

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 253**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/685** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2016 PCT/IB2016/052416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16729054 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3288967**

54 Título: **Compuesto farmacéutico**

30 Prioridad:

**28.04.2015 EP 15165537**

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

**25.06.2020**

73 Titular/es:

**VALLAURIX PTE. LTD. (100.0%)  
15 Hoe Chiang Road no. 12-02 Tower Fifteen  
089316 Singapore, SG**

72 Inventor/es:

**WOLGEN, PHILIPPE y  
CALLENS, ROLAND**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 769 253 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

Compuesto farmacéutico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un compuesto, un compuesto para su uso, el uso de un compuesto para la fabricación, un método de preparación de un compuesto, un método de preparación de un mamífero mediante la terapia con un compuesto y un método de preparación de un análogo alfa-MSH.

Antecedentes de la invención.

10 Las melanocortinas incluyen una familia de hormonas peptídicas que inducen la pigmentación por interacción con el receptor de melanocortina-1 (MC1R) en la epidermis. La hormona estimulante de alfa-melanocitos (alfa-MSH) es una hormona pigmentaria primaria que se libera de la parte media de la glándula pituitaria en algunos animales no humanos y de los queratinocitos expuestos a los rayos UV en la piel humana. Este péptido de 13 aminoácidos está representado por la estructura de fórmula Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH<sub>2</sub>. Alfa-MSH se une a MC1R e induce la transducción de señal mediada por AMP cíclica que conduce a la síntesis de polímeros de melanina a partir de precursores de DOPA. Se han descrito diversos análogos de alfa-MSH en los documentos WO2008025094 y WO2012107592. Holder et al (Peptides, 24:73-82, 2003) describen tetrapéptidos derivados de alfa-MSH.

20 Se pueden expresar dos tipos de melanina en humanos, melanina y feomelanina. Se cree que el pigmento negro amarronado melanina tiene propiedades fotoprotectoras, ya que es resistente a la fotodegradación y tiene la capacidad de extinguir los radicales reactivos de oxígeno. La feomelanina es un pigmento rojizo que contiene azufre y a menudo se expresa en sujetos humanos de piel clara que informan una respuesta de bronceado pobre a la luz solar y generalmente se cree que tienen un mayor riesgo de desarrollar cánceres de piel melanoma y no melanoma. La unión de alfa-MSH a MC1R estimula aún más la eumelanogénesis mediante la activación de ciclos de adenilato.

25 Si bien se han realizado avances en el tratamiento de la piel y otras enfermedades, sigue existiendo la necesidad de más y/o mejores opciones en la técnica para compuestos y tratamientos médicos.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que las modificaciones al análogo alfa-MSH proporcionan ciertos beneficios.

30 Según un aspecto de la invención, sorprendentemente se ha encontrado que el compuesto Ac-Nle-Glu-His-D-Phe-X-Trp-NH<sub>2</sub>, en el que X es homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene uno o más beneficios, que incluyen costes de producción reducidos y/o preparación eficiente, en particular el alto rendimiento y/o el alto nivel de pureza, actividad mejorada, mayor eficacia y/o mayor potencia, y/o menos susceptibilidad a la degradación. El compuesto es un hexapéptido y un análogo de alfa-MSH y proporciona beneficios adicionales, particularmente en base al peso.

35 En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto con estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His - D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto con estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His - DPhe - norArg - Trp - NH<sub>2</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización adicional, el compuesto de la invención es para uso como medicamento. Preferiblemente, el compuesto de la invención es para uso en el tratamiento terapéutico de un trastorno de la piel. Preferiblemente, el compuesto de la invención es para uso en el tratamiento de trastornos de pigmentación, fotodermatitis, prevención de cáncer de piel y/o reparación de ADN en células de la piel. Preferiblemente, el compuesto de la invención se aplica por vía tópica a la piel.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto según la invención para la fabricación de un medicamento.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación del compuesto Ac - Nle - Glu - His - D-phe - X - Trp - NH<sub>2</sub>, en el que X se selecciona de homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por

