



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 211**

51 Int. Cl.:
C07K 14/655 (2006.01)
A61K 38/31 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05101866 .1**
96 Fecha de presentación : **10.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1598366**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Análogos de somatostatina.**

30 Prioridad: **10.03.2004 IT FI04A0057**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Advanced Accelerator Applications S.A.**
20 rue Diesel
01630 Saint Genis Pouilly, FR

72 Inventor/es: **Giuntini, Mauro;**
Ginanneschi, Mauro;
Chelli, Mario y
Papini, Anna Maria

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

ES 2 313 211 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

Análogos de somatostatina.

5 **Campo técnico**

La invención descrita en el presente documento se refiere a compuestos análogos a la somatostatina.

Estado de la técnica

10

Es bien sabido que la somatostatina es una hormona y su actividad biológica reguladora desempeña un papel importante puesto que esta sustancia inhibe la liberación de diversas otras hormonas como glucagón, hormona del crecimiento, insulina, gastrina. Además, debido a su distribución en el sistema nervioso central y en la médula espinal, este péptido puede desempeñar un papel en la transmisión neuronal.

15

No obstante, el uso de somatostatina como fármaco está lastrado por su semivida muy corta *in vivo* (2 ó 3 min). Este hecho ha suscitado una investigación intensa y continua de agonistas de esta hormona para aplicaciones farmacológicas en diferentes campos de la medicina, desde terapia contra el cáncer y acromegalia a terapia contra la diabetes, artritis reumatoide y enfermedad de Alzheimer.

20

Hasta la fecha, se han descubierto muchos análogos de la somatostatina, algunos de ellos muy potentes, generalmente formados de péptidos cíclicos de seis a ocho aminoácidos.

25

Entre ellos, cabe mencionar la sandostatina u octreótido que presenta un tiempo de semivida prolongado *in vivo* (de 60 a 90 minutos) y es 2000 veces más activo que la propia somatostatina. Este producto también es un portador de radioisótopos cuando se conjuga con agentes quelantes tales como DOTA (DOTA-TOC) para el diagnóstico y la radioterapia de tumores.

30

No obstante, a pesar de las ventajas anteriormente mencionadas, el octreótido no siempre presenta los efectos deseados, principalmente en lo que se refiere a la eficacia antimitótica en tumores de mama, próstata y colon. Además, el puente disulfuro de esta molécula está sometido al ataque de agentes reductores endógenos (es decir, glutatión oxidasa o tiorredoxín reductasa) y oxidantes exógenos así como agentes básicos y nucleófilos.

35

El documento US 2002/0052315 describe derivados de octreótido en los que el puente disulfuro se ha remplazado por, entre otros, un grupo amida, tioéter, o tioéster.

Como consecuencia de los argumentos anteriormente presentados parece que es muy importante la preparación de nuevos agonistas de la somatostatina para fines terapéuticos.

40 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención permite la resolución de los problemas anteriormente mencionados gracias a los compuestos con la fórmula (I) como se define a continuación:

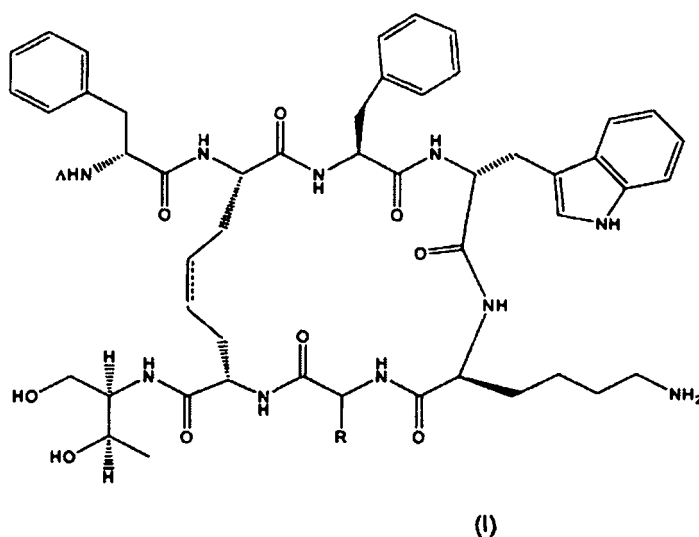
45

50

55

60

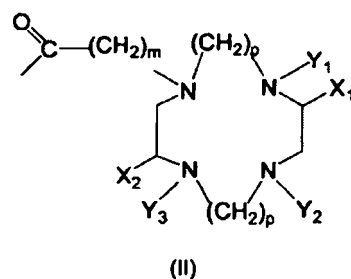
65



en la que el símbolo - - - - es un enlace simple o doble;

ES 2 313 211 T3

- A es H, el agente quelante DTPA o un macrociclo de fórmula (II):



en la que Y_1 , Y_2 e Y_3 , que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan del grupo constituido por hidrógeno, $-(CH_2)_n$ -COOH, en la que n es un número entero entre 1 y 6, y p es el número entero 2 ó 3.

