



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 233**

51 Int. Cl.:
A61K 38/29 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)
C07K 14/635 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03077383 .2**
96 Fecha de presentación : **03.07.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1405861**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Análogos de la hormona paratiroidea.**

30 Prioridad: **13.07.1995 US 1105 P**
06.09.1995 US 3305 P
29.03.1996 US 626186

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2009

73 Titular/es: **IPSEN PHARMA S.A.S.**
65, quai Georges Gorse
92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es: **Dong, Zheng Xin**

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 329 233 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 la hormona paratiroidea.

5 **Antecedentes de la invención**

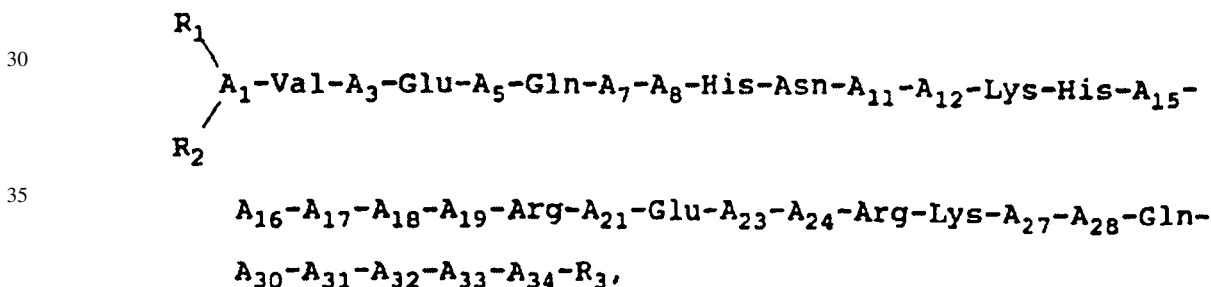
La hormona paratiroidea ("PTH") es un polipéptido producido por las glándulas paratiroideas. La forma circulante madura de la hormona está constituida por 84 residuos aminoácidos. La acción biológica de la PTH se puede reproducir con un fragmento peptídico de su N-término (por ejemplo, residuos aminoácidos 1 a 34). La proteína relacionada con la hormona paratiroidea ("PTHrP") es una proteína de 139 a 173 aminoácidos con homología N-terminal a la PTH. La PTHrP comparte muchos de los efectos biológicos de la PTH incluyendo la unión a un receptor común de la PTH/PTHrP. Tregear, y col., *Endocrinol.*, 93:1349 (1983). Se han caracterizado péptidos de la PTH procedentes de diferentes fuentes, por ejemplo, seres humanos, bóvidos, rata, pollo. Nissenson, y col., *Receptor*, 3:193 (1993).

Se ha demostrado que la PTH mejora tanto la masa ósea como la calidad de hueso. Dempster, y col., *Endocrine Rev.*, 14:690 (1993); y Riggs, *Amer. J. Med.*, 91 (Suppl. 5B):37S (1991). Se ha observado un efecto anabólico de la PTH administrada de manera intermitente en hombres y mujeres osteoporóticos con o sin terapia antirresortiva concurrente. Slovick, y col., *J. Bone Miner. Res.*, 1:377 (1986); Reeve, y col., *Br. Med. J.*, 301:314 (1990); y Hesch, R-D., y col., *Calcif. Tissue Int'* 1, 44:176 (1989).

El documento WO 94/02510 describe compuestos de la PTH que tienen actividad similar a la PTH y que comprenden al menos una modificación.

25 **Resumen de la invención**

En un aspecto, la invención se refiere a variantes peptídicas de la PTH (1-34) con la siguiente fórmula genérica:



40 en la que:

A₁ es Ser, Ala, o Dap;

45 A₃ es Ser, o Thr;

A₅ es Leu, Nle, Ile, Cha, β-Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe, en la que X es OH, un halógeno, o CH₃;

A₇ es Leu, Nle, Ile, Cha, β-Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en la que X es OH, un halógeno, o CH₃;

50 A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle;

A₁₁ es Leu, Nle, Ile, Cha, β-Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe en la que X es OH, un halógeno, o CH₃;

55 A₁₂ es Gly o Aib;

A₁₅ es Leu, Nle, Ile, Cha, β-Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en la que X es OH, un halógeno, o CH₃;

A₁₆ es Ser, Asn, o Ala;

60 A₁₇ es Ser, o Thr;

A₁₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, Nle, o Cha;

65 A₁₉ es Glu;

A₂₁ es Val, Cha, o Met;

ES 2 329 233 T3

A₂₃ es Trp o Cha;

A₂₄ es Leu o Cha;

5 A₂₇ es Lys, Aib, Leu, hArg, Gln, o Cha;

A₂₈ es Leu o Cha;

