

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 350**

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/IB2016/052417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16727839 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3288966**

54 Título: **Compuesto farmacéutico**

30 Prioridad:

**28.04.2015 EP 15165536**

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

**01.07.2020**

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 2 770 350 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

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a compuestos específicos análogos de alfa-MSH, un compuesto para usar, uso de un compuesto para la fabricación, un método para preparar un compuesto, un método para preparar un derivado de aminoácido o péptido, y un método para tratar a un sujeto mediante terapia.

10

## Antecedentes de la invención

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 intermedia 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>. La Alpha-MSH se une al MC1R e induce la transducción de señal mediada por el AMP cíclico que conduce a la síntesis de polímeros de melanina a partir de precursores de DOPA. Se han descrito varios análogos de la alfa-MSH en los documentos WO2008025094y WO2012107592.

20

Se pueden expresar dos tipos de melanina en humanos, melanina y feomelanina. Se cree que el pigmento melanina parduzco-negro tiene propiedades fotoprotectoras, ya que es resistente a la fotodegradación y tiene la capacidad de inactivar 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 la alfa-MSH al 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.

30

## Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, sorprendentemente hemos encontrado que las modificaciones, como la introducción de un grupo de amonio cuaternario (un átomo de nitrógeno cuaternario, cargado positivamente con cuatro sustituyentes) en la cadena principal de un análogo alfa-MSH están asociadas con beneficios, que incluyen mayor eficacia y/o preparación eficiente, con alto rendimiento y/o alta pureza.

35

En un aspecto de la invención, el compuesto análogo de la alfa-MSH es un derivado de la alfa-MSH que exhibe actividad agonista para el receptor de melanocortina-1 (MC1R), el receptor al que se une la alfa-MSH para iniciar la producción de melanina dentro de un melanocito, en donde el análogo alfa-MSH comprende un grupo de amonio cuaternario en la cadena principal.

40

En un aspecto de la invención, el grupo de amonio cuaternario (que está unido al análogo de la alfa-MSH) tiene tres sustituyentes seleccionados independientemente del etilo.

45

En un aspecto adicional de la invención, el análogo de la alfa-MSH (que está unido al grupo de amonio cuaternario) es un hexapéptido que proporciona beneficios adicionales al compuesto de la invención, incluido un menor esfuerzo de producción y/o costos, menos susceptible a la degradación, mayor actividad y mayor potencia, particularmente por peso.

50

En consecuencia, la invención se refiere a un compuesto análogo de la alfa-MSH que es un derivado de la alfa-MSH que exhibe actividad agonista para el receptor de melanocortina-1 (MC1R), el receptor al que se une la alfa-MSH para iniciar la producción de melanina dentro de un melanocito, en donde el análogo de la alfa-MSH comprende un grupo de amonio cuaternario en la cadena principal.

55

La invención se refiere además a un compuesto con estructura de fórmula: (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> N - CH<sub>2</sub> - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH<sub>2</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60

En una modalidad adicional, el compuesto de la invención es para usar como medicamento. Preferentemente, el compuesto de la invención es para usar en el tratamiento terapéutico de un trastorno de la piel. Preferentemente, el compuesto se usa para tratar trastornos de la pigmentación, fotodermatitis, prevención de cáncer de piel y/o reparación de ADN en células de la piel. Preferentemente, el compuesto se aplica tópicamente a la piel o mediante una formulación de liberación sostenida o extendida.

65

En una modalidad adicional, la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la fabricación de un medicamento. El compuesto se incluye preferentemente en un producto farmacéuticamente activo para uso medicinal.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un método para preparar el compuesto reivindicado.

5 En una modalidad adicional, la invención se refiere a un método para tratar a un sujeto mediante terapia administrando el compuesto reivindicado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Sorprendentemente, hemos encontrado que los compuestos de la presente invención proporcionan resultados beneficiosos en pruebas in vitro y/o in vivo, por ejemplo, relacionadas con la afinidad, potencia y/o eficacia de unión al MC1R o que muestran una mayor estabilidad, y son particularmente útiles para aumentar la expresión del MC1R como objetivo medicinal. Además, hemos encontrado que los compuestos de la invención pueden sintetizarse de manera segura y eficiente, particularmente con un alto rendimiento.

