



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 306 723**

(51) Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01960612 .8**
(86) Fecha de presentación : **02.08.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1309355**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

(54) Título: **Conjugados peptídicos y peptidomiméticos con propiedades inhibidoras de integrina.**

(30) Prioridad: **17.08.2000 DE 100 40 105**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

(73) Titular/es: **Biomet Deutschland GmbH**
Gustav-Krone-Strasse 2
14167 Berlin, DE

(72) Inventor/es: **Meyer, Jörg;**
Nies, Berthold;
Dard, Michel;
Hölzemann, Günter;
Kessler, Horst;
Kantlehner, Martin;
Hersel, Ulrich;
Gibson, Christoph y
Sulyok, Gabor

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Conjugados peptídicos y peptidomiméticos con propiedades inhibitoras de integrina.

La invención se refiere a compuestos de fórmula I



en la que

B significa una molécula bioactiva que se une a integrina

Q falta o es una molécula espaciadora orgánica seleccionada del grupo



así como su combinación

en las que

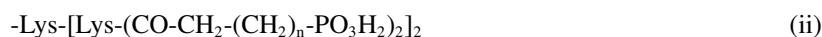
m es en cada caso, independientemente entre sí, 1 a 20

x es 1 a 12

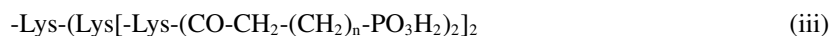
y es 1 a 50

z es 1 a 12.

X₁ significa una molécula de anclaje seleccionada del grupo



o



y n es en cada caso, independientemente entre sí, 0, 1, 2 ó 3, y

en las que un grupo amino libre del grupo B está unido peptídicamente entre sí a un grupo carboxilo libre de la molécula espaciadora Q o de la molécula de anclaje X₁, o un grupo amino libre del resto Q a un grupo carboxilo libre del resto X₁,

así como sus sales.

Se conocen compuestos similares de los documentos DE 19932796, DE 19755800 y DE 19831710.

La invención tenía como objetivo encontrar nuevos compuestos con valiosas propiedades, en especial aquellas que pueden usarse para la preparación de medicamentos.

Se encontró que los compuestos de fórmula I y sus sales poseen a una buena tolerancia propiedades farmacológicas muy valiosas. Actúan sobre todo como inhibidores de integrina, inhibiendo en especial las interacciones de los receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ con ligandos, como p. ej. el enlace del fibrinógeno al receptor de integrina β_3 . Los compuestos presentan una especial actividad en el caso de las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ así como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$.

Este efecto puede demostrarse p. ej. mediante el método descrito por J. W. Smith y col. en J. Biol. Chem. 265, 12267-12271 (1990).

La dependencia entre la aparición de angiogénesis y la interacción entre integrinas vasculares y proteínas de la matriz extracelular lo describen P. C. Brooks, R. A. Clark y D. A. Cheresh en Science 264, 569-71 (1994).

La posibilidad de inhibición de esta interacción y con ello de introducir apoptosis (muerte celular programada) de células vasculares angiogénicas por medio de un péptido cíclico lo han descrito P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T.-Hu, G. Klier y D. A. Cheresh en Cell 79, 1157-64 (1994).

El documento DE 19755801 describe péptidos que contienen dominios responsables de la adhesión de las células, así como grupos de anclaje. Los grupos de anclaje poseen, entre otros, grupos tiol con los que se unen al material del implante.

B.C.F. Chu y col.: "Presentations of Ligands on Hydroxylapatite", publicado en Bioconjugate Chemistry 8, 1997, páginas 103-105, describe trímeros de ácido 2-amino-5-fosfonoaléxico conjugados con biotina, que se unen a hidroxilapatito.

Los compuestos de la fórmula I que bloquean la interacción de receptores de integrina y ligandos, como p. ej. del fibrinógeno al receptor de fibrinógeno (glicoproteína IIb/IIIa), impiden como antagonistas GPIIb/IIIa la propagación de las células tumorales por metástasis. Esto se demostró mediante las observaciones siguientes:

La propagación de las células tumorales desde un tumor local al sistema vascular se realiza mediante la formación de microagregados (microtrombos) al interaccionar las células tumorales con las plaquetas. Las células tumorales están blindadas mediante la protección en el microagregado y no son reconocidas por las células del sistema inmunitario. Los microagregados pueden fijarse a las paredes de los vasos, con lo cual se facilita la penetración adicional de las células tumorales en el tejido. Puesto que la formación de microtrombos está meada por el enlace de fibrinógeno a los receptores de fibrinógeno sobre plaquetas activadas, los antagonistas GPIIaIIIb pueden considerarse inhibidores eficaces de las metástasis.

El resto fosfonato sirve para unir iónicamente o por adsorción los péptidos a superficies biocompatibles de p. ej. implantes que presentan óxidos, como p. ej. superficies metálicas (p. ej. titanio o aleaciones de titanio tales como $TiAl_6V_4$) o superficies que contienen cationes como p. ej. sobre fosfatos de calcio amorfos o sinterizados (p. ej. hidroxilapatito, huesos, dientes) o cementos de fosfato de calcio (p. ej. Biocement D).

Por consiguiente, son objeto de la invención en especial los compuestos de la fórmula I para el enlace iónico o por adsorción a superficies biocompatibles mediante el grupo funcional del resto X_1 .

Los péptidos según la invención permiten ahora la biofuncionalización de biomateriales, en particular implantes para órganos humanos o animales mediante su recubrimiento, estimulándose principalmente la adhesión de aquellas especies celulares que deben llevar a cabo la integración del biomaterial en el correspondiente tejido. Con el uso de los recubrimientos de este tipo debe conseguirse una integración más rápida y fuerte de los distintos implantes de biomaterial con una mejora de la estabilidad a largo plazo una vez incorporados al cuerpo.

Los péptidos según la invención se unen selectivamente a integrinas. Tras la inmovilización en superficies biocompatibles, p. ej. implantes, estimulan la adhesión de células que llevan integrinas.

Después del recubrimiento de las superficies con los compuestos, para la unión se pueden estimular selectivamente aquellas especies celulares que tras la implantación en el tejido natural deban llevar a cabo la integración del implante. Así, p. ej. en el caso de osteoblastos, osteoclastos y células endoteliales se trata de especies celulares que llevan α_v .

Por consiguiente, son objeto de la invención los compuestos de la fórmula I como inhibidores de integrina para el enriquecimiento selectivo de células en implantes.

Una vez anclados a una superficie biocompatible, los compuestos de la fórmula I pueden usarse en medicina y veterinaria como principios activos de medicamentos, pudiéndose usar en especial como inhibidores de integrina para el tratamiento de enfermedades, defectos e inflamaciones causados por implantes tales como la integración incompleta y retrasada de biomateriales e implantes, de trombosis causada por implantes, de defectos óseos y dentales, así como de enfermedades osteolíticas tales como osteoporosis, trombosis, infarto de miocardio, arteriosclerosis, en la curación de las heridas para apoyar los procesos de curación, así como para acelerar y reforzar el proceso de integración del implante o de la superficie biocompatible en el tejido.

Los compuestos de la fórmula I pueden usarse como sustancias de acción antimicrobiana en operaciones en las que se usen biomateriales, implantes, catéteres o marcapasos.

Tienen entonces un efecto antiséptico. La eficacia de la actividad antimicrobiana puede demostrarse mediante el procedimiento descrito por P. Valentin-Weigund y col. en Infection and Immunity, 2851-2855 (1988).