A₃₀ es Asp o Lys;

10 A₃₁ es Val, Nle, Cha, o está suprimido;

A₃₂ es His o está suprimido;

15 A₃₃ es Asn o está suprimido;

A₃₄ es Phe, Tyr, Amp, o está suprimido;

20 cada uno de R₁ y R₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilalquilo C₇₋₂₀, naftilalquilo C₁₁₋₂₀, hidroxialquilo C₁₋₁₂, hidroxialquenilo C₂₋₁₂, hidroxifenilalquilo C₇₋₂₀, o hidroxinaftilalquilo C₁₁₋₂₀; o uno y sólo uno de R₁, y R₂ es COE₁, en la que E₁ es alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilalquilo C₇₋₂₀, naftilalquilo C₁₁₋₂₀, hidroxialquilo C₁₋₁₂, hidroxialquenilo C₂₋₁₂, hidroxifenilalquilo C₇₋₂₀, o hidroxinaftilalquilo C₁₁₋₂₀; y

25 R₃ es OH, NH₂, alcoxi C₁₋₁₂, o NH-Y-CH₂-Z en la que Y es un resto hidrocarbonado C₁₋₁₂ y Z es H, OH, CO₂H, o CONH₂;

con la condición de que (i) al menos uno de A₅, A₇, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₁, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 Un subgrupo de los compuestos cubiertos por la fórmula anterior son aquéllos en los que al menos uno de A₅, A₇, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₁, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha. Por ejemplo, A₃ es Ser; A₅ es Ile; A₇ es Leu o Cha; A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A₁₁ es Leu o Cha; A₁₂ es Gly; A₁₅ es Leu o Cha; A₁₆ es Asn; A₁₇ es Ser; A₁₈ es Met o Nle; A₂₁ es Val; A₂₇ es Lys, hArg, o Cha; A₃₂ es His; A₃₁ es Val, Nle, o Cha; A₃₃ es Asn; A₃₄ es Phe, Tyr, o Amp; R₁ es H; R₂ es H; y R₃ es NH₂; con la condición de que al menos uno de A₅, A₇, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₁, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha. Si se desea, al menos uno de A₇ y A₁₁ puede ser Cha; o al menos uno de A₁₅, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha.

40 Por ejemplo, A₃ es Ser; A₅ es Ile; A₇ es Leu o Cha; A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A₁₁ es Leu o Cha; A₁₅ es Leu o Cha, A₁₆ es Asn; A₁₈ es Met, o Nle; A₂₁ es Val; A₂₇ es Lys, Aib, Leu, hArg, o Cha; A₃₁ es Val, Nle, o Cha; A₃₂ es His; A₃₃ es Asn; A₃₄ es Phe, Tyr, o Amp; R₁ es H; R₂ es H; y R₃ es NH₂; con la condición de que al menos uno de A₅, A₇, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₁, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha. Si se desea, al menos uno de A₇ y A₁₁ puede ser Cha; o al menos uno de A₁₅, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha.

45 En un subgrupo adicional, al menos uno de A₅, A₇, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₁, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, y A₃₁ es Cha. Por ejemplo, A₃ es Ser; A₅ es Ile; A₇ es Leu o Cha; A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A₁₁ es Leu o Cha; A₁₅ es Leu o Cha; A₁₆ es Asn; A₁₈ es Met, o Nle; A₂₁ es Val; A₂₇ es Lys, Aib, Leu, hArg, o Cha; A₃₁ es Val, Nle, o Cha; A₃₂ es His; A₃₃ es Asn; A₃₄ es Phe, Tyr, o Amp; R₁ es H; R₂ es H; y R₃ es NH₂. Si se desea, al menos uno de A₇ y A₁₁ es Cha; o al menos uno de A₂₄, A₂₈, y A₃₁ es Cha.