Descripción detallada de la invención

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

20 Se han usado las siguientes abreviaturas en esta descripción: Arg - arginina, D-Phe - D isómero de la fenilalanina; Glu - ácido glutámico; Gly - Glicina; His - Histidina; HomoArg - homoarginina (una unidad -CH<sub>2</sub>adicional en la cadena de alquilo en comparación con Arg); Lys - Lisina; Met - Metionina; Nle - Norleucina; NorArg - Norarginina (una unidad -CH<sub>2</sub>menos en la cadena alquílica que Arg); Fenilalanina; Ser - Serina; Trp - Triptófano. 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 - en el extremo opuesto de la molécula en configuración lineal, el carboxilo terminal amidado a la derecha. Como se entenderá, el extremo amino terminal acilado puede reemplazarse por otro grupo de acuerdo con 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 posicionado en el extremo N terminal (a la izquierda).

30 En esta descripción, homoArg y norArg pueden denominarse aminoácidos, aunque sean estrictamente derivados de aminoácidos. Del mismo modo, los compuestos que comprenden grupos amonio cuaternarios, homoArg, norArg y/u otros derivados de aminoácidos pueden denominarse péptidos, aunque sean estrictamente derivados de péptidos. En consecuencia, el experto comprenderá que la referencia en este documento a las moléculas peptídicas (incluidos los hexapéptidos y los análogos de la alfa-MSH) incluyen la referencia a los derivados de los mismos.

35 A través de toda esta descripción la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entiende que implica la inclusión de un elemento declarado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

40 El grupo de amonio cuaternario es el grupo Et<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>CO-, que se denomina grupo trietilglicilo y que puede escribirse como (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> N - CH<sub>2</sub> - CO - La presente invención se refiere a (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> N - CH<sub>2</sub> - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH<sub>2</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 Preferentemente, el grupo de amonio cuaternario confiere una carga positiva al compuesto de la invención, que está -de acuerdo con la convención- representado con un signo más al lado del átomo de nitrógeno, es decir, N<sup>+</sup>. Además, en dependencia del entorno, ciertos aminoácidos pueden actuar como una base y atraer un protón, lo que da como resultado una carga en el péptido, como es bien sabido en la técnica. De acuerdo con un aspecto, el compuesto tiene carga positiva y se combina preferentemente con un contraión con carga negativa farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el contraión es un anión Y<sup>-</sup> cargado negativamente farmacéuticamente aceptable. Se debe entender que Y<sup>-</sup> también puede tener una carga negativa múltiple, en cuyo caso se combina con múltiples cationes N<sup>+</sup> positivos en uno o más compuestos de la invención; los compuestos de la invención también pueden tener en principio múltiples grupos de amonio cuaternario u otros grupos cargados. Ejemplos de aniones Y<sup>-</sup> farmacéuticamente aceptables 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, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico. Opcionalmente, estos compuestos son halogenados, como por ejemplo el tri-fluoroacetato. Preferentemente, Y<sup>-</sup> es acetato, cloruro o sulfato y con mayor preferencia acetato.

50 La síntesis de los compuestos preferidos se proporciona más abajo, que también indica generalmente cómo unir grupos amonio cuaternarios a análogos de alfa-MSH de acuerdo con la invención.

65

Los compuestos de la presente invención se usan preferentemente como agentes farmacéuticamente activos para uso medicinal, como medicamento. Se debe entender que las indicaciones médicas de la invención son de naturaleza terapéutica. Para el propósito de la invención, la prevención de una enfermedad se configura para ser cubierta por el término tratamiento.

5

Los compuestos de la invención pueden usarse beneficiosamente para el tratamiento y/o prevención de diversas indicaciones médicas, preferentemente indicaciones médicas de naturaleza terapéutica exclusiva. Preferentemente, la referencia al uso del compuesto de la invención incluye no solo sales farmacéuticamente aceptables, sino también preferentemente el uso de profármacos, estereoisómeros, tautómeros, hidratos, hidruros y/o solvatos de los compuestos de la invención.

10

Los compuestos de la invención pueden usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las indicaciones y administraciones indicadas en esta descripción.

15

Preferentemente, los compuestos de la invención se usan para el tratamiento de enfermedades en donde los compuestos -por asociación- aumentan beneficiosamente la expresión del MC1R, como un objetivo farmacológico para las enfermedades. Ejemplos de tales enfermedades son los trastornos de pigmentación, las fotodermatosis, la prevención del cáncer de piel y/o la reparación del ADN en las células de la piel (después/debido a la exposición a los rayos UV). La persona experta entenderá sin duda que la descripción de esta especificación incluye el uso de cada compuesto específico de la presente invención para cada una de las indicaciones mencionadas.