Por consiguiente, son objeto de la invención los compuestos de la fórmula I como inhibidores de integrina para el tratamiento de enfermedades, defectos e inflamaciones causados por implantes y de enfermedades osteolíticas tales

ES 2 306 723 T3

como osteoporosis, trombosis, infarto de miocardio y arteriosclerosis, así como para acelerar y reforzar el proceso de integración del implante o de la superficie biocompatible en el tejido.

5 Además, son objeto de la invención el uso de compuestos de la fórmula I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, defectos, inflamaciones causados por implantes y de enfermedades osteolíticas tales como osteoporosis, trombosis, infarto de miocardio y arteriosclerosis, así como para acelerar y reforzar el proceso de integración del implante o de la superficie biocompatible en el tejido.

10 Los péptidos portadores de anclajes de fosfonato correspondientes se pueden unir iónicamente a soportes con superficies que contienen óxidos tales como p. ej. implantes, cromatografías de afinidad o placas de microtitulación o también a superficies que contienen cationes como p. ej. sobre fosfatos de calcio amorfos o sinterizados (p. ej. hidroxilapatito, huesos, dientes) o cementos de fosfato de calcio (p. ej. Biocement D).

15 Es también objeto de la invención el uso de compuestos de la fórmula I para el recubrimiento mediante enlace iónico o por adsorción de implantes para órganos humanos y animales.

Las abreviaturas de restos de aminoácidos indicadas con anterioridad y a continuación representan los restos de los siguientes aminoácidos:

20	Abu	ácido 4-aminobutírico
	Aha	ácido 6-aminohexanoico, ácido 6-aminocaproico
	Ala	alanina
25	Asn	asparagina
	Asp	ácido asparagínico
30	Arg	arginina
	Cys	cisteína
	Dab	ácido 2,4-diaminobutírico
35	Dap	ácido 2,3-diaminopropiónico
	Gln	glutamina
40	Glp	ácido piroglutámico
	Glu	ácido glutámico
	Gly	glicina
45	His	histidina
	homo-Phe	homo-fenilalanina
50	Ile	isoleucina
	Leu	leucina
	Lys	lisina
55	Met	metionina
	Nle	norleucina
60	Orn	ornitina
	Phe	fenilalanina
	Phg	fenilglicina
65	4-Hal-Phe	4-halofenilalanina

ES 2 306 723 T3

	Pro	prolina
	Ser	serina
5	Thr	treonina
	Trp	triptófano
	Tyr	tirosina
10	Val	valina.
	Además, significan a continuación:	
15	Ac	acetilo
	BOC	<i>tert.</i> -butoxicarbonilo
20	CBZ o Z	benciloxicarbonilo
	DCCI	diciclohexilcarbodiimida
	DMF	dimetilformamida
25	EDCI	N-etil-N,N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida
	Et	etilo
30	FCA	ácido fluoresceinocarboxílico
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
35	FTH	fluoresceintiourea
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
40	Me	metilo
	MBHA	4-metil-benzhidrilamina
	Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil-sulfonilo
45	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HONSu	N-hidroxisuccinimida
50	OtBu	éster <i>tert.</i> -butílico
	Oct	octanoílo
	OMe	éster metílico
55	OEt	éster etílico
	POA	fenoxiacetilo
60	Pbf	pentametilbenzofuranilo
	Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo
	Sal	saliciloflo
65	Su	succinilo

TIPS triisopropilsilano

TFA ácido trifluoroacético

5 En lugar de los compuestos según la invención también pueden usarse los llamados derivados de profármacos, es decir, compuestos de la fórmula 1 modificados con grupos alquilo o acilo, azúcares u oligopéptidos que en el organismo se disocian rápidamente para dar los compuestos eficaces según la invención.

TMSBr bromuro de trimetilsililo

10

Trt tritilo (trifenilmetilo)

15

Siempre que los aminoácidos anteriormente citados puedan aparecer en varias formas enantioméricas, con anterioridad y a continuación, p. ej. como componente de los compuestos de la fórmula 1, se incluyen todas estas formas y también sus mezclas (p. ej. las formas DL). Además los aminoácidos, p. ej. como componente de compuestos de la fórmula 1, pueden estar provistos de los correspondientes grupos protectores en sí conocidos.

20

Como ciclopéptidos pueden usarse también sobre todo modificaciones de la cadena lateral de la arginina, tal como se realizó p. ej. en los antagonistas $\alpha\beta_3$ no peptídicos (p. ej. por R. Keenan y col., Abstr. Pap. 211th ACS National Meeting (Nueva Orleans, EE.UU.) 1996, MEDI 236), como p. ej. derivados de bencimidazol en lugar del grupo guanidina.

25

Es objeto de la invención, además, un implante adecuado para órganos humanos y animales constituido por una matriz de soporte y una capa de una molécula bioactiva que media en la adhesión celular que rodea esta matriz, estando formada la capa circundante por un compuesto de la fórmula I, y existiendo entre la matriz de soporte y este compuesto un enlace iónico o por adsorción. La matriz de soporte y/o su superficie están constituidos preferentemente por un metal u óxido metálico. La matriz de soporte y/o su superficie están constituidos preferentemente por un material de sustitución ósea o dental, como p. ej. de mezclas de fosfato de calcio.

30

Es objeto de la invención, además, un procedimiento para la preparación de compuestos de la fórmula I según la reivindicación 1, así como sus sales, caracterizado porque una molécula B bioactiva que puede estar provista de grupos protectores y una molécula espaciadora-de anclaje (Q-X₁) o molécula de anclaje (X₁) provista de grupos protectores se unen entre sí peptídicamente y a continuación se disocian los grupos protectores, y/o porque un compuesto básico o ácido de la fórmula 1 se convierte en una de sus sales mediante tratamiento con un ácido o base.

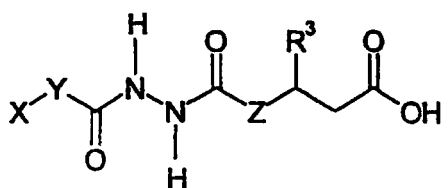
35

Anteriormente y a continuación, los restos B, Q y X₁ tienen el significado indicado en la fórmula I siempre que no se indique expresamente lo contrario.

40

B significa preferentemente un resto ciclo-(Arg-Gly-Asp-Z₁),

45



50

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys,

Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys,

Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys,

55

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg,

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn o

60

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg,

significando Z₁ en cada caso, independientemente entre sí, un resto de aminoácido o un resto di- o tripeptídico, seleccionándose los aminoácidos independientemente entre sí del grupo constituido por Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Homo-Phe, Ile, Leu, Lys, Orn, Met, Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val.

65

Q falta o significa una molécula espaciadora orgánica. Esta es preferentemente un resto [CO-(CH₂)_x-NH-]_m, [CO-CH₂-(O-CH₂CH₂)_y-NH-]_m, [CO-(CH₂)_z-CO-], [NH-(CH₂)_z-NH-], [CO-CH₂(OCH₂CH₂)_y-O-CH₂-CO-] o [NHCH₂CH₂-(OCH₂CH₂)_y-NH-] así como sus combinaciones, siendo válidos para los índices m, x, y y z los intervalos de

ES 2 306 723 T3

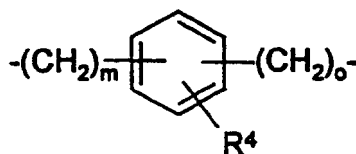
valores reivindicados en la reivindicación 3. Han resultado ser especialmente ventajosos los compuestos anteriormente citados que pueden tomar para m valores entre 1 y 8, para x valores entre 1 y 5 y para y y z valores entre 1 y 6.