- proporcionar el tripéptido D-Phe - X - Trp (4-6);

- acoplar el tripéptido (4-6) D-Phe - X - Trp con histidina (3); y

50 - acoplar el dipéptido Nle-Glu (1-2) con el tetrapéptido His - D-Phe - X - Trp (3-6).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método en el que el tripéptido D-Phe - homoArg - Trp (4-6) se prepara a partir del tripéptido D-Phe-Lys-Trp convirtiendo la función amino libre de la cadena lateral de lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de un mamífero mediante terapia mediante la administración de un compuesto con la estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His - D-Phe - X - Trp - NH<sub>2</sub>, en el que X se selecciona de homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de un análogo alfa-MSH que comprende un grupo homoArg introduciendo primero un grupo lisina durante la preparación del análogo y convirtiendo posteriormente la función amino libre de la cadena lateral de lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT) para generar un grupo homoArg.

Se ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de la presente invención proporciona resultados beneficiosos en pruebas farmacéuticas in vitro y/o in vivo relacionadas con la afinidad, potencia y/o eficacia de unión a MC1R en particular para enfermedades asociadas a MC1R. Además, se ha encontrado que el compuesto de la invención se puede sintetizar de manera segura y eficiente, particularmente con un alto rendimiento.

15 Descripción detallada de la invención

Para el propósito de la invención, el término "análogo de alfa-MSH" al que se hace referencia en este documento se define como un derivado de alfa-MSH que exhibe actividad agonista para el receptor de melanocortina-1 (MC1R), el receptor al que alfa-MSH se une para iniciar la producción de melanina dentro de un melanocito.

20 Las siguientes abreviaturas se han usado en esta memoria descriptiva Arg - arginina, D-Phe -isómero D de fenilalanina; Glu - ácido glutámico; Gly - Glicina; His - Histidina; HomoArg - homoarginina (una unidad adicional -CH<sub>2</sub>- en la cadena de alquilo que la Arg); norArg - norarginina (una unidad menos de CH<sub>2</sub> en la cadena de alquilo que la Arg); Lys - Lisina; Met - Metionina; Nle - Norleucina; Phe-fenilalanina; Ser - Serina; Trp - Triptófano; y Tyr - Tirosina. El prefijo "D" antes del aminoácido designa la configuración del isómero D. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los aminoácidos están en la configuración de isómero L.

25 Todos los péptidos y derivados de péptidos se escriben con el extremo amino terminal acilado a la izquierda y el carboxilo terminal amidado a la derecha. Como se entenderá, el extremo amino terminal acilado puede ser reemplazado por otro grupo según la invención, pero la orientación de los péptidos y derivados de péptidos sigue siendo la misma. Siguiendo una convención común, el primer aminoácido a la izquierda está ubicado en la posición 1, por ejemplo, Nle (1), lo que indica que Nle está ubicado en el extremo N terminal (a la izquierda).

30 En esta memoria descriptiva, homoArg y norArg se puede denominar aminoácidos aunque sean estrictamente derivados de aminoácidos. Del mismo modo, los compuestos que comprenden grupos de amonio cuaternario, homoArg, norArg y/u otros derivados de aminoácidos se pueden denominar péptidos aunque sean estrictamente derivados de péptidos. De acuerdo con lo anterior, el experto comprenderá que la referencia en este documento a las moléculas de péptidos (incluyendo los hexapéptidos y los análogos de alfa-MSH) incluye referencias a  
35 derivados de los mismos.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

40 La presente invención se refiere a un compuesto análogo de hexapéptido alfa-MSH con estructura de fórmula Ac-Nle-Glu-His-D-Phe-X-Trp-NH<sub>2</sub>, en la X se selecciona de homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con un aspecto de la invención, homoArg o norArg reemplaza a Arg en el esqueleto del análogo alfa-MSH para obtener beneficios adicionales, incluyendo una mayor eficacia y proporciona una preparación eficiente.