20

En un aspecto, los compuestos de la invención se usan 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. Hemos encontrado que los compuestos de la invención pueden 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 de acuerdo con la invención. El término "melanogénesis" como se usa en la presente descripción se define como la capacidad de un sujeto para producir melaninas por las células productoras de melanina, o melanocitos, para uso terapéutico. Ejemplos de producir melanogénesis terapéutica son proteger la piel del daño por irradiación UV, por ejemplo, evitar que la piel desarrolle arrugas, quemaduras solares y/o cáncer.

30

Un ejemplo importante preferido de un trastorno de hipopigmentación es el vitiligo. El vitiligo es una afección crónica de la piel que se caracteriza por la pérdida de pigmento, que incluye 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 que no se ve afectado, pigmentado y de color más oscuro. En un aspecto, la presente invención está dirigida al tratamiento del vitiligo, particularmente en combinación con el tratamiento con luz UV. Los compuestos de la invención se prefieren para su uso en el tratamiento del vitiligo, particularmente para la repigmentación de lesiones vitiliginosas y, por lo tanto, reducen 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 radiación UV y se pueden clasificar en 5 categorías generales: fotodermatosis idiopáticas (que incluyen erupción de luz polimórfica (ELP), prurigo actínico, hidroa vacciniiforme, dermatitis actínica crónica y SU-urticarial solar); fotodermatosis que son secundarias a agentes exógenos (incluidas reacciones fototóxicas y fotoalérgicas); fotodermatosis secundarias a agentes endógenos (principalmente las porfirias que incluyen ProtoPorphyria-EPP eritropoyética); dermatosis fotoexacerbadas (incluidas enfermedades autoinmunes, afecciones infecciosas y deficiencias nutricionales); y genodermatosis.

40

En un aspecto, la presente invención está dirigida al tratamiento de las fotodermatosis. Se prefieren los compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento de las fotodermatosis, particularmente para EPP, ELP 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 mediante el uso de los compuestos de la invención para la prevención del cáncer. Se prefieren los compuestos de la invención 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 de los compuestos de la invención, incluidos los pacientes inmunocomprometidos (particularmente pacientes con VIH-SIDA, pacientes con trasplante alogénico, es decir, el receptor recibe el trasplante de otro sujeto y/o pacientes con medicación inmunosupresora), sujetos humanos que tienen uno o más variantes de los alelos del MC1R asociados con la pérdida o disminución de la función del receptor (preferentemente seleccionados de Val60LEU (V60L), Asp84Glu (D84E), Val92Met (V92M), Arg142His (R142H), Arg151Cys (R151C), Arg160Trp (R160W) y Asp294His (D294H)).

50

55

60

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 es directa a la reparación del ADN. En consecuencia, la presente invención está

65

dirigida a compuestos de la invención para su uso en la reparación de ADN, preferentemente en la piel, particularmente subsecuentemente a la irradiación UV de la piel.

5 Preferentemente, el compuesto de la invención se usa en un sujeto en donde el sujeto es preferentemente un mamífero, preferentemente roedores y/o humanos, con mayor preferencia 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 Cualquiera de los compuestos útiles en la presente descripción puede administrarse a un sujeto mediante el uso de una variedad de técnicas de administración o suministro conocidas en la técnica. El modo de administración dependerá del sujeto a tratar y del compuesto seleccionado. En varios aspectos, el compuesto puede administrarse por vía oral (o enteral), parenteral o tópica (preferentemente a la piel).

15 El término "oral" se usa en la presente descripción para abarcar la administración de los compuestos a través del tracto digestivo.

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

25 El término "mucosa" como se usa en la presente descripción abarca la administración de los compuestos por métodos que emplean la mucosa (membranas mucosas) del cuerpo del sujeto tales como, pero sin limitarse a, tejido bucal, intranasal, gingival, vaginal, sublingual, pulmonar, o rectal.

El término "transdérmico" como se usa en la presente descripción abarca la administración de los compuestos que se aplican a la piel y posteriormente pasan a través de la piel hacia la circulación sistémica, tales como, pero sin limitación, formulaciones transdérmicas, parches bucales, parches cutáneos o parches transdérmicos.