X₁ significa una molécula de anclaje, preferentemente del grupo -Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂, -Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂ o -Lys-(Lys[-Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂), pudiendo ser n en cada caso e independientemente entre sí 0, 1, 2 ó 3.

Los aminoácidos y restos de aminoácidos citados en los significados de Z₁ también pueden derivarse, prefiriéndose los derivados de N-metilo, N-etilo, N-propilo, N-bencilo o C_n-metilo. Se prefieren además derivados de Asp y Glu, en especial los ésteres metílicos, etílicos, propílicos, butílicos, *tert*.-butílicos, neopentílicos o bencílicos de los grupos carboxi de cadena lateral, además también derivados de Arg que en el grupo -NH-C(=NH)-NH₂ pueden estar sustituidos con un resto benzofilo, metoxycarbonilo o etoxycarbonilo.

X significa preferentemente H₂N-C(=NH)-NH-, Het-NH-, H₂N-C(=NH)-, A-C(=NH)-NH o un resto Het.

Y significa preferentemente un resto -(CH₂)_n o



-(CH₂)_s-CH(R⁴)-(CH₂)_t o -(CH₂)_p-Het¹-(CH₂)_q.

Z significa preferentemente N-R² o CH-R², pudiendo ser R² preferentemente un átomo de H o un resto alquilo con 1 a 4 átomos de C.

R³ significa preferentemente un átomo de H, Ar, Het o un resto A, pudiendo tener A, Ar y Het uno de los significados indicados anterior o posteriormente.

R⁴ significa preferentemente un átomo de H, A, Ar, OH, OA, OAr, arilalquilo, Hal, CN, NO₂, CF₃ o un resto OCF₃. Arilalquilo significa preferentemente bencilo, feniletilo, fenilpropilo o naftilmetilo, de manera especialmente preferente bencilo.

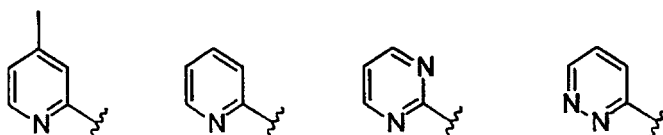
A significa preferentemente un resto COOH, NH₂ o alquilo con 1 a 6 átomos de C, sin sustituir o sustituido con COOH o NH₂. A significa preferentemente metilo, además etilo, propilo, n-butilo, isobutilo, *sec*.-butilo o *tert*.-butilo, además también n-pentilo, 1-, 2- o 3-metilbutilo, 1,1-, 1,2- o 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1-, 2-, 3- o 4-metilpentilo, 1,1-, 1,2-, 1,3-, 2,2-, 2,3- o 3,3-dimetilbutilo, 1- o 2-etilbutilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2- o 1,2,2-trimetilpropilo. Especialmente preferido para A es metilo.

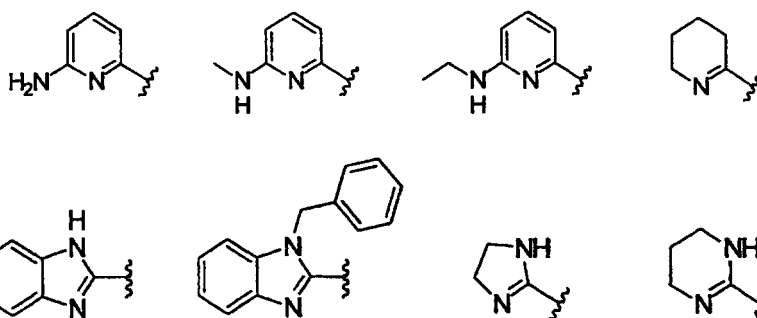
Ar significa preferentemente fenilo sin sustituir o sustituido una, dos o tres veces con A, OH, OA, CF₃, OCF₃, CN, NO₂ o Hal, que puede sustituirse con fenilo sustituido una, dos o tres veces con A, OH, OA, NH₂, OCF₃, CN, NO₂ o Hal, de tal manera que se forme un bifenilo sustituido o sin sustituir.

Por lo tanto, Ar significa preferentemente fenilo, o-, m- o p-metilfenilo, o-, m- o p-etilfenilo, o-, m- o p-propilfenilo, o-, m- o p-isopropilfenilo, o-, m- o p-*tert*.-butilfenilo, o-, m- o p-hidroxifenil-, o-, m- o p-metoxifenilo, o-, m- o p-etoxifenil-, o-, m-, p-trifluorometilfenilo, o-, m-, p-trifluorometoxifenilo, o-, m- o p-fluorofenilo, o-, m- o p-clorofenilo, o-, m- o p-bromofenilo, o-, m-, p-nitrofenilo, o-, m- o p-aminometilfenilo.

Het significa un resto heterocíclico mono o bicíclico, saturado, parcialmente o totalmente insaturado con 5 a 10 elementos de anillo, pudiendo existir de 1 a 3 átomos de N y/o 1 S u O y pudiendo estar sustituido el resto heterocíclico una o dos veces con CN, Hal, OH, NH₂, COOH, OA, CF₃, A, NO₂, Ar o OCF₃.

Het es preferentemente un piridilo sustituido en o, m o p, un pirimidilo sustituido en la posición 2, 4, 5 ó 6 o un piridazilo sustituido en la posición 3, 4, 5 ó 6, que preferentemente está sin sustituir o sustituido con un grupo metilo, etilo, propilo o un grupo metilamino, etilamino o propilamino (referido a los tres compuestos heteroaromáticos citados), así como un bencimidazolilo sustituido en 2 que no está sustituido o está sustituido con un grupo 3-metilo, 3-etilo o 3-bencilo, así como un dihidroimidazolilo sustituido en 2, tetrahidropirimidilo o tetrahidropiridilo. Ejemplos que están contenidos preferentemente en Het son:





Het¹ significa un heterociclo aromático de 5 ó 6 elementos con 1 a 4 átomos de N, O y/o S que puede estar sin sustituir o sustituido una o dos veces con F, Cl, Br, A, OA o OCF₃.

Het¹ es preferentemente un piridilo disustituido en 2,4, 3,5 ó 2,5 o un pirimidilo disustituido en 2,4, 2,5, 2,6, 4,6, un 1,3-oxazolilo o 1,3-tiazolilo disustituidos en 2,4, 2,5.

OA significa preferentemente metoxi, etoxi, propoxi o butoxi, además también pentiloxi o hexiloxi.

Het significa preferentemente F, Cl o Br, aunque también 1.

Los índices n, m, o, p, q, s y t tienen el significado indicado en la reivindicación 2, siempre que no se indique expresamente lo contrario.

Los compuestos de la fórmula I pueden poseer uno o varios centros quirales y, por consiguiente, pueden presentarse en distintas formas estereoisómeras. La fórmula I comprende todas estas formas.

Por consiguiente, son objeto de la invención en particular aquellos compuestos de la fórmula I en la que como mínimo uno de los restos mencionados tiene uno de los significados preferidos antes indicados.

Especialmente preferidos son los siguientes compuestos de la fórmula I:

- a) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^εH-[CO-(CH₂)₅-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));
- b) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^εH-[CO-(CH₂)₅-NH]₃-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));
- c) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^εH-[CO-CH₂-(O-CH₂CH₂)₆-, NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));

en la que n es igual a 1.