45 El compuesto de la invención también puede estar presente como una sal farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del entorno, ciertos aminoácidos pueden actuar como una base y atraer un protón, lo que resulta en una carga en el péptido, como es bien conocido en la técnica. De acuerdo con lo anterior, el compuesto de la invención puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. El compuesto puede ser un catión y combinarse con un contraión cargado negativamente. Ejemplos de cationes aceptables farmacéuticamente X<sup>+</sup> que  
50 pueden estar asociados con el compuesto de la invención son iones de H<sup>+</sup> (ion hidrógeno), sodio, potasio y calcio, preferiblemente H<sup>+</sup>. Preferiblemente, el contraión es un anión Y<sup>-</sup> aceptable farmacéuticamente cargado negativamente. Se entenderá que Y<sup>-</sup> también puede tener una carga negativa múltiple, en cuyo caso un anión puede combinarse con múltiples compuestos cargados positivamente. Ejemplos de aniones Y<sup>-</sup> aceptables farmacéuticamente se derivan de un ácido orgánico o inorgánico tal como HCl, HBr, HI, H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido maleico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico,  
55 ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico. Opcionalmente, estos compuestos

- están halogenados, tal como por ejemplo el tri-fluoroacetato. Preferiblemente, Y es acetato, cloruro o sulfato y más preferiblemente acetato. Una sal preferida es la sal de ácido acético. De acuerdo con la invención, el compuesto puede estar presente como una sal; la conversión con una sal es un etapa estándar en la técnica y es opcional en la presente invención, mientras que se puede llevar a cabo durante o después de la preparación del compuesto.
- 5 El compuesto de la presente invención se puede usar para indicaciones médicas, como medicamento. Se entenderá que las indicaciones médicas de la invención son de naturaleza terapéutica. Para los fines de la invención, la prevención de una enfermedad se considera cubierta por el término tratamiento.
- 10 El compuesto de la invención se puede usar beneficiosamente para el tratamiento y/o prevención de diversas indicaciones médicas, preferiblemente indicaciones médicas de naturaleza terapéutica exclusiva. Preferiblemente, la referencia al uso del compuesto de la invención incluye no solo sales aceptables farmacéuticamente, sino también preferiblemente el uso de profármacos, estereoisómeros, tautómeros, hidratos, hidruros y/o solvatos de los compuestos de la invención.
- 15 El compuesto de la invención se puede usar en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las indicaciones y administraciones indicadas en esta memoria descriptiva.
- Preferiblemente, los compuestos de la invención se usan para el tratamiento de enfermedades en las que los compuestos, por asociación, aumentan beneficiosamente la expresión de MC1R, como un objetivo farmacológico para las enfermedades. Ejemplos de tales enfermedades son trastornos de pigmentación, fotodermatosis, cáncer de piel y/o reparación de ADN en las células de la piel (después/debido a la exposición a los rayos UV).
- 20 En un aspecto, el compuesto de la invención se usa para el tratamiento de trastornos de pigmentación (o pigmentación de la piel). Tal trastorno puede ser hiperpigmentación, pero en este caso son particularmente importantes los trastornos de hipopigmentación. Se ha encontrado que el compuesto de la invención puede inducir melanogénesis y son útiles para inducir melanogénesis terapéutica.