30 El término "tópico" como se usa en la presente descripción 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 pueden incorporarse 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, por lo tanto, 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, por lo tanto, se administra por vía transdérmica.

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

40 En un aspecto, el compuesto de la invención se administra tópicamente en la piel. En consecuencia, 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 en la piel. En consecuencia, la invención se refiere a administrar el compuesto de la invención a través de la piel de un sujeto.

45 Preferentemente, los compuestos de la invención se formulan en una composición. La composición es preferentemente una composición farmacéutica. La composición comprende preferentemente al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable adicional a los compuestos de la invención. Ejemplos de tales ingredientes farmacéuticamente aceptables son portadores, polímeros, espesantes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes y agentes tensioactivos.

50 En un aspecto, la composición es una formulación de liberación sostenida o 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 modalidad preferida, el compuesto se administra en una formulación de implante de liberación prolongada tal como se describe en el documento WO2006/012667.

55 Proceso de preparación

60 Los compuestos de la invención se preparan preferentemente de la siguiente manera, aunque la persona experta apreciará al revisar esta descripción de que podrían emplearse alteraciones de los métodos presentados que también están cubiertos por la invención ahora reivindicada. De acuerdo con un método preferido, los compuestos de la invención se preparan mediante síntesis de péptidos en fase líquida o en fase sólida, preferentemente seguidos por purificación cromatográfica y preferentemente por liofilización.

65 Generalmente, se describe la preparación del compuesto análogo de la alfa MSH  $R_1 R_2 R_3 N - (CH_2)_n - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - X - Trp - NH_2$ ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde

5 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente seleccionados de metilo, etilo y propilo;

n es del 1-4; y

X se selecciona de Arg, homoArg o norArg, por

10

etapa 1: proporcionar el tripéptido D-Phe - X - Trp (4-6);

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

15

etapa 3: acoplar el compuesto de amonio cuaternario R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N<sup>+</sup> - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COO<sup>-</sup> con el dipéptido Nle-Glu (1-2); y

etapa 4: acoplar el dipéptido Nle-Glu (1-2) que lleva el grupo de amonio cuaternario con el tetrapéptido His - D-Phe - X - Trp (3-6) para preparar el compuesto R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - X - Trp - NH<sub>2</sub>.

20

Preferentemente, el compuesto se purifica (etapa 5); preferentemente, el compuesto se concentra (etapa 6); y preferentemente, el compuesto se liofiliza (etapa 7).

Específicamente, las etapas de síntesis de los compuestos que comprenden -Nle - Glu - His - D-Phe - X-Trp, (que representa R<sub>5</sub> de la estructura de la fórmula), en donde X es Arg u homoArg, incluyen las siguientes etapas con más detalle:

25

Etapa 1: Desprotección del tripéptido D-Phe-X-Trp (4-6) por hidrólisis con un catalizador Pd/C en etanol;

30

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

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

35

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 compuesto con amonio cuaternario R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N<sup>+</sup> - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COO<sup>-</sup> con el compuesto basado en el dipéptido Nle-Glu (Ot.Bu);

40

Etapa 4: Acoplamiento del dipéptido (1-2) Nle-Glu (Ot.Bu) que ya lleva el grupo de amonio cuaternario al péptido (3-6) con DCC/HOObt en dimetilformamida.

Etapa 4a: Eliminación del grupo protector Ot.Bu de la cadena lateral del residuo 2 (Glu) mediante tratamiento con 8NHCl y fenol;

45

Etapa 5. Purificación de los péptidos por RP-HPLC preparativa usando una columna C-18 y un eluyente con agua purificada/acetonitrilo/TFA;

50

Etapa 6. Etapa de concentración mediante el uso de la misma columna cromatográfica con un eluyente compuesto de los mismos componentes, pero con un mayor contenido de acetonitrilo. Los disolventes orgánicos se eliminan por evaporación;

Etapa 7: Liofilización de la solución acuosa obtenida después de la evaporación de los disolventes orgánicos.

55

Cada una de estas etapas de síntesis más específicas pueden introducirse independientemente en el método de preparación general anterior, llegando a un proceso preferido. Por lo tanto, cada etapa preferida por separado representa las condiciones preferidas para la preparación del compuesto de la invención.

60

En un aspecto preferido, como se explicará más abajo, la introducción del grupo homoArg se produce preferentemente incorporando primero Lys y convirtiendo Lys en homoArg. Opcionalmente, la conversión de Lys a homoArg tiene lugar en una etapa posterior de la preparación, que requiere protección temporal del grupo Lys, por ejemplo, con un grupo trifluoroacetilo.