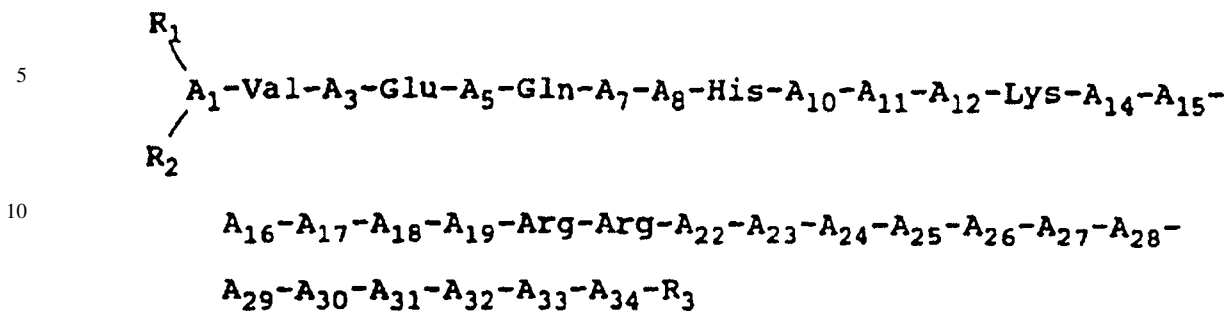
50 En otro subgrupo más, al menos uno de A₁ es Dap, A₇ es β-Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe, A₁₃ es β-Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe. Por ejemplo, A₁ es Ser, Gly, o Dap; A₃ es Ser; A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A₁₆ es Asn; A₁₈ es Met, o Nle; A₂₁ es Val; A₂₇ es Lys, Aib, Leu, hArg, o Cha; A₃₁ es Val, Nle, o Cha; A₃₂ es His; A₃₃ es Asn; A₃₄ es Phe, Tyr, o Amp; R₁ es H; R₂ es H; y R₃ es NH₂.

55 Los siguientes son ejemplos del péptido de esta invención cubierto por la fórmula anterior: [Cha⁷]hPTH(1-34)NH₂; (Cha¹¹)hPTH(1-34)NH₂; [Cha¹⁵]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11}, Nle^{8,18}, Tyr³⁴]hPTH(1-34)NH₂; [Cha²³]hPTH(1-34)NH₂; [Cha²⁴]hPTH(1-34)NH₂; [Nle^{8,18}, Cha²⁷]hPTH(1-34)NH₂; [Cha²⁸]hPTH(1-34)NH₂; [Cha³¹]hPTH(1-34)NH₂; [Cha²⁷]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{27,29}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha²⁸]bPTH(1-34)NH₂; [Cha²⁸]rPTH(1-34)NH₂; [Cha^{24,28,31}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{24,28,31}, Lys³⁰]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{28,31}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha¹⁵]hPTH(1-34)NH₂; [Cha⁵]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11,15}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11,15}]hPTH(1-34)NH₂; [Aib¹⁷]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11}, Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11,15}, Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11,27}]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{7,11,15}, 27]hPTH(1-34)NH₂; [Trp¹⁵, Cha²³]hPTH(1-34)NH₂; [Cha^{15,23}]hPTH(1-34)NH₂;

65

ES 2 329 233 T3

En otro aspecto, la invención se refiere a péptidos cubiertos por la fórmula siguiente:



15 en la que

A₁ es Ala, Ser, o Dap;

20 A₃ es Ser;

A₅ es His, Ile, o Cha;

A₇ es Leu, Cha, Nle, β -Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en la que X es OH, un halógeno, o CH₃;

25 A₈ es Leu, Met; o Cha;

A₁₀ es Asp o Asn;

30 A₁₁ es Lys, Leu, Cha, Phe, o β -Nal;

A₁₂ es Gly o Aib;

A₁₄ es Ser o His;

35 A₁₅ es Ile, o Cha;

A₁₆ es Gln;

40 A₁₇ es Asp;

A₁₈ es Leu, o Cha;

A₁₉ es Arg;

45 A₂₂ es Phe, Glu, o Cha;

A₂₃ es Phe, Leu, Lys, o Cha;

50 A₂₄ es Leu, Lys, o Cha;

A₂₅ es His, o Glu;

A₂₆ es His, o Lys;

55 A₂₇ es Leu, Lys, o Cha;

A₂₈ es Ile, Leu, Lys, o Cha;

60 A₂₉ es Ala, o Glu;

A₃₀ es Glu, Cha, o Lys;

A₃₁ es Ile, Leu, Cha, Lys, o está suprimido;

65 A₃₂ es His o está suprimido;

A₃₃ es Thr o está suprimido;

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de esta invención y una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, carbonato de magnesio, lactosa, o un fosfolípido con el que el compuesto terapéutico puede formar una micela) forman juntos una composición terapéutica (por ejemplo, una píldora, comprimido, cápsula, o líquido) para su administración (por ejemplo, oral, intravenosa, transdérmica, pulmonar, vaginal, subcutánea, nasal, iontoforética, o intracecalmente) a un sujeto. La píldora, comprimido, o cápsula a administrar oralmente puede estar recubierta con una sustancia para proteger a la composición activa del ácido gástrico o las enzimas intestinales del estómago durante un periodo de tiempo suficiente para permitirle el paso sin digerir hacia el intestino delgado. La composición terapéutica también puede estar en forma de formulación de liberación sostenida biodegradable o no biodegradable para la administración por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. 3.773.919 y 4.767.628 y la solicitud PCT N° WO 94/15587. La administración continua también se puede conseguir usando una bomba implantable o externa (por ejemplo, una bomba INFUSAID™). La administración también se puede realizar de manera intermitente, por ejemplo, con una única inyección diaria, o continuamente a una dosis baja, por ejemplo, con una formulación de liberación sostenida.