Los compuestos de la fórmula I y también las sustancias de partida para su preparación se preparan, por lo demás, según métodos en sí conocidos tal como se describen en la bibliografía (p. ej. en las obras estándar tales como Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart), y en concreto en las condiciones de reacción que son conocidas y apropiadas para las citadas reacciones. Puede usarse también una variante en sí conocida aunque no se cite aquí de manera más detallada.

En caso deseado, las sustancias de partida pueden formarse también *in situ* de tal manera que no se aíslan a partir de la mezcla de reacción, sino que inmediatamente se siguen haciendo reaccionar para dar los compuestos de la fórmula I.

El acoplamiento de fragmentos o el acoplamiento de ligando al conector se realiza por regla general en un disolvente inerte, disolviéndose un fragmento de ácido carboxílico (conector de fosfonato p. ej. HO-[CO-(CH₂)₅-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-CH₂-PO₃(C₂H₅)₂)₂]₂) con HATU, HOAt y 2,4,6-colidina en DMF y haciéndose reaccionar con un fragmento de amina (ciclopéptido p. ej. c[R(Pbf)G(OtBu)fK]).

Como disolventes inertes son apropiados p. ej. hidrocarburos tales como hexano, éter de petróleo, benceno, tolueno o xileno; hidrocarburos clorados tales como tricloroetileno, 1,2-dicloroetano, tetracloruro de carbono, cloroformo o diclorometano; alcoholes tales como metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol o *tert.*-butanol; éteres como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano (THF) o dioxano; éteres glicólicos tales como éter monometílico o monoetilico de etilenglicol (metilglicol o etilglicol), éter dimetílico de etilenglicol (Diglyme); cetonas tales como acetona o butanona; amidas tales como acetamida, N-metilpirrolidona, dimetilacetamida o dimetilformamida (DMF); nitrilos tales como acetonitrilo; sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido (DMSO); disulfuro de carbono; ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico o ácido acético; compuestos nitrogenados tales como nitrometano o nitrobenzenceno; ésteres tales como acetato de etilo, agua o mezclas de los disolventes mencionados.

ES 2 306 723 T3

Los compuestos cíclicos pueden prepararse ciclando los compuestos lineales tal como se describe p. ej. en el documento DE 43 10 643, en Houben-Weyl, I.c., tomo 15/II, páginas 1 a 806 (1974) o lo describen S. Zimmer, E. Hoffmann, G. Jung y H. Kessler, Liebigs Ann. Chem. 1993, 497-501.

5 Los péptidos lineales pueden sintetizarse p. ej. según R. B. Merrifield, Angew. Chemie 1985, 97, 801-812.

Por lo demás, los compuestos lineales de cadena abierta, como p. ej. los compuestos de la fórmula I, se pueden preparar según métodos habituales de la síntesis de aminoácidos y de péptidos, p. ej. también por síntesis en fase sólida según Merrifield (véase también p. ej. B. F. Gysin y R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 94, 3102 ss. (1972)).

10 Los compuestos de la fórmula I pueden obtenerse además liberándolos de sus derivados funcionales mediante solvólisis, en especial hidrólisis, o mediante hidrogenólisis.

15 Sustancias de partida preferidas para la solvólisis o la hidrogenólisis son aquellas que en lugar de uno o varios grupos amino y/o hidroxí libres contienen los correspondientes grupos amino y/o hidroxí protegidos, preferentemente aquellos que en lugar de un átomo de H que está unido a un átomo de N llevan un grupo protector de amino, p. ej. aquellos que corresponden a la fórmula 1 pero que en lugar de un grupo NH₂ contienen un grupo NHR' (en donde R' significa un grupo protector de amino, p. ej. BOC o CBZ).

20 Además, se prefieren sustancias de partida que en lugar del átomo de H de un grupo hidroxí llevan un grupo protector de hidroxí, p. ej. aquellos que corresponden a la fórmula 1 pero que en lugar de un grupo hidroxifenilo contienen un grupo R''O-fenilo (en donde R'' significa un grupo protector de hidroxí).

25 En la molécula de la sustancia de partida pueden estar también presentes varios grupos amino y/o hidroxí protegidos, iguales o distintos. En el caso de que los grupos protectores presentes sean distintos entre sí, en muchos casos pueden disociarse selectivamente.

La expresión "grupo protector de amino" es conocida en general y se refiere a grupos que son adecuados para proteger (bloquear) un grupo amino de las reacciones químicas, pero que pueden eliminarse con facilidad después de haberse realizado en otros sitios de la molécula la reacción química deseada. Grupos típicos de este tipo son en especial grupos acilo, arilo, aralcoximetilo o aralquilo sustituidos o sin sustituir. Ya que después de la reacción deseada (o sucesión de reacciones) se eliminan los grupos protectores de amino, su tipo y su tamaño no son por lo demás críticos; no obstante, se prefieren aquellos con 1-20, en especial 1-8 átomos de C. La expresión "grupo acilo" debe entenderse en el contexto de la presente invención en su sentido más amplio. Comprende grupos acilo derivados de ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos alifáticos, aralifáticos, aromáticos o heterocíclicos, así como en especial grupos alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo y sobre todo aralcoxycarbonilo. Ejemplos de grupos acilo de este tipo son alcanofilo tal como acetilo, propionilo, butirilo; aralcanofilo tal como fenilacetilo; arofilo tal como benzoílo o toluilo; ariloxialcanofilo tal como POA; alcoxycarbonilo tal como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo, BOC, 2-yodoetoxycarbonilo; aralquilo oxycarbonilo tal como CBZ ("carbobenzoílo"), 4-metoxibenciloxycarbonilo, FMOC; arilsulfonilo tal como Mtr, Pbf o Pmc. Grupos protectores de amino preferidos son BOC y Mtr, además CBZ, Fmoc, bencilo y acetilo.

La expresión "grupo protector de hidroxí" también es conocida en general y se refiere a grupos que son adecuados para proteger un grupo hidroxí de las reacciones químicas, pero que pueden eliminarse con facilidad después de haberse realizado en otros sitios de la molécula la reacción química deseada. Grupos típicos de este tipo son los grupos arilo, aralquilo o acilo sustituidos o sin sustituir que se han mencionado anteriormente, además también grupos alquilo. La naturaleza y el tamaño de los grupos protectores de hidroxí no son críticos ya que vuelven a eliminarse después de la reacción química o sucesión de reacciones químicas deseadas; se prefieren grupos con 1-20, en especial 1-10 átomos de C. Ejemplos de grupos protectores de hidroxí son, entre otros, bencilo, p-nitrobenzoílo, p-toluenosulfonilo, *tert*.-butilo y acetilo, prefiriéndose en especial bencilo y *tert*.-butilo. Los grupos COOH de los ácidos asparagínico y glutámico se protegen preferentemente en forma de sus ésteres *tert*.-butílicos (p. ej. Asp(OtBu)).

