aminoácidos 45 al 54 en la secuencia de aminoácidos de la metastina humana [metastina humana (45-54)] es el producto sintético procedente de Peptide Institute, Inc.

La actividad agonista de cada compuesto del ensayo [expresada por la actividad específica de la CE_{50} de un compuesto del ensayo basándose en la CE_{50} de la metastina (45-54)] se muestra en la TABLA 3. Los datos revelan que los compuestos de la presente invención tienen actividades agonistas excelentes sobre los receptores de la metastina.

TABLA 3

Compuesto nº	Actividad específica
903	0,4
926	0,6
927	0,5

EJEMPLO DE ENSAYO 2

- 15 Evaluación del Efecto Reductor del Nivel de Testosterona en Sangre de Derivados del Péptido de Metastina Empleando Ratitas Macho Maduras

En los derivados del péptido de metastina mostrados en las TABLAS 1 y 2, los efectos reductores del nivel de testosterona en sangre se evaluaron sobre los compuestos.

- Un derivado del péptido de metastina (de aquí en adelante denominado péptido) se disolvió en 50% de solución acuosa de DMSO (DMSO: Sigma-Aldrich, agua destilada para inyección: Otsuka Pharmaceutical) para preparar una solución de péptido con la concentración de 0,1, 0,03 o 0,01 mM. Esta solución de péptido se cargó en cinco bombas osmóticas ALZET (Modelo 2001, 0,2 mL de volumen, tasa de liberación: 0,001 mL/h, DURECT Corporation). La bomba ALZET cargada con la solución de péptido se implantó subcutáneamente en 5 ratas macho CD(SD)IGS con una edad de 9 semanas después del nacimiento (Charles River Japan, Inc.), en la espalda con anestesia de éter, una bomba/animal. Como control negativo, se cargó una solución acuosa de DMSO al 50% en 5 bombas osmóticas ALZET las cuales se implantaron de forma similar en 5 ratas macho CD(SD)IGS (Charles River Japan, Inc.), respectivamente. Estas ratas fueron alimentadas durante 6 días con condiciones de alimentación normales. Después de pesarlo, el animal fue decapitado para recoger la sangre. A continuación, se añadieron 0,03 mL de solución de aptinina/mL de sangre (Trasylol, Bayer) que contenía 0,1 g/mL de EDTA.2Na a la sangre, el plasma se separó y se recuperó por centrifugación a 1.800 x g durante 30 minutos. A partir del plasma obtenido, se aplicaron 0,05 mL a un radioinmunoensayo (DPC.Total Testosterone Kit, Diagnostic Products Corporation) para medir el nivel de testosterona plasmática en cada rata. Los péptidos se muestran en la TABLA 4, cuando el número de ratas que mostraba un nivel de testosterona inferior al límite medido (0,04 ng/mL de nivel plasmático) en el radioinmunoensayo era 3 o superior en las 5 ratas que recibieron los péptidos.

TABLA 4

Compuesto nº
903
926
927

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- De acuerdo con la presente invención, se proporcionan derivados estables de metastina que tienen excelentes propiedades biológicas (una actividad supresora de la metástasis del cáncer, una actividad supresora del crecimiento del cáncer, una actividad estimulante de la secreción de hormona gonadotrófica, una actividad estimulante de la secreción de hormonas sexuales, una actividad supresora de la secreción de hormona gonadotrófica, una actividad supresora de la secreción de hormonas sexuales, etc.).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

5 <120> Derivados de metastina y uso de los mismos

<130> PCT07-0053

<150> JP2007-221911

10 <151> 28-08-2007

<150> JP2007-021387

<151> 31-01-2007

15 <150> JP2006-290536

<151> 25-10-2006

<160> 22

20 <210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50

30

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35

<400> 2

ggtactttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60

gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120

gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tc 162

40 <210> 3

<211> 152

<212> PRT

<213> Mus musculus

45 <400> 3

ES 2 539 430 T3

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
5 10 15
Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
20 25 30
Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
35 40 45
Ala Lys Val Ala Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu
50 55 60
Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro
65 70 75 80
Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro Cys Pro Pro Val
85 90 95
Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala Ser Arg Ser Arg
100 105 110
Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
115 120 125
Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg
130 135 140
Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
145 150