La dosis de un péptido de la presente invención para el tratamiento de las enfermedades o trastornos anteriormente mencionados varía dependiendo del modo de administración, la edad y el peso corporal del sujeto, y la condición del sujeto a tratar, y en último término será decisión del facultativo o veterinario que atiende.

Dentro del alcance de esta invención también se contempla un péptido cubierto por la fórmula genérica anterior para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con una deficiencia en el crecimiento óseo o similar, por ejemplo, osteoporosis o fracturas.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Basándose en la descripción del presente documento, la presente invención se puede utilizar hasta su grado más completo. Los siguientes ejemplos específicos se deben interpretar como meramente ilustrativos, y no limitantes de ninguna forma del resto de la invención.

Estructura

Se ha informado que la PTH(1-34) tienen los dominios helicoidales alfa anfófilos. Véase, por ejemplo, Barden, y col., *Biochem.*, 32:7126 (1992). La primera α -hélice se forma entre los residuos aminoácidos 4 a 13, mientras que la segunda α -hélice se forma entre los residuos aminoácidos 21 a 29. Algunos péptidos de esta invención contienen la sustitución de Cha por uno o más residuos en o cerca de estas dos regiones de la PTH(1-34), por ejemplo, Cha⁷ y Cha¹¹ dentro de la primera α -hélice o Cha²⁷ y Cha²⁸ dentro de la segunda α -hélice.

Síntesis

Los péptidos de la invención se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida habitual. Véase, por ejemplo, Stewart, J.M., y col., *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2ª ed. 1984). Lo siguiente es una descripción de cómo se preparó la [Aib³⁴]hPTH(1-34)NH₂ (que no es parte de la invención). Otros péptidos de la invención se pueden preparar de una manera análoga por alguien con conocimientos ordinarios en la materia.

El péptido se sintetizó en un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) modelo 430A que se modificó para realizar síntesis de péptidos en fase sólida mediante química Boc acelerada. Véase, Schnoize, y col., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 90:180 (1992). Se usó una resina de 4-metilbenc-hidrilamina (MBHA) (Peninsula, Belmont, CA) con la sustitución de 0,93 mmol/g. Los aminoácidos Boc (Bachem, CA, Torrance, CA; Nova Biochem., LaJolla, CA) se usaron con la siguiente protección de la cadena lateral: Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asp(OcHx1)-OH, Boc-Asn(Xan)-OH, Boc-Glu(OcHx1)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Asn-GH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Ser-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Met-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Lys(2ClZ)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, y Boc-Trp(Fm)-OH. La síntesis se llevó a cabo a una escala de 0,14 mmol. Los grupos se retiraron por tratamiento con TFA al 100% durante 2 x 1 min. Los aminoácidos Boc (2,5 mmol) se activaron previamente con HBTU (2,0 mmol) y DIEA (1,0 ml) en 4 ml de DMF y se acoplaron sin neutralización previa de la sal de TFA del péptido-resina. Los tiempos de acoplamiento fueron de 5 min excepto para el Boc-Aib-OH y el siguiente residuo, Boc-Asn(Xan)-OH, en los que los tiempos de acoplamiento fueron de 20 min.

Al final del ensamblaje de la cadena peptídica, la resina se trató con una disolución de mercaptoetanol al 20%/DIEA al 10% en DMF durante 2 x 30 min para retirar el grupo DNP sobre la cadena lateral de la His. A continuación se retiró el grupo Boc N-terminal por tratamiento con TFA al 100% durante 2 x 2 min. Después de la neutralización del péptido-resina con DIEA al 10% en DMF (1 x 1 min), se retiró el grupo formilo sobre la cadena lateral del Trp por tratamiento con una disolución de etanolamina al 15%/agua al 15%/DMF al 70% durante 2 x 30 min. El péptido-resina parcialmente desprotegido se lavó con DMF y DCM y se secó a presión reducida. La escisión final se realizó agitando el péptido-resina en 10 ml de HF que contiene 1 ml de anisol a 0°C durante 75 min. El HF se retiró con una corriente de nitrógeno. El residuo se lavó con éter (6 x 10 ml) y se extrajo con HOAc 4 N (6 x 10 ml).