Las abreviaturas usadas en la presente descripción serán fácilmente entendidas por la persona experta, la siguiente lista solo se proporciona por conveniencia:

65

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

- BCAT: tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio
- 5 DCC: dicitclohexilcarbodiimida
- DIPEA: diisopropiletilamina
- Grupo-Et<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>CO-: grupo trietilglicilo
- 10 Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo
- HBTU: hexafluorofosfato de benzotriazolil tetrametiluronio
- 15 HOBT: 3-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-benzotriazina
- Grupo Me<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-: grupo butirobeta'inilo
- Grupo OtBu-: Grupo O-terc-butilo
- 20 Grupo Trt-: grupo tritilo
- TMS: trimetilsililo
- Proceso de acoplamiento del grupo de amonio cuaternario.
- 25 Sorprendentemente, hemos encontrado que el grupo de amonio cuaternario puede introducirse de manera beneficiosa en análogos de la alfa-MSH, usando condiciones de procesamiento fáciles y dando como resultado altos rendimientos. Tal proceso permite la unión a los análogos de la alfa-MSH del documento WO2008025094, cuyas estructuras de fórmula se incorporan en la presente descripción como referencia para definir el proceso. El proceso preferido para la unión del grupo de amonio cuaternario al análogo de la alfa-MSH se indica más abajo.
- 30 Preferentemente, el grupo persililado está unido al aminoácido en la posición 1 del análogo de la alfa-MSH (el extremo terminal derecho; el lado donde reemplaza al grupo Ac), que es preferentemente un grupo Nle. El proceso de reacción reemplaza el grupo persililado en el análogo de la alfa-MSH con el grupo de amonio cuaternario.
- 35 Se describe un método para preparar un aminoácido o péptido conectado a un grupo de amonio cuaternario R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N<sup>+</sup> - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CO - en donde
- 40 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan independientemente de metilo, etilo y propilo; y
- n es de 1-4,
- 45 mediante el uso el cloruro de ácido del compuesto de amonio cuaternario R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N<sup>+</sup> - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COO<sup>-</sup> y un compuesto a base de aminoácidos que comprende un grupo persililado, por
- (etapa a:) hacer reaccionar el cloruro de ácido del compuesto amonio cuaternario con el grupo persililado del compuesto a base de aminoácidos.
- 50 Preferentemente, el compuesto basado en aminoácidos es un aminoácido o un péptido. Preferentemente, el compuesto basado en aminoácidos comprende Nle como grupo final, con mayor preferencia el compuesto basado en aminoácidos es el dipéptido Nle-Glu y con la máxima preferencia el dipéptido 1-2 TMS-Nle-Glu(Ot.Bu)-OTMS persililado. Preferentemente, el cloruro de ácido del compuesto amonio cuaternario R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> N<sup>+</sup> - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COO<sup>-</sup> se hace reaccionar con TMS-Nle-Glu (Ot.Bu) -OTMS.
- 55 Preferentemente, el proceso de acoplamiento de amonio cuaternario se usa para la preparación del análogo de la alfa-MSH como se definió anteriormente, con mayor preferencia, el grupo de amonio cuaternario está unido al hexapéptido Nle - Glu - His - D - Phe - X - Trp - NH<sub>2</sub>
- 60 en donde X se selecciona de Arg, norArg y homoArg, y otros compuestos específicos preferidos identificados anteriormente. Preferentemente, este proceso se usa en la etapa 3 del proceso mencionado anteriormente. Preferentemente, la etapa a tiene lugar en un disolvente, que es preferentemente acetonitrilo. Preferentemente, se usa un exceso de cloruro de ácido en la etapa a. Preferentemente, la etapa a es seguida por la etapa b: desililación del análogo. Preferentemente, la etapa b ocurre en un disolvente que es preferentemente acetato de etilo saturado con agua. Preferentemente, el exceso de cloruro de ácido se destruye en la etapa b. Preferentemente, la etapa a y/o b es seguida por el paso c: el exceso de precipitado se filtra. Preferentemente, subsecuentemente se usa la etapa d: el filtrado se
- 65

concentra por evaporación. Preferentemente, subsecuentemente se usa la etapa e: el residuo se tritura con un disolvente que es preferentemente dimetoxietano.