5 <210> 4
<211> 456
<212> DNA
<213> Mus musculus

10 <400> 4
atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
ctgccccttc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120
gtcgccacct atggggagacc gctggcaaaa gtgaagcctg gatccacagg ccagcagtcc 180
ggaccccagg aactcgtaa tgcctgggaa aaggaatcgc ggtatgcaga gagcaagcct 240
gggtctgcag ggctgcgcgc tcgtaggtcg tcgcatgcc cgccggttga gggccccgcg 300
gggcccagc ggcccctgtg tgcctcccgc agtcgcctga tccctgcgcc ccgcggagcg 360
gtgctggtgc agcgggagaa ggacctgtcc acctacaact ggaactcctt cggcctgcgc 420
tacggcagga ggcaggcggc gcgggcagca cggggc 456

15 <210> 5
<211> 156
<212> PRT
<213> Mus musculus

ES 2 539 430 T3

<400> 5

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys

5

10

15

Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser

20

25

30

Trp Gln Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu

35

40

45

Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Lys Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser

50

55

60

Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala

65

70

75

80

Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro

85

90

95

Cys Pro Pro Val Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala

100

105

110

Ser Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln

115

120

125

Arg Glu Lys Asp Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg

130

135

140

Tyr Gly Arg Arg Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly

5

145

150

155

<210> 6

<211> 468

<212> DNA

10 <213> Mus musculus

<400> 6

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60

ctgccccttc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120

gtcgccacct atggggagcc gctggcaaaa gtggcacctt tggatgaagcc tggatccaca 180

ggccagcagt ccggacccca ggaactcgtt aatgcctggg aaaaggaatc gcggtatgca 240

gagagcaagc ctgggtctgc agggctgcgc gctcgttaggt cgctgccatg cccgccggtt 300

15

gagggccccc cggggcgcca gcggcccctg tgtgcctccc gcagtcgcct gatccctgcg 360

ccccgcggag cgggtctggt gcagcgggag aaggacctgt ccacctacaa ctggaactcc 420

ttcggcctgc gctacggcag gaggcaggcg gcgcgggcag cacggggc 468

<210> 7

<211> 130

20 <212> PRT

ES 2 539 430 T3

<213> Rattus sp.

<400> 7

Met Thr Ser Leu Ala Ser Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala
5 10 15
Ser Phe Gly Glu Pro Leu Ala Lys Met Ala Pro Val Val Asn Pro Glu
20 25 30
Pro Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Gln
35 40 45
Lys Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Leu Arg
50 55 60
Ala Arg Arg Thr Ser Pro Cys Pro Pro Val Glu Asn Pro Thr Gly His
65 70 75 80
Gln Arg Pro Pro Cys Ala Thr Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg
85 90 95
Gly Ser Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Met Ser Ala Tyr Asn Trp
100 105 110
Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg Gln Val Ala Arg Ala Ala
115 120 125
Arg Gly

5 130

<210> 8

<211> 390

<212> DNA

10 <213> Rattus sp.

<400> 8

atgacctgc tggttcttg gcagctgctg cttctctct gtgtggcctc ttttggggag 60
ccactggcaa aaatggcacc tgttgtgaac cctgaaccca caggccaaca gtccggaccc 120
caggaactcg ttaatgcctg gcaaaagggc ccgcggtatg cagagagcaa gcctggggct 180
gcaggactgc gcgtcgccg aacatcgcca tgcccgcggc tggagaaccc cacggggcac 240
cagcgggccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgccccgcgg atcgggtgctg 300
gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact cttttggcct gcgctacggc 360
aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc 390