- 25 En un aspecto, la invención se refiere a inducir melanogénesis en la piel como tratamiento para trastornos de pigmentación con un compuesto según la invención. El término "melanogénesis", como se usa en este documento, se define como la capacidad de un sujeto para producir melanina mediante células productoras de melanina llamadas melanocitos, con fines terapéuticos. Ejemplos de producir melanogénesis terapéutica son proteger la piel del daño por irradiación UV, por ejemplo, evitando que la piel desarrolle arrugas, quemaduras solares y/o cáncer.
- 30 Un ejemplo importante de un trastorno de hipopigmentación es el vitíligo. El vitíligo es una afección crónica de la piel que se caracteriza por la pérdida de pigmento, incluyendo la melanina, que da como resultado una piel irregular pálida y despigmentada que tiene un color y aspecto diferentes y contrasta con el tejido de la piel circundante, no afectado, pigmentado y de color más oscuro. En un aspecto, la presente invención está dirigida al tratamiento del vitíligo, en particular en combinación con el tratamiento con luz UV. El compuesto de la invención se prefiere para su uso en el tratamiento del vitíligo, particularmente para la repigmentación de lesiones vitiliginosas y, por lo tanto, reduce el contraste entre el tejido vitiliginoso y el tejido de la piel circundante.
- 35 Las fotodermatosis son enfermedades de la piel que están asociadas con la fotosensibilidad de la piel a la irradiación UV y se pueden clasificar en 5 categorías generales: fotodermatosis idiopáticas (que incluyen erupción de luz polimórfica (PLE), prurigo actínico, hydroa vacciniforme, dermatitis actínica crónica y urticaria solar-SU); fotodermatosis que son secundarias a agentes exógenos (incluyendo reacciones fototóxicas y fotoalérgicas); fotodermatosis secundarias a agentes endógenos (principalmente las porfirias, incluyendo la fotoporfiria eritropoyética-EPP); dermatosis fotoexacerbadas (incluyendo enfermedades autoinmunes, afecciones infecciosas y deficiencias nutricionales); y genodermatosis.
- 40 En un aspecto, la presente invención está dirigida al tratamiento de las fotodermatosis. El compuesto de la presente invención se prefiere para su uso en el tratamiento de fotodermatosis, particularmente para EPP, PLE y SU, más particularmente para EPP.
- 45 El cáncer de piel incluye melanoma y cáncer no melanoma. Generalmente, los niveles más altos de melanina en la piel se consideran una medida para la prevención del cáncer de piel. En un aspecto, la presente invención se dirige al uso del compuesto de la invención para la prevención del cáncer. El compuesto de la invención se prefiere para su uso en la prevención del cáncer, particularmente cáncer de piel que incluye melanoma y particularmente no melanoma. Si bien el público en general se beneficiará de la prevención del cáncer de piel a través de la invención, ciertos grupos de pacientes se beneficiarán en particular del uso del compuesto de la invención, incluyendo los pacientes inmunocomprometidos (particularmente pacientes con HIV-AIDS, pacientes con trasplante alogénico, esto es, el receptor recibe el trasplante de otro sujeto, y/o pacientes con medicación inmunosupresora), sujetos humanos que tienen uno o más alelos variantes de MC1R asociados con pérdida o
- 50 disminución de la función del receptor (preferiblemente seleccionados de Val60LEU (V60L), Asp84Glu (D84E), Val92Met (V92M), Arg142His (R142H), Arg151Cys (R151C), Arg160Trp (R160W) y Asp294His (D294H)).
- 55