ES 2 329 233 T3

5 La mezcla peptídica en el extracto acuoso se purificó en cromatografía preparativa de líquidos de alta presión en fase inversa (HPLC) usando una columna VydacTM C₁₈ de fase inversa (Nest Group, Southborough, MA). La columna se eluyó con un gradiente lineal (10% al 45% de disolución B durante 130 min) a una velocidad de flujo de 10 ml/min (Disolución A = TFA acuoso al 0,1%; Disolución B = acetonitrilo que contiene el 0,1% de TFA). Las fracciones se recogieron y se sometieron a control sobre HPLC analítica. Aquéllas que contenían el producto puro se combinaron y se liofilizaron hasta sequedad. Se obtuvieron 62,3 mg de un sólido blanco. La pureza era >99% basada en el análisis de la HPLC analítica. El análisis en un espectrómetro de masas por electro pulverización dio un peso molecular a 4054,7 (en consonancia con el peso molecular calculado de 4054,7).

10 La síntesis y purificación de [Cha^{7,11}]hPTH (1-34)NH₂ se llevó a cabo de la misma manera que la síntesis anterior de [Aib³⁴]hPTH(1-34)NH₂. El aminoácido Boc-Cha-OH protegido se adquirió en Bachem, CA. La pureza del producto final fue >98%, y el espectrómetro de masas por electro pulverización dio el peso molecular a 4197,0 (el peso molecular calculado es de 4196,9).

15 Los nombres completos para las abreviaturas usadas anteriormente son los siguientes: Boc para t-butiloxicarbonilo, HF para fluoruro de hidrógeno, Fm para formilo, Xan para xantilo, Bzl para bencilo, Tos para tosilo, DNP para 2,4-dinitrofenilo, DMF para dimetilformamida, DCM para diclorometano, HBTU para hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, DIEA para diisopropiltilamina, HOAc para ácido acético, TFA para ácido trifluoroacético, 2ClZ para 2-clorobenciloxicarbonilo y OcHxl para O-ciclohexilo.

20 Los sustituyentes R₁ y R₂ de la fórmula genérica anterior se pueden unir a la amina libre del aminoácido N-terminal mediante procedimientos habituales conocidos en la materia. Por ejemplo, los grupos alquilo, por ejemplo, alquilo C₁₋₁₂, se pueden unir usando alquilación reductora. Los grupos hidroxialquilo, por ejemplo, hidroxialquilo C₁₋₁₂, también se pueden unir usando alquilación reductora en la que el grupo hidroxilo libre se protege usando un éster de *t*-butilo. Los grupos acilo, por ejemplo, COE₁, se pueden unir acoplando el ácido libre, por ejemplo, E₁COOH, a la amina libre del aminoácido N-terminal mezclando la resina completa con 3 equivalentes molares tanto del ácido libre como de la diisopropilcarbodiimida en cloruro de metileno durante una hora y ciclando la resina resultante a través de las etapas (a) a (f) en el programa de lavado anterior. Si el ácido libre contiene un grupo hidroxilo libre, por ejemplo, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico, entonces el acoplamiento se debe realizar con 3 equivalentes molares adicionales de HOBT.

30 Otros péptidos de esta invención se pueden preparar de manera análoga por alguien con conocimientos ordinarios en la materia.

Ensayos funcionales

35 A. Unión al receptor de la PTH

Los péptidos de la invención se probaron para su capacidad para unirse al receptor de la PTH presente en SaOS-2 (células de osteosarcoma humanas). Las células SaOS-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD; ATCC #HTB 85) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) y glutamina 2 mM a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire. El medio se cambió cada tres o cuatro días, y las células se subcultivaron cada semana por tripsinización.

45 Las células SaOS-2 se mantuvieron durante cuatro días hasta que hubieron alcanzado confluencia. El medio se sustituyó con FBS al 5% en medio RPMI 1640 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con 10 x 10⁴ cpm mono-¹²⁵I-[Nle^{8,18}, Tyr³⁴(3-¹²⁵I)] bPTH(1-34)NH₂ en presencia de péptidos competitivos de la invención a diversas concentraciones entre 10⁻¹¹ M y 10⁻⁴ M. Las células se lavaron cuatro veces con PBS enfriado en hielo y se lisaron con NaOH 0,1 M, y se contó la radiactividad asociada a las células en un contador de centelleo. La síntesis de mono-¹²⁵I-[Nle^{8,18}, Tyr³⁴(3-¹²⁵I)] bPTH(1-34)NH₂ se llevó a cabo como se describe en Goldman, M.E., y col., Endocrinol., 123:1468 (1988).

El ensayo de unión se realizó con diversos péptidos de la invención, y se calculó para cada péptido el valor de la CI₅₀, (la mitad de la inhibición máxima de unión de mono-¹²⁵I-(Nle^{8,18}, Tyr³⁴(3-¹²⁵I)]bPTH(1-34)NH₂).