La liberación de los compuestos de la fórmula I de sus derivados funcionales se consigue - según el grupo protector usado - p. ej. con ácidos fuertes, de manera conveniente con TFA o ácido perclórico, aunque también con otros ácidos inorgánicos fuertes tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, ácidos carboxílicos orgánicos fuertes tales como ácido tricloroacético o ácidos sulfónicos tales como ácido bencenosulfónico o ácido p-toluenosulfónico. La presencia de un disolvente inerte adicional es posible, aunque no siempre es necesaria. Como disolventes inertes resultan apropiados preferentemente, por ejemplo, ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido acético, éteres como tetrahydrofurano o dioxano, amidas como DMF, hidrocarburos halogenados como diclorometano, además también alcoholes tales como metanol, etanol o isopropanol, así como agua. Entran además en consideración mezclas de los disolventes anteriormente mencionados. El TFA se usa preferentemente en exceso sin la adición de otro disolvente, el ácido perclórico en forma de una mezcla de ácido acético y ácido perclórico al 70% en la proporción 9:1. Las temperaturas de reacción para la disociación se encuentran convenientemente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 50°, se trabaja preferentemente a entre 15 y 30° (temperatura ambiente).

65 Los grupos BOC, OtBu, Pbf, Pmc y Mtr pueden disociarse p. ej. preferentemente con TFA en diclorometano o con HCl aproximadamente 3 a 5 n en dioxano a 15-30°, el grupo FMOC con una disolución de aproximadamente el 5 al 50% de dimetilamina, dietilamina o piperidina en DMF a 15-30°.

ES 2 306 723 T3

El grupo tritilo se utiliza para la protección de los aminoácidos histidina, asparagina, glutamina y cisteína. La disociación se realiza, según el producto final deseado, con TFA/tiofenol al 10%, disociándose el grupo tritilo de todos los aminoácidos mencionados, al utilizar TFA/anisol, TFA/tioanisol o TFA/TIPS/H₂O el grupo tritilo se disocia sólo de His, Asn y Gln, mientras que permanece en la cadena lateral de Cys.

El grupo Pbf (pentametilbenzofuranilo) se utiliza para la protección de Arg. La disociación se realiza p. ej. con TFA en diclorometano.

Los grupos protectores que pueden eliminarse hidrogenolíticamente (p. ej. CBZ o bencilo) pueden disociarse p. ej. tratándolos con hidrógeno en presencia de un catalizador (p. ej. de un catalizador de metal precioso tal como paladio, convenientemente sobre un soporte tal como carbono). Como disolventes son apropiados los mencionados anteriormente, en especial p. ej. alcoholes tales como metanol o etanol o amidas tales como DMF. La hidrogenolisis se lleva a cabo por regla general a temperaturas entre aproximadamente 0 y 100°C y presiones entre aproximadamente 100 y 20.000 kPa, preferentemente a 10-30°C y 100-1.000 kPa.

Una hidrogenolisis del grupo CBZ se consigue bien p. ej. en Pd del 5 al 10%/C en metanol o con formiato de amonio (en lugar de hidrógeno) en Pd/C en metanol/DMF a 10-30°C.

Una base de la fórmula I puede transformarse con un ácido en la correspondiente sal de adición de ácido, por ejemplo haciendo reaccionar cantidades equivalentes de la base y del ácido en un disolvente inerte tal como etanol y a continuación evaporándolo. Para esta reacción entran en consideración en especial ácidos que proporcionan sales fisiológicamente inocuas. Pueden usarse así ácidos inorgánicos, p. ej. ácido sulfúrico, ácido nítrico, halogenuros de hidrógeno tales como cloruro de hidrógeno o ácido bromhídrico, ácidos fosfóricos tales como ácido ortofosfórico, ácido sulfámico, además ácidos orgánicos, en especial ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos o ácidos sulfúricos alifáticos, alicíclicos, aralifáticos, aromáticos o heterocíclicos de una o más bases, p. ej. ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácidos metanosulfónico o etanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenmono- y disulfónico, ácido laurilsulfúrico. Sales con ácidos fisiológicamente no inocuos, p. ej. picratos, pueden usarse para aislar y/o purificar compuestos de la fórmula I.

Por otro lado, un ácido de la fórmula I se puede transformar en una de sus sales metálicas o de amonio fisiológicamente inocuas haciéndolo reaccionar con una base. Como sales entran en consideración a este respecto en especial las sales de sodio, de potasio, de magnesio, de calcio y de amonio, además de sales de amonio sustituidas, p. ej. las sales de dimetil-, dietil- o diisopropilamonio, sales de monoetanol-, dietanol- o diisopropanolamonio, sales de ciclohexil-, dicitclohexilamonio, sales de dibenciletilendiamonio, además de p. ej. sales con arginina o lisina.

Con anterioridad y a continuación todas las temperaturas de indican en °C. En los ejemplos siguientes "preparación habitual" significa: si es necesario se añade agua, si es necesario se ajusta, según la constitución del producto final, a valores del pH entre 2 y 10, se extrae con acetato de etilo o diclorometano, se separa, se seca la fase orgánica sobre sulfato sódico, se evapora y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice y/o mediante cristalización. Valores R_f en gel de sílice; fase móvil: acetato de etilo/metanol 9:1.

TR = Tiempo de retención (minutos) para HPLC en los siguientes sistemas:

[A]

Columna: YMC ODS A RP 5C₁₈, 250 x 4,6 mm

Eluyente A: 0,1% de TFA en agua

Eluyente B: 0,1% de TFA en acetonitrilo

Flujo: 1 ml/min

Gradiente: 0 - 50% de B/30 min

[B]

como [A];

Gradiente: 5 - 50% de B/30 min

[C]

como [A];

5 Gradiente: 10 - 50% de B/30 min

Espectrometría de masas (EM):

10 EI (ionización por impacto electrónico) M^+ FAB (bombardeo con átomos rápidos) $(M+H)^+$ ESI (ionización por electropulverización) $(M+H)^+$

15 Resina DMPP representa resina 4-(2',4'-dietoxifenil-hidroximetil)fenoxi, que permite p. ej. la síntesis de péptidos con cadenas laterales protegidas, resina TCP significa resina de cloruro de tritilo-poliestireno.

20 Los ejemplos siguientes describen por un lado el acoplamiento de fragmentos y la disociación de ésteres fosfónicos, y por otro lado la síntesis de derivados de ciclopéptido seleccionados con conector de fosfonato. El procedimiento para el recubrimiento de distintos cuerpos de moldeo de metal o materiales de sustitución ósea se describe con más detalles basándose en los ejemplos 7 a 9.

Ejemplo 1

25 *Acoplamiento de fragmentos en disolución*30 0,2 mmol de fragmentos de ácido carboxílico (conector de fosfonato, p. ej. $HO-[CO-(CH_2)_5-NH]_2-Lys-[Lys-(CO-CH_2-CH_2-PO_3(C_2H_5)_2)_2]$), 0,98 eq de HATU, 1:1 eq de HOAt y 10 eq de 2,4,6-colidina se disuelven en 2 ml de DMF. Al cabo de 1,5 h se añade 1 eq de fragmentos de amina (ciclopéptido, p. ej. $c[R(Pbf)G(OtBu)fK]$). Se deja agitar durante 24 h a temperatura ambiente y se purifica el producto por medio de HPLC preparativa.

Ejemplo 2

*Disociación de ésteres fosfónicos en conectores de fosfonato*35 El péptido con grupos de ésteres fosfónicos se disuelve en una mezcla de $CHCl_3$ abs. y TMSBr 10 : 1 o eventualmente se suspende en el baño ultrasónico. Después de 3 días en agitación y eventualmente con suspensión ocasional del sedimento en baño ultrasónico se separa el disolvente por destilación. El residuo se liofiliza del H_2O .

40 La disociación de los grupos ácidos protectores de cadenas laterales se realiza según las técnicas de trabajo convencionales.