Se entiende que la irradiación UV puede causar daño al ADN, particularmente al ADN de las células dérmicas (de la piel). En un aspecto, la presente invención se dirige a la reparación del ADN. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se dirige al compuesto de la invención para su uso en la reparación del ADN, preferiblemente en la piel, particularmente después de la irradiación UV de la piel.

- 5 Preferiblemente, el compuesto de la invención se usa en un sujeto en el que el sujeto es preferiblemente un mamífero, preferiblemente roedores y/o humanos, más preferiblemente un sujeto humano.

En un aspecto de la invención, el compuesto de la invención se combina con luz UV para el tratamiento del sujeto.

- 10 El compuesto de la invención se puede administrar a un sujeto usando una variedad de técnicas de entrega o administración conocidas en la técnica. El modo de administración dependerá del sujeto que se va a tratar y del compuesto seleccionado. En diversos aspectos, el compuesto se puede administrar por vía oral (o enteral), parenteral o tópica (preferiblemente a la piel).

El término "oral" se usa en este documento para abarcar la administración del compuesto a través del tracto digestivo.

- 15 El término "parenteral" se usa en este documento para abarcar cualquier vía de administración, que no sea la administración oral, mediante la cual el compuesto se introduce en la circulación sistémica. En general, la administración parenteral se puede lograr mediante administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, ocular, inhalable, nasal, rectal, vaginal, transdérmica, bucal, sublingual o mucosa.

- 20 El término "mucosa", como se usa en este documento, abarca la administración del compuesto mediante métodos que emplean la mucosa (membranas mucosas) del cuerpo humano, tales como, pero sin limitación, bucal, intranasal, gingival, vaginal, sublingual, pulmonar o tejido rectal.

El término "transdérmico", como se usa en este documento, abarca la administración del compuesto que se aplica a la piel y posteriormente pasa a través de la piel hacia la circulación sistémica, tal como, pero sin limitación, formulaciones transdérmicas, parches bucales, parches cutáneos, o parches transdérmicos.

- 25 El término "tópico" como se usa en este documento abarca la administración a la piel y puede incluir la aplicación de preparaciones tales como cremas, geles o soluciones en la piel, los ojos o las áreas de la mucosa para un efecto local. Los compuestos de la invención se pueden incorporar en una composición tópica para administrarse en la piel. En un aspecto, las composiciones tópicas tienen eficacia local en la piel en el lugar de aplicación y, de este modo, se administra localmente. En otro aspecto, la composición tópica tiene una eficacia sistémica que requiere que el compuesto migre transdérmicamente (a través de la piel) al torrente sanguíneo dando como resultado una exposición sistémica al compuesto y, de este modo, se administra transdérmicamente.

Otras rutas de administración preferidas que pueden lograr la exposición sistémica a los compuestos son las subcutáneas ("debajo de la piel") e intramuscular ("en el músculo").

- 35 En un aspecto, el compuesto de la invención se administra por vía tópica a la piel. De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a administrar el compuesto de la invención a la piel de un sujeto. En otro aspecto, el compuesto de la invención se administra parenteralmente a la piel. De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a administrar el compuesto de la invención a través de la piel de un sujeto.

- 40 Preferiblemente, el compuesto de la invención se formula en una composición. La composición es preferiblemente una composición farmacéutica. La composición comprende preferiblemente al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable además del compuesto de la invención. Ejemplos de tales ingredientes aceptables farmacéuticamente son portadores, polímeros, espesantes, diluyentes, cargas, soluciones reguladoras, conservantes y agentes con actividad de superficie.

- 45 En un aspecto, la composición es una formulación de liberación controlada, que da como resultado una exposición más prolongada y/o más controlada del cuerpo al compuesto. La composición puede ser un implante. En una realización preferida, el compuesto se administra en una formulación de implante de liberación prolongada tal como se describe en el documento WO2006/012667.

- 50 El compuesto de la invención se prepara preferiblemente como se indica a continuación, aunque la persona experta apreciará revisar la memoria descriptiva de que podrían emplearse modificaciones de los presentes métodos que también están cubiertos por la invención reivindicada actualmente. Según un método preferido, el compuesto de la invención se prepara mediante síntesis de péptidos en fase líquida o en fase sólida, preferiblemente seguido de purificación cromatográfica y preferiblemente por liofilización.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la preparación de Ac - Nle - Glu - His - D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub>, por:

Etapas 1: proporcionar el tripéptido D-Phe - X - Trp (4-6), en el que X se selecciona de homoArg o norArg;

Etapa 2: acoplar el tripéptido (4-6) D-Phe - X - Trp con histidina (3); y

Etapa 3: acoplar el dipéptido Nle-Glu (1-2) con el tetrapéptido His - D-Phe - X - Trp (3-6).

Preferiblemente, el compuesto se purifica (etapa 4); preferiblemente, el compuesto se concentra (etapa 5); y preferiblemente, el compuesto se liofiliza (etapa 6).