Los compuestos amonio cuaternario preferidos -como se indicó anteriormente- son  $R_1 R_2 R_3 N^+ - (CH_2)_n - COO^-$  en donde:

$R_1, R_2$  y  $R_3$  se seleccionan independientemente de metilo, etilo y propilo; y

$n$  es de 1-4.

El cloruro de ácido de estos compuestos amonio cuaternarios sería preferido para usar en este proceso. Los compuestos amonio cuaternario particularmente preferidos son trietilglicina y butirobetano. Los cloruros de ácidos de esta manera son preferidos en el proceso anterior de la invención.

Proceso de introducción de la unidad homoArg en el compuesto

El compuesto descrito puede comprender una unidad homoArg. La unidad homoArg se puede introducir como una unidad homoArg en el tripéptido de la etapa 1, mencionada anteriormente.

Sorprendentemente, hemos encontrado que el derivado del aminoácido homoArg se puede introducir beneficiosamente en el péptido derivado de la invención, mediante el uso de condiciones de procesamiento fáciles y eficientes y dando como resultado altos rendimientos para gastos reducidos.

En consecuencia, se describe un proceso de preparación de un análogo de la alfa-MSH, preferentemente un compuesto de la presente invención, que comprende un grupo homoArg preparando primero D-Phe-Lys-Trp y subsecuentemente convirtiendo el grupo Lys en un grupo homoArg por reacción de la función amino libre de la cadena lateral de la lisina con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT). En lugar de sintetizar directamente el D-Phe-homoArg - Trp, descubrimos que introducir primero un grupo de lisina y luego convertir el grupo de lisina en homoArg conduce a gastos reducidos con buenos rendimientos.

Preferentemente, el grupo lisina se introduce y convierte en homoArg antes de la etapa 1 mencionada anteriormente. Opcionalmente, el grupo Lisina puede introducirse antes de la etapa 1 mencionada anteriormente, pero convertirse en homoArg en un paso posterior en la preparación del compuesto de la invención. En ese caso, la función amino libre del grupo lisina está preferentemente protegida temporalmente. La protección puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un grupo trifluoroacetilo. En la etapa posterior y después de la desprotección, la Lys se convierte en homoArg con el reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT).

## EJEMPLOS

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: acoplamiento de compuesto amonio cuaternario al dipéptido

El exceso de cloruro del ácido de la trietilglicina o el butirobetano se acopla al dipéptido 1-2 TMS-Nle-Glu(Ot.Bu)-OTMS persililado en acetonitrilo. Una vez que se ha terminado la reacción, el exceso de cloruro de ácido se destruye y el dipéptido se desilila mediante la adición de acetato de etilo saturado de agua. El exceso de trietilglicina o butirobetano que precipita se filtra, el filtrado se concentra por evaporación y el residuo se tritura con dimetoxietano. El rendimiento fue de 70 %.

Ejemplo 2: preparación y caracterización de los compuestos 1, 2, 3 y 4.

Los compuestos 1 y 2 de la presente invención se prepararon mediante el uso de las etapas de procesamiento 1-7 mencionadas anteriormente. En la etapa 3 del acoplamiento al hexapéptido [3-6], el dipéptido 1-2 sin protección N (Nle-Glu (OtBu) se hizo reaccionar con el cloruro de ácido de trietilglicina y butirobetano respectivamente, siguiendo las etapas a, b, c, d y e mencionadas anteriormente con los disolventes preferidos. Siguiendo estas etapas, el compuesto 1 en el grupo trietilglicilo ( $Et_3NCH_2CO-$ ) se unió al aminoácido en la posición 1 (Norleucina) y el compuesto 2 en el grupo butirobeta'nilo ( $Me_3N-CH_2-CH_2-CH_2-CO-$ ) se unió al aminoácido en la posición 1 (Norleucina).

Los compuestos 3 y 4 de la presente invención se prepararon generalmente mediante el uso de las etapas de síntesis anteriores de los compuestos 1 y 2, que incluyen la incorporación de trietilglicina y butirobetaina respectivamente, pero con la modificación de que el aminoácido arginina (5) fue reemplazado por su homólogo superior homoarginina de la siguiente manera: antes de la etapa 1 de la síntesis, se incorporó un derivado protegido de lisina a nivel del tripéptido 4-6, luego el tripéptido de lisina se desprotegió parcialmente y la función amino libre de la cadena lateral de lisina se convirtió en una homoarginina con reactivo de guanilación tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (BCAT). Como resultado, ambos compuestos 3 y 4 comprendían una unidad homoArg. Además, el compuesto 3 tenía un grupo trietilglicilo ( $Et_3NCH_2CO-$ ) unido al aminoácido en la posición 1 (Norleucina) mientras que el compuesto 4 tenía un grupo butirobeta'nilo ( $Me_3N-CH_2-CH_2-CH_2-CO-$ ) unido al aminoácido en la posición 1 (Norleucina).