15

<210> 9

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 9

ES 2 539 430 T3

Met	His	Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Asn	Ala	Ser	Trp	Gly	Ala	Pro
			5					10					15		
Ala	Asn	Ala	Ser	Gly	Cys	Pro	Gly	Cys	Gly	Ala	Asn	Ala	Ser	Asp	Gly
			20					25					30		
Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Arg	Ala	Val	Asp	Ala	Trp	Leu	Val	Pro	Leu	Phe
			35					40					45		
Phe	Ala	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Ile
			50					55					60		
Tyr	Val	Ile	Cys	Arg	His	Lys	Pro	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Asn	Phe	Tyr
			65					70					75		80
Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Cys	Cys	Val
							85						90		95
Pro	Phe	Thr	Ala	Leu	Leu	Tyr	Pro	Leu	Pro	Gly	Trp	Val	Leu	Gly	Asp

ES 2 539 430 T3

100	105	110
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala		
115	120	125
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr		
130	135	140
Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu		
145	150	155
Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro		
165	170	175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser		
180	185	190
Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn		
195	200	205
Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr		
210	215	220
Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro		
225	230	235
Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala		
245	250	255
Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe		
260	265	270
Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu		
275	280	285
Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu		
290	295	300
Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro		
305	310	315
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg		
325	330	335
Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly		
340	345	350

ES 2 539 430 T3

Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser

355

360

365

His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala

370

375

380

Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu

385

390

395

<210> 10

<211> 1194

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

atgcacaccg tggctacgtc cggacccaac gcgtcctggg gggcaccggc caacgcctcc 60
ggctgccccg gctgtggcgc caacgcctcg gacggcccag tcccttcgcc gcgggcccgtg 120
gacgcctggc tcgtgccgct cttcttcgcg gcgtgatgc tgctgggcct ggtggggaac 180
tcgtgggtca tctacgtcat ctgccgccac aagccgatgc ggaccgtgac caacttctac 240
atcgccaacc tgggcgccac ggacgtgacc ttcctcctgt gctgcgtccc cttcacggcc 300
ctgctgtacc cgctgcccgg ctgggtgctg ggcgacttca tgtgcaagtt cgtcaactac 360
atccagcagg tctcggtgca ggccacgtgt gccactctga ccgccatgag tgtggaccgc 420
tggtacgtga cgggtttccc gttgcgcgcc ctgcaccgcc gcacgccccg cctggcgctg 480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtaggctct gcggcggtgt ctgcgccggt gctcgccctg 540
caccgcctgt caccggggcc gcgcgcctac tgcagtgagg ccttccccag ccgcgccctg 600
gagcgcgcct tcgcaactgta caacctgctg gcgtgtgacc tgctgccgct gctcgccacc 660
tgcgccctgt atcgggccat gctgcgccac ctgggcccgg tcgccgtgcg ccccgcgccc 720
gccgatagcg ccttcgaggg gcaggtgctg gcagagcgcg caggcgccgt gcgggccaag 780
gtctcgcggc tgggtggcggc cgtggtcctg ctcttcgccg cctgctgggg ccccatccag 840
ctgttcctgg tgctgcaggg gctgggcccc gcgggctcct ggcacccacg cagctacgcc 900
gcctacgcgc ttaagacctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactccgc gctgaaccgc 960
ctgctctacg ccttcctggg ctgcgacttc cgacaggcct tccgccgct ctgcccctgc 1020
gcgccgcgcc gcccccgccg cccccgccgg cccggaccct cggaccccgc agccccacac 1080
gcggagctgc accgcctggg gtcccacccg gcccccgcca gggcgagaa gccagggagc 1140
agtgggctgg ccgcgcgcgg gctgtgcgtc ctgggggagg acaacgcccc tctc 1194

```

<210> 11

<211> 396

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 11

ES 2 539 430 T3

Met	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Val	Ser	Trp	Trp	Ala	Pro
			5					10						15	
Ser	Asn	Ala	Ser	Gly	Cys	Pro	Gly	Cys	Gly	Val	Asn	Ala	Ser	Asp	Gly
		20					25						30		
Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Asp	Ala	Trp	Leu	Val	Pro	Leu	Phe
		35				40					45				
Phe	Ala	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Ile
	50				55					60					
Phe	Val	Ile	Cys	Arg	His	Lys	His	Met	Gln	Thr	Val	Thr	Asn	Phe	Tyr
65				70					75					80	
Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Cys	Cys	Val
		85						90					95		
Pro	Phe	Thr	Ala	Leu	Leu	Tyr	Pro	Leu	Pro	Thr	Trp	Val	Leu	Gly	Asp
		100					105						110		
Phe	Met	Cys	Lys	Phe	Val	Asn	Tyr	Ile	Gln	Gln	Val	Ser	Val	Gln	Ala
	115					120						125			
Thr	Cys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Met	Ser	Val	Asp	Arg	Trp	Tyr	Val	Thr
	130					135					140				
Val	Phe	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Leu	Ala	Leu
145				150					155					160	
Thr	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Trp	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Pro
			165					170						175	

ES 2 539 430 T3

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser
 180 185 190
 Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
 210 215 220
 Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala
 245 250 255
 Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
 260 265 270
 Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
 275 280 285
 Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
 305 310 315 320
 Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg
 325 330 335
 Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala
 340 345 350
 His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala
 355 360 365
 His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg
 370 375 380
 Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu
 385 390 395

<210> 12
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

<400> 12

ES 2 539 430 T3