- 5 Específicamente, las etapas de síntesis de los compuestos de la invención que comprenden Ac-Nle - Glu - His - D-Phe -X - Trp-NH<sub>2</sub>, en el que X se selecciona de homoArg o norArg, incluyen las siguientes etapas preferidas:

Etapa 1: desprotección del tripéptido (4-6) por hidrogenólisis con un catalizador de Pd/C en etanol;

Etapa 2a: tripéptido desprotegido (4-6) acoplado a (Fmoc) y (Trt) histidina protegida (3) con HBTU/DIPEA en una mezcla de diclorometano dimetilformamida;

- 10 Etapa 2b: Destritilación del péptido protegido (3-6) en una mezcla HOAc/H<sub>2</sub>O;

Etapa 2c: Escisión del grupo protector Fmoc del péptido (3-6) en una mezcla de H<sub>2</sub>O/metanol y dioxano con NaOH;

Etapa 3: Acoplamiento del dipéptido (1-2) Nle-Glu(Ot.Bu) al péptido (3-6) con DCC/HOObt en dimetilformamida.

- 15 Etapa 3a: Eliminación del grupo protector Ot.Bu de la cadena lateral del residuo 2 (Glu) mediante tratamiento con HCl 8N y fenol;

Etapa 4. Purificación de los péptidos mediante RP-HPLC preparativa usando una columna C-18 y un eluyente de agua/acetonitrilo/TFA purificado;

- 20 Etapa 5. Etapa de concentración usando la misma columna cromatográfica con un eluyente compuesto de los mismos componentes pero con un mayor contenido de acetonitrilo. Los solventes orgánicos se eliminan por evaporación;

Etapa 6: Liofilización de la solución acuosa obtenida después de la evaporación de los disolventes orgánicos.

- 25 Cada una de estas etapas de síntesis preferidas más específicas se puede introducir independientemente y por separado en el método de preparación general anterior, llegando a un procedimiento preferido. De este modo, cada etapa preferida por separado representa las condiciones preferidas para la preparación del compuesto de la invención.

En un aspecto preferido, como se explicará adicionalmente a continuación, la introducción del grupo homoArg ocurre preferiblemente incorporando primero Lys y convirtiendo Lys en homoArg. Opcionalmente, la conversión de Lys a homoArg tiene lugar en un etapa posterior de la preparación y el grupo Lys se protege temporalmente, por ejemplo, con un grupo trifluoro acetilo.

- 30 Las abreviaturas usadas en este documento serán fácilmente entendidas por la persona experta, la siguiente lista solo se proporciona por conveniencia:

Ac: acetilo o CH<sub>3</sub>-CO

BCAT: tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio

DCC: dicitclohexilcarbidiimida

- 35 DIPEA: diisopropiletilamina

Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo

HBTU: hexafluorofosfato de benzotriazolil tetrametiluronio

HOObt: 3-hidrox-3,4dihidro-4oxo-benzotriazina

Grupo OtBu-: grupo O-tert-butilo

- 40 Grupo trt: grupo tritilo

El compuesto de la invención comprende una unidad homoArg o norArg que se puede introducir como una unidad homoArg o norArg en el tripéptido de la etapa 1 de procesamiento mencionada anteriormente. Sin embargo, sorprendentemente se descubrió que el derivado de aminoácido homoArg se puede introducir beneficiosamente en los análogos alfa MSH usan condiciones de procesamiento eficientes y generan altos rendimientos para expensas reducidas. Se observa que este aspecto se refiere a análogos de alfa-MSH en general, esto es,

- 45

agonistas de MC1R según la definición proporcionada anteriormente, que comprende un grupo homoArg. Esto incluye el compuesto de la presente invención, pero en principio también los descritos en el documento WO2008025094 de los cuales las estructuras de fórmula análoga que comprenden un grupo homoArg se incorporan en este documento como referencia.

5 De acuerdo con lo anterior, la presente invención generalmente se refiere a un procedimiento de preparación de un análogo alfa-MSH que comprende un grupo homoArg usando un grupo lisina y convirtiendo el grupo lisina en el grupo homoArg haciendo reaccionar la función amino libre de la cadena lateral de lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

10 En un aspecto preferido, primero se prepara el tripéptido D-Phe-Lys-Trp Lisina y, posteriormente, el grupo lisina se convierte en homoArg haciendo reaccionar la función amino libre de la cadena lateral de Lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT) para generar el tripéptido D-Phe - homoArg - Trp.