R es un aminoácido como Thr, D- o L-Phe, en otro caso D- o L-Phe *orto* y/o *para* sustituida con grupos -OR' en los que R' es alquilo lineal o ramificado, bencilo o bencilo sustituido en el anillo aromático con grupos hidrófobos.

Un ejemplo de macrociclo con la fórmula (II) según la invención es el agente quelante DOTA.

El compuesto objeto de la invención descrito en el presente documento se prepara usando procedimientos y reactivos conocidos que se conocen o que se pueden obtener mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En particular, en lo que respecta al proceso de preparación:

- (a) - en la primera etapa, el péptido lineal se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida como es bien conocido en la técnica (los aminoácidos, la resina y los reactivos necesarios están disponibles comercialmente o pueden ser sintetizados por los expertos en la técnica);
- (b) - después de la desprotección, el péptido lineal sobre la resina se cicla mediante un catalizador de Grubbs de primera generación;
- (c) - el ciclopéptido se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC;
- (d) - después de la escisión, el ciclopéptido se reduce en disolución mediante H_2 en presencia de un catalizador metálico y se purifica por RP-HPLC;

en otro caso después de la etapa (b)

- (c') - el ciclopéptido se reduce sobre la resina mediante H_2 en presencia de un catalizador metálico;
- (d') - el ciclopéptido reducido se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC, en otro caso -el ciclopéptido insaturado se puede conjugar con el macrociclo de fórmula (II), en el grupo amino terminal de la D-Phe¹, tratando el ciclopéptido sobre la resina con piperidina al 20% en DMF y añadiendo una disolución del macrociclo convenientemente activado siguiendo los procedimientos conocidos en la bibliografía (es decir, Sabatino, M. Chinol, G. Paganelli, S. Papi, M. Chelli, G. Leone, A. M. Papini, A. De Luca, M. Ginanneschi, J. Med. Chem., 2003, 46, 3170-3173; M. Scottelius, M. Schwaiger, HJ. Wester, Tetrahedron Lett., 2003, 44, 2393-2396; J. Fichha, A. Janecka, Bioconjugate. Chem., 2003, 14, 3-17);

posiblemente,

también el péptido cíclico saturado, si se obtiene reduciendo el péptido insaturado sobre la resina, se podría conjugar con un macrociclo de fórmula (II) en las mismas condiciones.

Para la síntesis del péptido lineal, en general, seguimos el procedimiento presentado por Wu y col. (Y-T. Wu, HP. Hsieh, C-Y.Wu, S-T. Tein, K-T. Wang, Tetrahedron Letters, 1998, 39, 1783-1984).

En la primera etapa, el péptido lineal Fmoc-D-Phe-Gly(All)-Phe-D-Trp(Boc)-Thr(t-Bu)-Gly(All)-Thr-ol se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida en discontinuo, usando una resina de amida Rink, resina de [(4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil))-fenoxi, 0,44 mmol/g de Novabiochem].

ES 2 313 211 T3

Preferentemente se usan cuatro equivalentes de los aminoácidos necesarios, protegidos con Fmoc y activados mediante HOBt/TBTU/MMM en DMF.

El primer aminoácido unido a la resina (el enlazante) es el acetal obtenido por condensación de Fmoc-treoninol y *p*-carboxibenzaldehído.

Una vez sintetizado el enlazante, las siguientes etapas son como se ha informado anteriormente. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la ruta sintética de la invención.

10 Ejemplo nº 1

*Síntesis del enlazante (acetal de Fmoc-treoninol-*p*-carboxibenzaldehído)*

Disolución A: 0,9 mmol de Fmoc-treoninol (300 mg) en 10 ml de CHCl₃ (secado sobre tamices moleculares).

Disolución B: 2,25 mmol de *p*-carboxibenzaldehído (340 mg) en 10 ml de CHCl₃.

A la disolución B se añaden algunas gotas de DMSO y una cantidad muy pequeña de ácido *p*-toluensulfónico.

La disolución A se añade a la disolución B con agitación; después de eso, también se añaden 10 ml de CHCl₃ y a continuación la disolución se calienta hasta 80°C y se lleva hasta temperatura de reflujo durante 8 horas en nitrógeno en un aparato de Dean-Stark.

A continuación la disolución se enfría a temperatura ambiente y se evapora a presión reducida obteniendo un aceite amarillo.

El producto se purifica por cromatografía instantánea en gel de sílice; eluyente: CHCl₃/MeOH = 13:1.