## ES 2 770 350 T3

La identificación y la pureza de los compuestos 1, 2, 3 y 4 se confirmaron por MS (sin incluir el anión trifluoroacetato) y HPLC y se obtuvieron los siguientes resultados:

5	Compuesto	PM por espec de masa	Pureza por HPLC
	1	1026	99 %
	2	1012	98,9 %
10	3	1040	99,4 %
	4	1026	98,2 %

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

### 15 Ejemplo 3: efectos en el cAMP

Los compuestos 1, 2, 3 y 4 se probaron en varias pruebas separadas y mediante el uso de 2 cultivos diferentes de melanocitos humanos, codificados 1750 y 1753, que se derivaron de 2 donantes diferentes que expresan el MC1R funcional. Los melanocitos se plaquearon a una densidad de  $0,3 \times 10^6$  células/pozo. Después de 48 horas, los melanocitos se trataron con las diferentes concentraciones del compuesto durante 1 hora. Los controles sin compuesto se incluyeron en todos los experimentos. En algunos experimentos se incluyó el compuesto de referencia NDP-MSH. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de HCl 1 N y el sobrenadante en cada pocillo se usó para medir el AMPc utilizando un radioinmunoensayo como se describe 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 por triplicado incluidos en cada grupo de compuestos. Los resultados de las diferentes pruebas no se pueden comparar debido a las diferencias en los cultivos de melanocitos y a los diferentes números de pasajes. La media de 6 mediciones del AMPc por grupo se expresó como % del grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del ANOVA seguido de la prueba de Newman Kuels. En algunos casos, se usó una prueba t no pareada.

Los siguientes son los resultados que comparan los compuestos en la prueba indicada:

La prueba 1 evaluó los compuestos 1, 2 y 3 en melanocitos 1750 y midió el AMPc.

35 El compuesto 2 logró su efecto máximo (vs control) con la dosis más baja ( $10^{-8}$  M) que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ .

El compuesto 3 mostró el valor de eficacia global más alto (327 % a  $10^{-7}$  M vs control; esto fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ ).

40 La prueba 2 evaluó los compuestos 1, 2 y 3 en melanocitos 1753 y midió el AMPc.

El compuesto 1 alcanzó el valor de eficacia global más alto (431 % a  $10^{-7}$  M vs control) que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ .

45 El compuesto 2 ya mostró eficacia a los  $10^{-11}$  M (dosis más baja de los compuestos que muestran una eficacia que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ ).

50 El compuesto 3 logró su efecto máximo con la dosis más baja ( $10^{-9}$  M) que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ .

La prueba 3 evaluó el compuesto 4 y la referencia NDP-MSH en melanocitos 1753 y en el AMPc. El compuesto 4 superó al compuesto de referencia NDP-MSH y alcanzó la mayor eficacia (253 % a  $10^{-7}$  M vs 202 % a  $10^{-7}$  M) que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una  $p < 0,05$ .

55 Se concluye que los compuestos 1, 2, 3 y 4 mostraron excelentes resultados de eficacia en la prueba que mide el AMPc, el segundo mensajero de la respuesta al MC1R.

### 60 Ejemplo 4: efectos sobre la actividad de tirosinasa

Los compuestos 1, 2, 3 y 4 se probaron en varias pruebas separadas y usando 2 cultivos diferentes de melanocitos humanos, codificados 1750 y 1753, que se derivaron de 2 donantes diferentes que expresan el MC1R funcional. Los melanocitos se plaquearon a una densidad de  $0,3 \times 10^6$  células en placas de 60 mm (triplicado por placas/grupo). Después de 48 horas, los melanocitos se trataron cada dos días durante un total de seis días con diferentes dosis de cada compuesto. Los controles sin compuesto se incluyeron en todos los experimentos. En algunos experimentos se incluyó el compuesto de referencia NDP-MSH. En el tratamiento del día 5, se añadió tirosina marcada con  $^3H$ , el sustrato para la