15 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto preferido, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de Ac - Nle - Glu - His - D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub> como se definió anteriormente preparando el tripéptido D-Phe - homoArg - Trp de arriba mencionado en la etapa 1 de D-Phe - Lys - Trp al convertir la función amino libre de la cadena lateral de la lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

20 Preferiblemente, el grupo lisina se introduce y convierte en homoArg antes de la etapa 1 mencionada anteriormente. Opcionalmente, el grupo lisina se puede introducir antes de la etapa 1 mencionada anteriormente pero se convierte en homoArg en un etapa posterior en la preparación del compuesto de la invención. En ese caso, la función amino libre del grupo lisina está preferiblemente protegida temporalmente. La protección se puede llevar a cabo, por ejemplo, con un grupo trifluoro acetilo. En la etapa posterior y después de la desprotección, Lys se convierte en homoArg con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

#### Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención y se presentan sin desear limitar el alcance de la presente invención a los ejemplos específicos.

#### Ejemplo 1

30 Específicamente, el compuesto con estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His- D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub> de la presente invención se preparó generalmente usando las etapas de procesamiento 1-6 mencionadas anteriormente. La unidad de homoarginina se introdujo en el tripéptido antes de la etapa 1 de la siguiente manera: primero se incorporó un derivado protegido de lisina al nivel del tripéptido 4-6 antes de la etapa 1, el tripéptido de lisina se desprotegió parcialmente y la función amino libre de la cadena lateral de lisina se convirtió en una homoarginina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

La identificación y la pureza del compuesto fueron confirmadas por MS (sin incluir el anión trifluoroacetato) y HPLC y se obtuvieron los siguientes resultados:

	MW por de espec. de masas	Pureza por HPLC
Compuesto	941	100%

35 La prueba de identidad se proporcionó además con espectros de protones de 500 MHz.

El compuesto de norArg de la invención se puede preparar como se indicó anteriormente, por ejemplo, usando el norArg en la unidad de partida del tripéptido (4-6).

#### Ejemplo 2: efectos en AMPc

40 El compuesto con estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His- D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub> de la invención se probó usando un cultivo de melanocitos humanos codificado en 1753 que expresaba MC1R funcional. Los melanocitos se sembraron a una densidad de 0.3\*10<sup>6</sup> células/pocillo. Después de 48 horas, los melanocitos se trataron con diferentes concentraciones de compuesto (10<sup>-12</sup> a 10<sup>-7</sup> M) durante 1 hora. Se incluyó un control sin compuesto en la prueba. El compuesto de referencia NDP-MSH también se incluyó como comparación a las mismas concentraciones. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 N y el sobrenadante en cada pocillo se usó para medir el AMPc usando un radioinmunoensayo según lo descrito por Suzuki 1996 (Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z: "Binding of melanotropic hormones to the MC1 receptor on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis". Endocrinology 137: 1627-1633, 1996). Las muestras duplicadas de cada pocillo se analizaron con pocillos triplicados incluidos en cada grupo. La media de 6 mediciones de AMPc por grupo se expresó como % del grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Newman Kuels. En algunos casos, se usó una prueba t no apareada.

50

Los resultados fueron que el compuesto de la invención superó al compuesto de referencia NDP-MSH al lograr la mayor eficacia (216% a  $10^{-7}$  M frente a 202% a  $10^{-7}$  M) y los resultados fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control en ( $p < 0.05$ ) a concentraciones de  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M.

- 5 Se concluye que el compuesto mostró excelentes resultados de eficacia en la prueba de medición de AMPc, el segundo mensajero de la respuesta MC1R.