55 Como se muestra en la Tabla I, todos los péptidos probados presentaban una afinidad de unión elevada por el receptor de la PTH sobre células SaOS-2.

B. Estimulación de la actividad adenilato ciclasa

60 Se midió la capacidad de los péptidos de la invención para inducir una respuesta biológica en células SaOS-2. Más específicamente, se determinó cualquier estimulación de la adenilato ciclasa midiendo el nivel de síntesis de AMPc (adenosina-3',5'-monofosfato) como se ha descrito previamente en Rodan, y col., J. Clin. Invest. 72: 1511 (1983) y Goldman, y col., Endocrinol., 123:1468 (1988). Las células SAOS-2 confluentes en placas de 24 pocillos se incubaron con 0,5 μCi de [³H]adenina (26,9 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) en medio fresco a 37°C durante 2 h, y se lavaron dos veces con disolución salina equilibrada de Hank (Gibco, Gaithersburg, MD). Las células se trataron con IBMX 1 mM [isobutilmetil-xantina, Sigma, St. Louis, MO] en medio fresco durante 15 min, y los péptidos de la invención se añadieron al medio para incubarlo durante 5 min. La reacción se detuvo con la adición de ácido tricloroacético 1,2 M (TCA) (Sigma, St. Louis, MO) seguido de la neutralización de la muestra con KOH 4 N. El AMPc se aisló me-

ES 2 329 233 T3

diante el procedimiento cromatográfico de dos columnas (Salmon, y col., 1974, Anal. Biochem. 58, 541). La radiactividad se contó en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter 2200CA, PACKARD, Downers Grove, IL).

Se calcularon los respectivos valores de CE_{50} (la mitad de la estimulación máxima de la adenilato ciclasa) para los péptidos probados y se muestran en la Tabla I. Se encontró que todos los péptidos probados eran potentes estimuladores de la actividad adenilato ciclasa, que es una ruta bioquímica indicativa como señal proximal para la proliferación de osteoblastos (por ejemplo, crecimiento óseo).

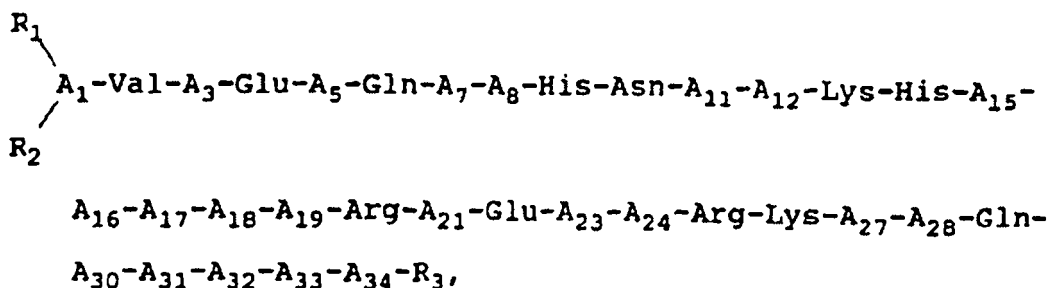
TABLA I

PÉPTIDO	Kd (μ M)	CE_{50} (nM)
[Cha ^{7, 11}]hPTH(1-34)NH ₂	0,01	0,6
[Cha ²³]hPTH(1-34)NH ₂	0,2	20
[Cha ²⁴]hPTH(1-34)NH ₂	0,1	10
[Nle ^{8, 18} , Cha ²⁷]hPTH(1-34)NH ₂ ;	0,05	2
[Cha ²⁸]hPTH(1-34)NH ₂	0,05	25
[Cha ³¹]hPTH(1-34)NH ₂	0,03	4
[Aib ¹⁶]hPTH(1-34)NH ₂ ; *	0,004	0,7
[Aib ¹⁹]hPTH(1-34)NH ₂ ; *	0,005	0,6
[Aib ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂ ; *	0,007	3
[Nle ³¹]hPTH(1-34)NH ₂ ; *	0,004	0,7
[hArg ²⁷]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,007	1
[Dap, Nle ^{8, 18} , Tyr ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,150	10
[Cha ^{24, 28, 31} , Lys ³⁰]hPTH(1-34)NH ₂ ;	0,5	7
[Cha ^{7, 11} , Nle ^{8, 18} , Tyr ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂	0,006	0,6
[Cha ^{7, 11} , Nle ^{8, 18} , Aib ^{16, 19} , Tyr ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,005	15
[Cha ^{7, 11} , Nle ^{8, 18, 31} , Aib ^{16, 19} , Tyr ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,04	4
[Cha ¹¹]hPTH(1-34)NH ₂	0,005	2
[Cha ^{28, 31}]hPTH(1-34)NH ₂	0,06	7
[Cha ^{7, 11} , Nle ^{8, 18} , Aib ³⁴]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,03	1,5
[Cha ¹⁵]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,005	1,3
[Cha ^{7, 11} , Aib ¹⁹]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,007	0,5
[Cha ^{7, 11} , Aib ¹⁶]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,004	1,1
[Aib ^{16, 19}]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,004	0,6
[Aib ¹²]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,005	2
[Aib ³]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,004	1,1
[Cha ^{7, 11} , Aib ¹⁹ , Lys ³⁰]hPTH(1-34)NH ₂ *	0,004	2
[Cha ⁷]hPTH(1-34)NH ₂	0,02	2,3
[Cha ^{24, 28, 31}]hPTH(1-34)NH ₂	1,0	30
[Aib ¹⁷]hPTH(1-34) *	0,05	3
[Cha ^{7, 11, 15}]hPTH(1-34)	0,01	1,4