El compuesto puro se ha recogido con un rendimiento del 65%.

RMN ¹H (CDCl₃), δ 8,13 (2H, d, 8,3 Hz), 7,75 (2H, d, 7,5 Hz), 7,60-7,55 (4H, m), 7,41-7,28 (4H, m) 5,63-5,56 (2H, m), 4,47-4,42 (2H, m), 4,25-4,12 (4H, m), 3,71 (1H, d), 1,27 (3H, m, -CH₃).

ESI-MS [M+H]⁺ 460,4 calculado 460,17.

35 Ejemplo nº 2

Síntesis del péptido lineal

40 *D-Phe-Gly(All)-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Gly(All)-Thr-ol*

La síntesis del péptido lineal se llevó a cabo usando 1 g de la resina previamente desprotegida con piperidina al 20% en DMF. La cantidad necesaria del enlazante se disolvió en DMF, se añadieron los agentes activantes y se unieron a la resina que se mantuvo en oscilación durante 2 h. A continuación, la resina se lavó con DCM y DMF. El test de Kaiser pone en evidencia la presencia de grupos amino libres acetilados con una mezcla de anhídrido acético y NMM. A continuación, todos los aminoácidos restantes se añaden a la resina suspendida en DMF como se ha descrito previamente para el enlazante y siguiendo la secuencia planeada, se lleva a cabo una desprotección del ciclo con piperidina para cada aminoácido añadido, excepto para el último. El nivel final de sustitución de la resina es de 0,2 mmol/g.

El péptido lineal se analiza después de una micro-escisión sobre 5 mg de la resina.

La escisión es al mismo tiempo una desprotección de las cadenas laterales de Lys, Trp y Thr, pero el grupo protector Fmoc terminal no se elimina.

La resina se trata con 1 ml de una disolución de 9 ml de TFA, 4 ml de agua, 0,5 ml de fenol y 1 ml de etanoditiol.

La resina se elimina por filtración y la disolución se evapora en corriente de N₂ y el péptido se precipita tratándolo con etiléter frío. El producto se recoge por centrifugación y a continuación se disuelve en H₂O y se liofiliza.

El producto se analiza por RP-HPLC sobre una columna analítica Phenomenex C₁₈ (250 mm x 4,6 mm de diámetro interno) usando un gradiente del 20% al 100% de eluyente B (A: 0,1% de TFA en H₂O; B: CH₃CN 84%, 0,1% de TFA, 1 ml/min).

R_t = 9,6 min.

ESI-MS: [M+H]⁺ 1231,9; calculado 1230,6.

Ejemplo n° 3

Síntesis del péptido cíclico insaturado

La ciclación se ha llevado a cabo sobre el péptido unido a la resina por metátesis de dos residuos alilo de la glicina siguiendo el procedimiento presentado por Miller y col. (S. J. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 9606-9614).

A la resina (1 g) suspendida en DCM (90 ml) se añadió el catalizador de Grubbs $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{Pcy}_3)\text{bencilideno}]$, 43 mg] en DCM (13 ml) en reflujo de nitrógeno. La suspensión se dejó a 40°C durante 30 h, a continuación la resina se lavó, se secó y el ciclopéptido se desprotegió del Fmoc. A continuación el ciclopéptido se escindió de la resina siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. El producto en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa [columna Vydac C18 ODSSTP1010, 250 x 25 mm d.i.; eluyente: (A) 0,1% de TFA en H_2O y (B) 0,1% de TFA en CH_3CN , 15-60% de B en 30 min]. A partir de 500 mg de resina se obtuvieron 23 mg (rendimiento del 25%) de un sólido incoloro que sólo presenta un pico cromatográfico.

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 981,8; calculado 981,5.

Ejemplo n° 4

Síntesis del péptido cíclico saturado

El péptido cíclico insaturado (19 mg) se disolvió en MeOH y se redujo en atmósfera de hidrógeno usando $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ como catalizador, a temperatura y presión ambiente, durante 24 h.

El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa usando las mismas condiciones que para el producto insaturado obteniendo 5 mg (26% de rendimiento) del compuesto deseado.

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 983,6; calculado 983,5.

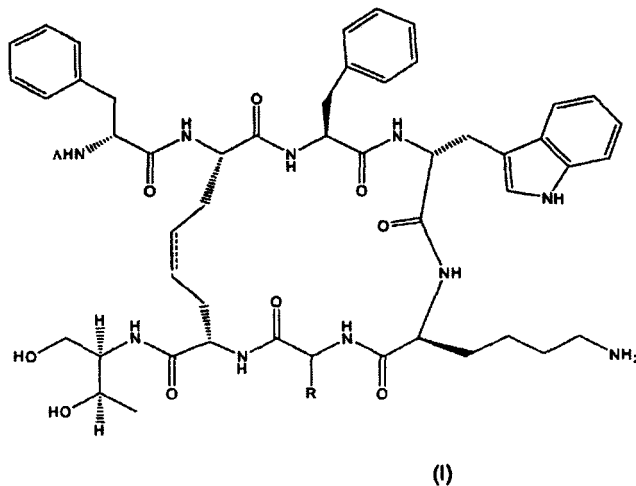
Los productos descritos anteriormente, si -A es H, se pueden obtener para la preparación de composiciones farmacéuticas siguiendo los procedimientos usuales conocidos en tecnología farmacéutica para el uso de componentes activos equivalentes.