Ejemplo 3: efectos sobre la actividad de tirosinasa

- 10 El compuesto con estructura de fórmula Ac – Nle - Glu - His- D-Phe - homoArg - Trp - NH<sub>2</sub> de la invención se probó usando un cultivo de melanocitos humanos codificado en 1750 que expresaba MC1R funcional. Los melanocitos se sembraron en placas con una densidad de  $0.3 \times 10^6$  células en placas de 60 mm (placas por triplicado/grupo). Después de 48 horas, los melanocitos se trataron cada dos días durante un total de seis días con diferentes dosis ( $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M) del compuesto. Se incluyó un control sin compuesto en la prueba. El compuesto de referencia NDP-MSH, afamelanotida, también se incluyó como comparación a las mismas concentraciones. El día 5 de tratamiento, se agregó tirosina marcada con <sup>3</sup>H, el sustrato para la tirosinasa, y 24 horas después, se guardó el sobrenadante para analizar la actividad de la tirosinasa como se describe por Suzuki et al (véase el ejemplo 2). Se analizaron muestras por duplicado de cada una, con placa por triplicado incluidas en cada grupo.
- 15 Se contó el número de células en cada placa, y la actividad de tirosinasa se expresó como dpm/ $10^6$  células y como % del control. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Newman Kuels.

- 20 Se entenderá que esta prueba de activación de tirosinasa se relaciona con un evento tardío después de la activación de MC1R, en comparación con el efecto mensajero secundario anterior de la prueba AMPc anterior. Como se señaló anteriormente, la actividad de la tirosinasa requiere días de tratamiento.

Se encontró que el compuesto superó al compuesto de referencia NDP-MSH, afamelanotida, al lograr la mayor eficacia (227% a  $10^{-8}$  M frente a 156% a  $10^{-9}$  M; con el compuesto en realidad también tiene una mayor eficacia de 198% a  $10^{-9}$  M) y los resultados fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control ( $p < 0.05$ ) a concentraciones de  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M.

- 25 Se concluye que el compuesto de la invención mostró una excelente eficacia en la prueba que mide la tirosinasa, lo que representa un evento tardío después de la actividad agonista en el MC1R.

Los expertos en el arte apreciarán que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra en las realizaciones específicas. Por lo tanto, las presentes realizaciones se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

30



**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto con estructura de fórmula Ac - Nle - Glu - His- D-Phe -X - Trp - NH<sub>2</sub>, en la que X es homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es homoArg.
- 5 3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es norArg.
4. Compuesto según las reivindicaciones 1-3 para uso como medicamento.
5. Compuesto según las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento terapéutico de un trastorno de la piel.
6. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de trastornos de pigmentación, fotodermatosis, prevención de cáncer de piel y/o reparación de ADN en células de la piel.
- 10 7. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 4-6, en el que el compuesto se aplica por vía tópica a la piel.
8. Método de preparación del compuesto Ac - Nle - Glu - His- D-Phe -X - Trp - NH<sub>2</sub>, en el que X es homoArg o norArg, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por
  - proporcionar el tripéptido D-Phe - X - Trp (4-6);
  - acoplar el tripéptido (4-6) D-Phe - X - Trp con histidina (3); y
  - 15 - acoplar el dipéptido Nle-Glu (1-2) con el tetrapéptido His - D-Phe - X - Trp (3-6).
9. Método según la reivindicación 8, en el que el tripéptido DPhe - homoArg - Trp (4-6) se prepara a partir del tripéptido D-Phe - Lys - Trp convirtiendo la función amino libre de la cadena lateral de lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).
- 20 10. Método de preparación de un análogo de alfa-MSH según la reivindicación 1 que comprende el tripéptido D-Phe - homoArg - Trp con un grupo homoArg introduciendo primero un grupo lisina como un tripéptido D-Phe - Lys - Trp durante la preparación del análogo, luego, convirtiendo la función amino libre de la cadena lateral de la lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT) para generar un grupo homoArg y posteriormente usando el tripéptido D-Phe - homoArg - Trp para preparar el análogo alfa-MSH.