* ejemplos comparativos

REIVINDICACIONES

1. Un péptido con la fórmula:



en la que

A_1 es Ser, Ala, o Dap; A_3 es Ser o Thr; A_5 es Leu, Nle, Ile, Cha, β -Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe, en el que X es OH, un halógeno, o CH_3 ; A_7 es Leu, Nle, Ile, Cha, β -Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en el que X es OH, un halógeno, o CH_3 ; A_8 es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A_{11} es Leu, Nle, Ile, Cha, β -Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe en el que X es OH, un halógeno, o CH_3 ; A_{12} es Gly, o Aib; A_{15} es Leu, Nle, Ile, Cha, β -Nal, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en el que X es OH, un halógeno, o CH_3 ; A_{16} es Ser, Asn o Ala; A_{17} es Ser o Thr; A_{18} es Met, Nva, Leu, Val, Ile, Nle o Cha; A_{19} es Glu; A_{21} es Val, Cha, o Met; A_{23} es Trp, o Cha; A_{24} es Leu, o Cha; A_{27} es Lys, Aib, Leu, hArg, Gln, o Cha; A_{29} es Leu, o Cha; A_{30} es Asp o Lys; A_{31} es Val, Nle, Cha, o está suprimido; A_{32} es His o está suprimido; A_{33} es Asn o está suprimido; A_{34} es Phe, Tyr, Amp, o está suprimido; cada uno de R_1 y R_2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-12} , alquenilo C_{2-12} , fenilalquilo C_{7-20} , naftilalquilo C_{11-20} , hidroxialquilo C_{1-12} , hidroxialquenilo C_{2-12} , hidroxifenilalquilo C_{7-20} , o hidroxinaftilalquilo C_{11-20} ; o uno y sólo uno de R_1 y R_2 es COE_1 en el que E_1 es alquilo C_{1-12} , alquenilo C_{2-12} , fenilalquilo C_{7-20} , naftilalquilo C_{11-20} , hidroxialquilo C_{1-12} , hidroxialquenilo C_{2-12} , hidroxifenilalquilo C_{7-20} , o hidroxinaftilalquilo C_{11-20} ; y R_3 es OH, NH_2 , alcoxi C_{1-12} , o $\text{NH-Y-CH}_2\text{-Z}$ en el que Y es un resto hidrocarbonado C_{1-12} y Z es H, OH, CO_2H , o CONH_2 ; y con la condición de que al menos uno de A_5 , A_7 , A_{11} , A_{15} , A_{18} , A_{21} , A_{23} , A_{24} , A_{27} , A_{28} , y A_{31} es Cha;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que al menos uno de A_7 , A_{11} , A_{15} , A_{23} , A_{14} , A_{27} , A_{28} , y A_{31} es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. Un péptido según la reivindicación 2, en el que A_3 es Ser; A_5 es Ile; A_7 es Leu o Cha; A_8 es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A_{11} es Leu, o Cha; A_{12} es Gly; A_{15} es Leu, o Cha; A_{16} es Asn; A_{17} es Ser; A_{18} es Met o Nle; A_{21} es Val; A_{27} es Lys, hArg, o Cha; A_{32} es His; A_{31} es Val, Nle, o Cha; A_{33} es Asn; A_{34} es Phe, Tyr o Amp; R_1 es H; R_2 es H; y R_3 es NH_2 ; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Un péptido según la reivindicación 3, en el que al menos uno de A_7 y A_{11} es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. Un péptido según la reivindicación 4, en el que dicho péptido es $[\text{Cha}^{7,11}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{7,11}, \text{Nle}^{8,18}, \text{Tyr}^{34}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{11}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{7,11,15}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; o $[\text{Cha}^7]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