```

atggccgcag aggcgacgtt gggtcogaac gtgagctggt gggctccgtc caacgcttcg    60
ggatgcccgg gctgcggtgt caatgcctcg gatggcccag gctccgcgcc aaggcccctg    120
gatgcctggc tgggtcccct gtttttcget gccctaattg tgctggggct agtcgggaac    180
tactggtca tcttcgttat ctgccgccac aagcacatgc agaccgtcac caatttctac    240
atcgctaacc tggcggccac agatgtcact ttccttctgt gctgcgtacc cttcaccgcg    300
ctcctctatc cgctgcccac ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac    360
atccagcagg tctcggtgca agccacatgt gccactttga cagccatgag tgtggaccgc    420
tggtacgtga ctgtgttccc gctgcgtgca cttcaccgcc gcactccgcg cctggccctg    480
actgtcagcc ttagcatctg ggtgggttcc gcagctgttt ccgccccggt gctggctctg    540
caccgcctgt cggcggggcc tcacacctac tgcagtgagg cgtttcccag ccgtgccctg    600
gagcgcgctt tcgcgtcta caacctgctg gccctatacc tgctgccgct gctgccacc    660
tgccctgtc acggtgccat gctgcgccac ctgggccgcg ccgctgtacg cccgcacccc    720
actgatggcg ccctgcaggg gcagctgcta gcacagcgcg ctggagcagt gcgcaccaag    780
gtctcccggc tggtgccgc tgcgtcctg ctcttcgccg cctgctgggg ccgatccag    840
ctgttcctgg tgettcaagc cctggggccc tcgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc    900
gcctacgcgc tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaattctgc gctcaaccgc    960
ctgctctatg ccttcctggg tccccacttc agacaggcct tctgccgctg gtgcccctgc   1020
ggcccgaac gccagcgtcg gcccacgcg tcagcgcact cggaccgagc cgcaccccat   1080
agtgtccgc acagccgggc tgcgcacct gtccgggtca ggacccccga gcctgggaac   1140
cctgtggtgc gctgccctc tgttcaggat gaacacactg cccactc                   1188

```

<210> 13

<211> 396

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

5

ES 2 539 430 T3

Met Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ala Pro Asn Val Thr Trp Trp Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Asp
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
 35 40 45
 Phe Ala Thr Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
 50 55 60
 Tyr Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr
 65 70 75 80
 Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
 85 90 95
 Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Ala Trp Val Leu Gly Asp
 100 105 110
 Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala
 115 120 125
 Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
 145 150 155 160
 Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
 165 170 175
 Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Thr Tyr Cys Ser
 180 185 190
 Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
 210 215 220
 Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala

ES 2 539 430 T3

	245	250	255
Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe			
	260	265	270
Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu			
	275	280	285
Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Val			
	290	295	300
Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro			
305	310	315	320
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg			
	325	330	335
Val Cys Pro Cys Cys Arg Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Thr Ser Ala			
	340	345	350
His Ser Asp Arg Ala Ala Thr His Thr Val Pro His Ser Arg Ala Ala			
	355	360	365
His Pro Val Arg Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg			
	370	375	380
Ser Pro Cys Ala Gln Ser Glu Arg Thr Ala Ser Leu			
385	390	395	

<210> 14
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 14

atggccaccg aggcgacatt ggctcccaat gtgacctggt gggctccgtc caacgcttca	60
ggatgcccag gctgcggtgt caacgcctcg gatgaccag gctctgcgcc aaggcccctg	120
gatgcctggc tggttccctt gtttttcgct acactcatgt tgcttgggct ggtcggaac	180
tcattggtca tctacgttat ctgccgccac aagcacatgc agacagttac caacttctac	240
atcgctaacc tggctgccac agacgtcact ttcctactgt gctgcgtgcc cttcaccgca	300

ES 2 539 430 T3

ctcctctacc cgctgcccgc ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac 360