Ejemplo 3

45 *Síntesis de los conectores de fosfonato*

50 Los conectores de fosfonato se sintetizaron en una síntesis de péptidos en fase sólida según la estrategia Fmoc (véase G. B. Fields, R. L. Nobie, Int. J. Pept. Protein Res. 1990, 35, 161-214).

Como último elemento se acopló ácido 3-dietilfosfonopropiónico.

*Síntesis de ácido 3-dietilfosfonopropiónico**Éster bencílico del ácido 3-bromopropiónico*55 58,3 mmol de cloruro de ácido 3-bromopropiónico (10,0 g) y 1 eq de alcohol bencílico (6,3 g) se disuelven en 100 ml de DCM seco con agitación en un matraz redondo de 250 ml con tubo de cloruro de calcio. Después de 2 días se añaden a la preparación 200 ml de $CHCl_3$ y se extrae 2 veces la fase orgánica con disolución saturada de $NaHCO_3$. Después de secar sobre $MgSO_4$ se separa el disolvente por destilación y se obtiene el producto como un líquido incoloro.60 Rendimiento: 13,8 g (56,8 mmol, 97%); $R_f = 0,75$ (H:EE 1:1).RMN ($CDCl_3$):65 1H (250 MHz): $\delta = 7,35$ (s, 5H; H ar), 5,16 (s, 2H; CH_2-OCO), 3,58 (t, $^3J(H,H) = 7$ Hz, 2H; CH_2Br), 2,95 (t, $^3J(H,H) = 7$ Hz, 2H; CH_2CO). CG-EM: $m^+ = 242,0$.

ES 2 306 723 T3

Éster bencílico del ácido 3-dietilfosfonopropiónico

56,8 mmol de éster bencílico del ácido 3-bromopropiónico (13,8 g) y 1,7 eq de fosfito de trietilo (16,0 g) se calientan hasta 140°C con agitación en un aparato de destilación hermetizado con un globo de gas como compensador de presión. El bromoetano formado en el curso de la reacción se elimina de manera continua por destilación y se recoge en un matraz de destilación enfriado a 0°C. Después de 4 h, el residuo oleoso restante se destila mediante fraccionamiento a alto vacío a través de una columna de Vigreux, el producto es un aceite incoloro. Rendimiento 12,1 g (40,3 mmol, 71%), ligeramente impurificado, $R_f = 0,33$ (A:H 2:3).

Para tener una mayor pureza hay que purificar el producto eventualmente mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente A:H 2:3).

RMN ($CDCl_3$):

1H (250 MHz): $\delta = 7,31$ (s, 5H; H ar), 5,10 (s, 2H, CH_2-OCO), 4,05 (m, 4H; CH_2OP), 2,61 (m, 2H; CH_2CO), 2,04 (m, 2H; CH_2P), 1,26 (t, $^3J(H,H) = 7$ Hz, 6H; CH_3).

^{31}P (101,256 MHz): $\delta = 28,5$ (s).

CG-EM: $m^+ = 300,0$.

Ácido 3-dietilfosfonopropiónico

Se disuelven 40,3 mmol de éster bencílico del ácido 3-dietilfosfonopropiónico (12,1 g) en 100 ml de etanol y se mezclan con 2 g de catalizador (Pd al 5%/C). Después de agitar durante 4 h en atmósfera de H_2 se elimina por filtración el carbón activo y por destilación el disolvente. El producto precipita en forma de un aceite incoloro que a temperatura ambiente solidifica lentamente para dar un sólido incoloro. El producto está ligeramente contaminado con éster etílico del ácido 3-dietilfosfonopropiónico, que eventualmente puede transferirse a la fase orgánica agitando varias veces con agua y hexano y se separa. Rendimiento: 8,2 g (39,0 mmol, 97%).

RMN ($CDCl_3$):

1H (250 MHz): $\delta = 10,60$ (sa, 1H; $COOH$), 4,07 (m, 4H; CH_2O), 2,59 (m, 2H; CH_2CO), 2,06 (m, 2H; CH_2P), 1,29 (t, $^3J(H,H) = 7$ Hz, 6H; CH_3).

^{13}C (62,896 MHz): $\delta = 174,5$ (d, $J(C,P) = 18,5$ Hz; $COOH$), 62,1 (d, $J(C,P) = 6,6$ Hz; CH_2-O), 27,1 (d, $J(C,P) = 3,8$ Hz; CH_2-COOH), 20,7 (d, $J(C,P) = 144,9$ Hz; CH_2-P), 16,2 (d, $J(C,P) = 6,1$ Hz; CH_3).

^{31}P (101,256 MHz): $\delta = 29,5$ (s).

Datos analíticos de los ciclopeptidos con conectores de fosfonato

Ejemplo 4

2 ácidos aminohexanoicos en el espaciador

Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys($N^8H-[CO-(CH_2)_5-NH]_2$)-Lys-[Lys-(CO- $CH_2-CH_2-PO_3H_2$) $_2$])

EM (ESI): m/z (%): 1756,9 (100) [$m - H^+$], 1778,8 (48) [$m + Na^+ - 2H^+$], 1794,9 (18) [$m + K^+ - 2H^+$],

RMN ($[D_6]DMSO$):

^{31}P (101,256 MHz): $\delta = 29,63$ (s, 1P), 29,59 (s, 1P), 29,57 (s, 1P), 29,38 (s, 1P).

Ejemplo 5

3 ácidos aminohexanoicos en el espaciador

Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys($N^8H-[CO-(CH_2)_5-NH]_3$)-Lys-[Lys-(CO- $CH_2-CH_2-PO_3H_2$) $_2$])

EM (ESI): m/z (%): 934,9 (100) [$m - 2H^+$], 1870,0 (27) [$m - H^+$],

RMN ($[D_6]DMSO$):

^{31}P (101,256 MHz): $\delta = 29,57$ (s, 1P), 29,51 (s, 2P), 29,33 (s, 1P).

Ejemplo 6

2 ácidos heptaetilenglicolaminocarboxílicos en el espaciador

5 Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(N^εH-[CO-CH₂ (-O-CH₂CH₂)₆-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-CH₂-PO₃H₂)₂]₂))

EM (ESI): *m/z* (%): 1086,4 (100) [m - 2H⁺], 1097,7 (73) [m + Na⁺ - 3H⁺]. RMN ([D₆]DMSO): ³¹P (101,256 MHz): δ = 29,66 (s, 1P), 29,61 (s, 1 P), 29,59 (s, 1P), 29,45 (s, 1P).

10 Además, todos los péptidos anteriormente citados se caracterizaron mediante espectroscopía de RMN ¹H (250 MHz), se obtuvieron los espectros esperados.

Ejemplo 7

15 Cuerpos de moldeo de Ti o de TiAl₆V₄ con un diámetro de 10 mm y una altura de 1-2 mm se limpian previamente en agua destilada a 60°C en el baño ultrasónico, a continuación se lavan 30 minutos con acetona y después dos veces con agua destilada y se dejan secar ocho horas en la estufa de secado.

20 Los cuerpos de moldeo se transfieren a 48 pocillos (Costar, “non-tissue culture treated” N° de art. 3574). Para la fijación de las moléculas B bioactivas que proporcionan la adhesión celular (pudiendo ser B un ciclopéptido, un peptidomimético o un péptido lineal según la reivindicación 2) a los cuerpos de moldeo preparados se preparan disoluciones madre que contienen las moléculas B (“disoluciones B”) en una concentración final de 1 mM en un tampón acuoso Tris-HCl (10 mM, pH 8,7), Tris-HClO₄ (10 mM, pH 8,7) o PBS, pH 7,4. Al final, mediante dilución con PBS, pH 7,4, se preparan series de concentración con las concentraciones finales de las “disoluciones B” de 1 nM, 10 nM, 25 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM respectivamente.