En otro caso, los productos con la fórmula (I), si -A es un macrociclo con la fórmula (II), se pueden marcar radiactivamente con isótopos metálicos como Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177, y Au-198, usados en radiodiagnóstico y radioterapia.

Las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades, como por ejemplo, tumores, acromegalia, diabetes, artritis reumatoide, y enfermedad de Alzheimer.

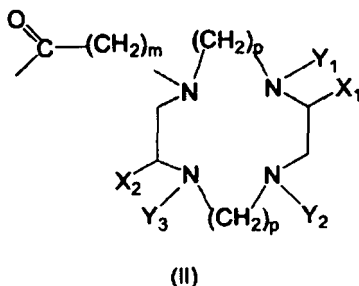
REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I)



(I)

en la que el símbolo ----- es un enlace simple o doble; -A es H, el agente quelante DTPA o un macrociclo de fórmula (II):



(II)

en la que Y₁, Y₂ e Y₃, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan del grupo constituido por hidrógeno, -(CH₂)_n-COOH, en la que n es un número entero entre 1 y 6, y p es el número entero 2 ó 3.

R es un aminoácido como Thr, D- o L-Phe, en otro caso D- o L-Phe *orto* y/o *para* sustituida con grupos -OR' en los que R' es alquilo lineal o ramificado, bencilo o bencilo sustituido sobre el anillo aromático con grupos hidrófobos.

2. Compuesto con la fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que el símbolo ----- es un enlace simple.

3. Compuesto con la fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que el símbolo ----- es un enlace doble.

4. Compuesto según las reivindicaciones 1-3, en el que el macrociclo de fórmula (II) es el agente quelante DOTA.

5. Procedimiento para la preparación de compuestos según las reivindicaciones 1-4, en el que -A es H, en el que:

(a) - en la primera etapa, el péptido lineal se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida como es bien conocido en la técnica;

(b) - después de la desprotección, el péptido lineal sobre la resina se cicla mediante un catalizador de Grubbs de primera generación;

(c) - el ciclopéptido se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC;

posiblemente

(d) - después de la escisión, el ciclopéptido se reduce en disolución mediante H₂ en presencia de un catalizador metálico y se purifica por RP-HPLC;

o después de la etapa (b)

(e) - el ciclopéptido se reduce sobre la resina mediante H_2 en presencia de un catalizador metálico;

5 (f) - el ciclopéptido reducido se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC.

6. Procedimiento para la preparación de compuestos según las reivindicaciones 1-4, en el que -A es un macrociclo de fórmula (II), en el que:

10 (a) - en la primera etapa, el péptido lineal se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida;

(b) - después de la desprotección, el péptido lineal sobre la resina se cicla mediante un catalizador de Grubbs de primera generación;

15 (c) - el ciclopéptido insaturado se trata con piperidina;

(d) - el ciclopéptido se conjuga con una disolución del macrociclo activado con la fórmula (II);

20 (e) - el compuesto bioconjugado se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC; o, después de la etapa (b)

(c') - el ciclopéptido se reduce sobre la resina;

25 (d') - el ciclopéptido saturado se trata con piperidina;

(e') - el ciclopéptido se conjuga con el macrociclo;

(f) - el compuesto bioconjugado se escinde de la resina y se purifica mediante RP-HPLC.

30 7. Formulaciones farmacéuticas que contienen como principio activo un compuesto de fórmula (I).

8. Uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de formulaciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de tumores, acromegalia, diabetes, artritis reumatoide, y enfermedad de Alzheimer.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 211 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Giuntini, Mauro y col
5 <120> Análogos de somatostatina
<130> 4902PTEP
<140> EP 05101866.1
<141> 03-10-2005
10 <150> FI2004A000057
<151> 03-10-2004
<160> 1
<170> PatentIn versión 3,3
15 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Artificial
<220>
<223> Octopéptido sintético - Fórmula I
<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Glicina alfa, usada en la reacción de ciclación del péptido
<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Glicina alfa, usada en la reacción de ciclación del péptido
35 <400> 1

40 Phe Gly Phe Trp Lys Thr Gly Thr
1 5

45

50

55

60

65