atccagcagg tctcgggtgca agccacatgt gccactctga cggccatgag tgtggaccgc 420
tggtatgtga ctgtgttccc gctgcgtgca cttcacgcgc gcactccgcg cctggccctg 480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtgggggtca gcagctgtgt ccgccccggt gctggccctg 540
caccgcctgt cgccagggcc tcgcacctac tgcagcgagg cgtttccag ccgcgccctg 600
gagcgcgcct tcgcgctcta caacctgctg gctctatatc tgcctccgct gctcgccacc 660
tgcgcctgct acggcgccat gctgcgccac ctggggcgtg cggctgtacg ccccgacccc 720
actgacggcg ccctgcaggg acagctgcta gcacagcgcg ccggagcagt gcgcaccaag 780
gtctcccggc tgggtggccgc tgtcgtcctg ctcttcgccg cctgctgggg cccgatccag 840
ctgttccctg tgcttcaagc cctggggccc tcgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc 900
gcctacgcgg tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactcggc gctcaatccg 960
ctgctctatg ccttcctggg ttacaccttc agacaggcct tctgccgct gtgcccctgc 1020
tgccggcaac gccagcgccg gcccacacg tcagcgcact cggaccgagc tgcaactcac 1080
actgtgccgc acagccgtgc tgcgcacct gtgcggatca ggagcccga gcctgggaac 1140
cctgtggtgc gctcgccctg cgtcagagt gaacgactg cctcactc 1188

<210> 15
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> el C-terminal del polipéptido es forma amida (-CONH2)
<400> 15

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 10 15

15 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> el C-terminal del polipéptido es forma amida (-CONH2)

<400> 16

25 Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 10

<210> 17
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> el C-terminal del polipéptido es forma amida (-CONH2)

<400> 17

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 9

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> el C-terminal del polipéptido es forma amida (-CONH2)

<400> 18

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 8

<210> 19
<211> 45
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19

aaggacctgc cgaactacaa ctggaactcc ttcggcctgc gcttc 45

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20

tacaactgga actccttcgg cctgcgcttc 30

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21

aactggaact ccttcggcct gcgcttc 27

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22

tggaactcct tcggcctgcg cttc 24

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado a partir de:
Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg(Me)Trp-NH₂,
Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂ y
- 5 Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂,
o una sal de los mismos,
en donde Alb significa albiziina, ácido 2-amino-3-ureidopropiónico y
GlyΨ((E)CH=CH)Leu significa que -CONH- entre Gly y Leu está sustituido con un alqueno de tipo (E).
2. El compuesto según la reivindicación 1, que es
- 10 Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg(Me)Trp-NH₂
o una sal del mismo.
3. El compuesto según la reivindicación 1, que es
Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂
o una sal del mismo.
- 15 4. El compuesto según la reivindicación 1, que es
Ac-D-Tyr-Hyp-Alb-Thr-Cha-GlyΨ((E)CH=CH)Leu-Arg-Trp-NH₂
o una sal del mismo.
5. Un medicamento que comprende el compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo.
6. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso en terapia.
- 20 7. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso como un agente de supresión de la
metástasis de un cáncer o como un agente de supresión del crecimiento de un cáncer.
8. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso como un agente para prevenir/tratar
un cáncer.
9. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso como un agente para regular a la
25 baja una hormona gonadotrófica o una hormona sexual.
10. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso como un agente para prevenir/tratar
un cáncer dependiente de hormonas.