Cada uno de los cuerpos de moldeo se recubre con 250 μl de la correspondiente disolución B y a continuación se incuba durante 18-24 horas a temperatura ambiente. Para eliminar las moléculas B no ligadas se lavan las muestras tres veces con PBS, pH 7,4, y se almacenan durante la noche en PBS, pH 7,4, a 4°C.

30 Añadiendo 250 μl/cuerpo de moldeo de una disolución al 5% de BSA (albúmina sérica bovina “Bovine Serum Albumine”), pH 7,4, incubando a continuación durante 2 horas a temperatura ambiente y lavando una vez con PBS, pH 7,4, se bloquean los sitios de unión celular no específicos.

35 Como controles negativos actúan cuerpos de moldeo de Ti o TiAl₆V₄ que en lugar de haber sido tratados con disoluciones B lo han sido con las correspondientes disoluciones tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,7; Tris-HClO₄ 10 mM, pH 8,7; PBS, pH 7,4).

40 El grado de los recubrimientos obtenidos sobre los cuerpos de moldeo se evalúa analíticamente y la eficacia biológica se determina *in vitro* por medio de una prueba de adhesión celular.

Ejemplo 8

45 Se fabrican cuerpos de moldeo de marfil como modelo para un material natural de sustitución ósea con un diámetro de 100 mm y una altura de 100 μm mediante fresado de cilindros de 10 mm de diámetro y posterior serrado en un grosor de 100 μm en una sierra de baja velocidad “low speed saw” Buehler ISOMET. A continuación se limpian las muestras 10 minutos en agua dest. a 60°C en el baño ultrasónico y después se lavan dos veces con agua dest. y se secan 8 horas en la estufa de secado.

50 Para el recubrimiento de los cuerpos de moldeo con disoluciones B se procede tal como se ha descrito en el ejemplo 7.

El grado de recubrimiento obtenido sobre los cuerpos de moldeo se evalúa analíticamente y la eficacia biológica se determina *in vitro* por medio de una prueba de adhesión celular.

Ejemplo 9

55 Se fabrican cuerpos de moldeo del material de sustitución ósea que puede obtenerse comercialmente Endobon® (empresa Biomet Merck, Alemania) con un diámetro de 10 mm y una altura de 100 μm mediante fresado de cilindros de 10 mm de diámetro y posterior serrado en un grosor de 100 μm en una sierra de baja velocidad “low speed saw” Buehler ISOMET. A continuación se limpian las muestras 10 minutos en agua destilada a 60°C en el baño ultrasónico y después se lavan dos veces con agua destilada y se secan 8 horas en la estufa de secado.

65 Para el recubrimiento de los cuerpos de moldeo con las “disoluciones B” se procede tal como se ha descrito en el ejemplo 7.

El grado del recubrimiento obtenido sobre los cuerpos de moldeo se evalúa analíticamente y la eficacia biológica se determina *in vitro* por medio de una prueba de adhesión celular.

ES 2 306 723 T3

Ejemplo de prueba de adhesión celular

Se analizó la adhesión de cultivos *in vitro* de osteoblastos MC3T3 H1 de ratón a superficies de material recubiertas de péptido-RGD. Para ello se sembraron 50.000 células/cm² y después de una hora de incubación en medio libre de suero a 37°C/95% de humedad del aire se determinó la proporción de células adheridas.

$$\text{Índice de adherencia celular [\%]} = \text{células adheridas/células sembradas} \times 100$$

10 Péptido: índice de adherencia celular [%]
Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(N⁸H-[CO-(CH₂)₅-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-CH₂-PO₃H₂)₂]₂)): 75
15 Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(Ne⁶H-[CO-(CH₂)₅-NH]₃-Lys-[Lys-(CO-CH₂-CH₂-PO₃H₂)₂]₂)): 62

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula 1



en la que

B es una molécula bioactiva que se une a integrina

Q falta o es una molécula espaciadora orgánica seleccionada del grupo



así como su combinación

en las que

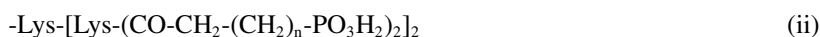
m es en cada caso, independientemente entre sí, 1 a 20

x es 1 a 12

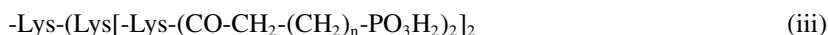
y es 1 a 50

z es 1 a 12,

X₁ significa una molécula de anclaje seleccionada del grupo

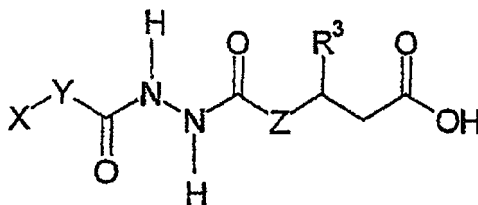


o



y n es en cada caso, independientemente entre sí, 0, 1, 2 ó 3, y en las que un grupo amino libre del grupo B está unido peptídicamente entre sí a un grupo carboxilo libre de la molécula espaciadora Q o de la molécula de anclaje X₁, o un grupo amino libre del resto Q a un grupo carboxilo libre del resto X₁, así como sus sales.

2. Compuesto según la reivindicación, en el que el grupo B se selecciona del grupo



(v)

ES 2 306 723 T3

y

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys (vi)

5 Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys (vii)

Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg-Lys (viii)

10 Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn-Arg (ix)

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn (x)

Thr-Trp-Tyr-Lys-Ile-Ala-Phe-Gln-Arg (xi)

15 en el que

Z_1 es en cada caso, independientemente entre sí, un resto de aminoácido o un resto de di- o tripéptido, seleccionándose independientemente entre sí los aminoácidos del grupo constituido por Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Homo-Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val,

20 en el que para (v)

X es $H_2N-C(=NH)-NH$, $Het-NH-$, $H_2N-C(=NH)-$, $A-C(=NH)-NH$ o $Het-$

25 Y es $-(CH_2)_n-$ o



35 ,

$-(CH_2)_s-CH(R^4)-(CH_2)_r$ o $-(CH_2)_p-Het^1-(CH_2)_q-$

40 Z es $N-R^2$ o $CH-R^2$

R^2 es H o alquilo con 1 a 4 átomos de C

R^3 es H, Ar, Het o A

45 R^4 es H, A, AR, OH, OA, OAR, arilalquilo, Hal, CN, NO_2 , CF_3 o OCF_3 ,

A es $COOH$, NH_2 o alquilo con 1-6 átomos de C, sin sustituir o sustituido con $COOH$ o NH_2

50 Ar es fenilo sin sustituir o sustituido una, dos o tres veces con A, OH, OA, CF_3 , OCF_3 , CN, NO_2 o Hal que puede estar sustituido con un fenilo sustituido una, dos o tres veces con A, OH, OA, NH_2 , OCF_3 , CN, NO_2 o Hal de tal manera que se forma un bifenilo sin sustituir o sustituido,

Hal es F, Cl, Br o I,

55 Het es un resto heterocíclico mono o bicíclico saturado, parcialmente o totalmente insaturado con 5 a 10 elementos de anillo, pudiendo existir de 1 a 3 átomos de N y/o 1 átomo de S u O y pudiendo estar sustituido el resto heterocíclico una o dos veces con CN, Hal, OH, NH_2 , $COOH$, OA, CF_3 , A, NO_2 , Ar o OCF_3 ,

60 Het¹ es un heterociclo aromático de 5 ó 6 miembros con 1 a 4 átomos de N y/o S que puede estar sin sustituir o sustituido una o dos veces con F, Cl, Br, A, OA o OCF_3 ,

n es 4, 5 ó 6,

m, o, p, q son 0, 1 ó 2

65 s, t son 0, 1, 3, 4 ó 5.