5 tirosinasa, y 24 horas después, se guardó el sobrenadante para analizar su actividad de tirosinasa como se describe por Suzuki et al (véase el ejemplo 3). Se analizaron muestras duplicadas de cada ensayo, con placas por triplicado incluidos en cada grupo. Se contó el número de células en cada placa y la actividad de la tirosinasa se expresó como dpm/10<sup>6</sup> células y cómo % del control. Los resultados de las pruebas entre pruebas separadas no se pueden comparar debido a las diferencias en los cultivos de melanocitos y a un número de pasajes diferente. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del ANOVA seguido de la prueba de Newman Kuels.

10 Se debe entender que esta prueba de activación de tirosinasa se relaciona con un evento tardío después de la activación del MC1R, en comparación con el efecto mensajero secundario anterior de la prueba del AMPc anterior. Como se señaló anteriormente, la actividad de la tirosinasa requiere días de tratamiento. Los siguientes son los resultados que comparan los compuestos en la prueba indicada:

La prueba 4 evaluó los compuestos 1, 2 y la referencia NDP-MSH en melanocitos 1750 y se midió la tirosinasa.

15 Los compuestos 1 y 2 superaron el rendimiento del compuesto de referencia NDP-MSH con mayor eficacia (178 % vs 171 % vs 166 %) y ambos fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control (con una p <0,05) a concentraciones de 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-7</sup>M.

20 La prueba 5 evaluó los compuestos 3 y 4 en melanocitos 1750 y se midió la tirosinasa.

Los compuestos 3 y 4 mostraron una eficacia similar que fue estadísticamente diferente en comparación con el control con una p <0,05 a concentraciones de 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-7</sup>M.

25 La prueba 6 evaluó los compuestos 1, 2, 3 y 4 en melanocitos 1753 y se midió la tirosinasa.

Los compuestos 1 y 2 mostraron una eficacia similar a las mismas dosis que fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control (con una p <0,05) a concentraciones de 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-7</sup>M.

30 Los compuestos 1 y 2 superaron a los compuestos 3 y 4, que también mostraron una eficacia similar a las mismas dosis y fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control con una p <0,05 a concentraciones de 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-7</sup>M.

35 Se concluye que los compuestos 1, 2, 3 y 4 también mostraron una excelente eficacia en la prueba que mide la tirosinasa, lo que representa un evento tardío después de la actividad agonista del MC1R.

**REIVINDICACIONES**

1.  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH_2$  o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 para aumentar la expresión del MC1R.
- 10 4. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-3 para inducir melanogénesis.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-3 para el tratamiento de trastornos de pigmentación, fotodermatosis, prevención de cáncer de piel y/o reparación de ADN en células de la piel.
- 15 6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2-5 para el tratamiento del trastorno de hipopigmentación.
7. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-6 para el tratamiento del vitiligo.
- 20 8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2-5 para el tratamiento de ProtoPorfiria Eritropoyética (PPE).
9. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-5 en combinación con luz UV.
- 25 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-9, en donde el compuesto se aplica tópicamente a la piel.
11. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-9, en donde el compuesto se aplica por vía subcutánea.
- 30 12. Composición farmacéutica que comprende  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH_2$  o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición es una formulación de liberación sostenida o controlada.
- 35 14. Método de preparación del compuesto  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH_2$ , por
  - proporcionar el tripéptido D-Phe - Arg - Trp (4-6);
  - acoplar el tripéptido (4-6) D-Phe - Arg-Trp con histidina (3);
  - acoplar el compuesto amonio cuaternario  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - COO^-$  con el dipéptido Nle-Glu (1-2); y
  - 40 - acoplar el dipéptido Nle-Glu (1-2) que lleva el grupo de amonio cuaternario con el tetrapéptido His - D-Phe - Arg-Trp (3-6) para preparar el  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - CO - Nle - Glu - His - D-Phe - Arg - Trp - NH_2$ .
- 45 15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, mediante el uso del cloruro de ácido del compuesto amonio cuaternario  $(C_2H_5)_3 N - CH_2 - COO^-$  y el compuesto basado en aminoácido Nle-Glu (1-2) que comprende un grupo persililado, y hacer reaccionar el cloruro de ácido del compuesto amonio cuaternario con el grupo persililado del compuesto basado en aminoácido.