3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que Q se selecciona del grupo



así como su combinación

en las que

m es en cada caso, independientemente entre sí, 1 a 8

x es 1 - 5

y es 1 - 6 y

z es 1 - 6.

4. Compuestos de la fórmula 1 según la reivindicación 1

a) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(N^εH-[CO-(CH₂)₅-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));

b) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(N^εH-[CO-(CH₂)₅-NH]₃-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));

c) Ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(N^εH-[CO-CH₂(-O-CH₂CH₂)₆-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂-(CH₂)_n-PO₃H₂)₂]₂));

en los que n es igual a 1.

5. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como medicamento para el tratamiento de metástasis mediante inhibición de la angiogénesis y de la propagación de células tumorales, para el tratamiento antimicrobiano y antiséptico de inflamaciones y defectos causados por la incorporación de implantes y de enfermedades osteolíticas tales como osteoporosis, trombosis, infarto de miocardio y arteriosclerosis, así como para acelerar y reforzar el proceso de integración de implantes o superficies biocompatibles en el tejido mediante enriquecimiento selectivo de células en implantes.

6. Implante adecuado para órganos humanos y animales constituido por una matriz de soporte y una capa de una molécula bioactiva que media en la adhesión celular que rodea esta matriz, **caracterizado** porque la capa circundante está formada por un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5, existiendo entre la matriz de soporte y este compuesto un enlace iónico o por adsorción.

7. Implante según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la matriz de soporte y/o su superficie es un metal o un óxido metálico.

8. Implante según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la matriz de soporte y/o su superficie es un material de sustitución ósea o dental.

9. Implante según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el material de sustitución ósea o dental está constituido por mezclas de fosfato de calcio.

10. Procedimiento para la preparación de un compuesto según la reivindicación 1, así como sus sales, **caracterizado** porque una molécula B bioactiva que puede estar provista de grupos protectores y una molécula espaciadora-de anclaje (Q-X₁) o molécula de anclaje (X₁) provista de grupos protectores se unen peptídicamente entre sí y a continuación se disocian los grupos protectores, y/o porque un compuesto básico o ácido de la fórmula 1 se convierte en una de sus sales mediante tratamiento con un ácido o base.

11. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4 para preparar un medicamento para el tratamiento de metástasis mediante inhibición de la angiogénesis y de la propagación de células tumorales, para el tratamiento antimicrobiano y antiséptico de inflamaciones y defectos causados por la incorporación de implantes y de enfermedades osteolíticas tales como osteoporosis, trombosis, infarto de miocardio y arteriosclerosis, así como para acelerar

ES 2 306 723 T3

y reforzar el proceso de integración de implantes o superficies biocompatibles en el tejido mediante enriquecimiento selectivo de células en implantes.

12. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 15 para recubrir mediante enlace iónico o por
5 adsorción implantes para órganos humanos y animales.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 306 723 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biomet Deutschland GmbH

5 <120> Conjugados de péptidos y peptidomiméticos con propiedades inhibidoras de integrina

<130> BMM261EP

<140> EP 01960612

10 <141> 2001-08-02

<160> 9

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

30 <222> (1)..(12)

<223> péptido

<400> 1

35 **Thr Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn Arg Lys**
1 5 10

<210> 2

40 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido

<220>

50 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(11)

<223> péptido

55 <400> 2

Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn Arg Lys
1 5 10

<210> 3

60 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Péptido

<220>

ES 2 306 723 T3

	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(10)
	<223> péptido
5	<400> 3
	Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn Arg Lys
	1 5 10
10	<210> 4
	<211> 11
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Péptido
20	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(11)
25	<223> péptido
	<400> 4
	Thr Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn Arg
	1 5 10
30	<210> 5
	<211> 10
	<212> PRT
35	<213> Secuencia artificial
	<220>
40	<223> Péptido
	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(10)
45	<223> péptido
	<400> 5
50	Thr Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn
	1 5 10
	<210> 6
	<211> 9
55	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
60	<223> Péptido
	<220>
	<221> PÉPTIDO
65	<222> (1)..(9)
	<223> péptido

ES 2 306 723 T3

<400> 6

Thr Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg
1 5

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

15

<220>

<221> misc_feature

<223> ciclopentapéptido

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

25

<223> Xaa en la posición 4 es D-Phe

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (5)..(5)

<223> xaa en la posición 5 es Lys(NH-[CO-(CH₂)₅-NH]₂-Lys-[Lys(CO-CH₂CH₂PO₃H₂)₂)₂)

<400> 7

35

Arg Gly Asp Xaa Xaa
1 5

<210> 8

<211> 5

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Péptido

<220>

50

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> ciclopentapéptido

55

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> xaa en la posición 4 es D-Phe

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

65

<223> xaa en la posición 5 es Lys(NH-[CO-(CH₂)₅-NH]₃-Lys-[Lys(CO-CH₂CH₂PO₃H₂)₂)₂)

ES 2 306 723 T3

<400> 8

Arg Gly Asp Xaa Xaa
1 5

5 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> ciclopentapéptido

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

25 <223> xaa en la posición 4 es D-Phe

<220>
 <221> misc_feature

30 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 es Lys(NH-[CO-CH₂(-O-CH₂CH₂)₆-NH]₂-Lys-[Lys-(CO-CH₂CH₂PO₃H₂)₂)₂))

35 <400> 9

Arg Gly Asp Xaa Xaa
1 5

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) N° de publicación : ES 2 306 723 T3

(21) Número de solicitud: E 01960612

MODIFICACIÓN DEL FOLLETO DE PATENTE

Debido a la publicación de corrección de errores de la Oficina Europea de Patentes, folleto B9, boletín de fecha 08.04.2009, la página 6 del folleto T3, desde las líneas 4 a 22, queda como sigue:

TMSBr bromuro de trimetilsililo
Trt tritilo (trifenilmetilo)

Siempre que los aminoácidos anteriormente citados puedan aparecer en varias formas enantioméricas, con anterioridad y a continuación, p. ej. como componente de los compuestos de la fórmula 1, se incluyen todas estas formas y también sus mezclas (p. ej. las formas DL). Además los aminoácidos, p. ej. como componente de compuestos de la fórmula 1, pueden estar provistos de los correspondientes grupos protectores en sí conocidos. Como ciclopéptidos pueden usarse también sobre todo modificaciones de la cadena lateral de la arginina, tal como se realizó p. ej. en los antagonistas α, β_3 no peptídicos (p. ej. por R. Keenan y col., Abstr. Pap. 211th ACS National Meeting (Nueva Orleans, EE.UU.) 1996, MEDI 236), como p. ej. derivados de bencimidazol en lugar del grupo guanidina.

En lugar de los compuestos según la invención también pueden usarse los llamados derivados de profármacos, es decir, compuestos de la fórmula 1 modificados con grupos alquilo o acilo, azúcares u oligopéptidos que en el organismo se disocian rápidamente para dar los compuestos eficaces según la invención.