6. Un péptido según la reivindicación 3, en el que al menos uno de A_{15} , A_{23} , A_{24} , A_{27} , A_{28} , y A_{31} es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. Un péptido según la reivindicación 6, en el que dicho péptido es $[\text{Cha}^{23}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$, $[\text{Cha}^{24}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$, $[\text{Nle}^{8,18}, \text{Cha}^{27}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$, $[\text{Cha}^{28}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$, $[\text{Cha}^{31}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{24,28,31}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{24,28,31}, \text{Lys}^{30}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; $[\text{Cha}^{28,31}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; o $[\text{Cha}^{15}]\text{hPTH}(1-34)\text{NH}_2$; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

8. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que A_{12} es Aib; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

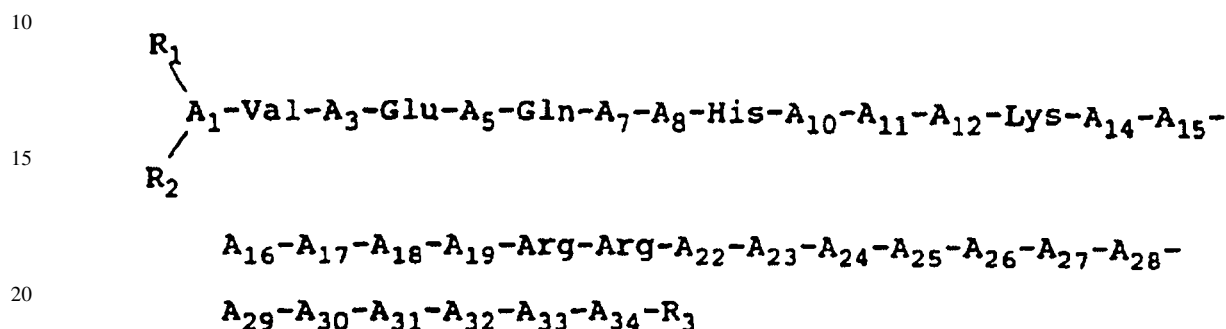
9. Un péptido según la reivindicación 8, en el que A_3 es Ser; A_5 es Ile; A_7 es Leu o Cha; A_8 es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A_{11} es Leu o Cha; A_{15} es Leu o Cha; A_{16} es Asn; A_{18} es Met, o Nle; A_{21} es Val; A_{27} es Lys, Aib, Leu, hArg, o Cha; A_{31} es Val, Nle, o Cha; A_{32} es His; A_{33} es Asn; A_{34} es Phe, Tyr, o Amp; R_1 es H; R_2 es H; y R_3 es NH_2 ; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

ES 2 329 233 T3

10. Un péptido según la reivindicación 1, en el que al menos A₁ es Dap, A₇ es β-Nat, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe; A₁₅ es β-Nal, Trp, Pal, Phe o p-X-Phe, A₂₇ es hArg, o A₃₁ es Nle; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 11. Un péptido según la reivindicación 10, en el que A₃ es Ser; A₈ es Met, Nva, Leu, Val, Ile, o Nle; A₁₆ es Asn; A₁₈ es Met, o Nle; A₂₁ es Val; A₂₇ es Lys, Aib, Leu, hArg, o Cha; A₃₁ es Val, Nle, o Cha; A₃₂ es His; A₃₃ es Asn; A₃₄ es Phe, Tyr, Amp; R₁ es H; R₂ es H; y R₃ es NH₂; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

12. Un péptido con la fórmula:



en el que

25 A₁ es Ala, Ser, o Dap; A₃ es Ser; A₅ es His, Ile, o Cha; A₇ es Leu, Cha, Nle, β-Nat, Trp, Pal, Phe, o p-X-Phe en el que X es OH, un halógeno, o CH₃; A₈ es Leu, Met, o Cha; A₁₀ es Asp o Asn; A₁₁ es Lys, Leu, Cha, Phe, o β-Nal; A₁₂ es Gly o Aib; A₁₄ es Ser o His; A₁₅ es Ile, o Cha; A₁₆ es Gln; A₁₇ es Asp; A₁₈ es Leu o Cha; A₁₉ es Arg; A₂₂ es Phe, Glu, o Cha; A₂₃ es Phe, Leu, Lys, o Cha; A₂₄ es Leu, Lys, o Cha; A₂₅ es His, o Glu; A₂₆ es His, o Lys; A₂₇ es Leu, Lys, o Cha; A₂₈ es Ile, Leu, Lys, o Cha; A₂₉ es Ala o Glu; A₃₀ es Glu, Cha, o Lys; A₃₁ es Ile, Leu, Cha, Lys, o está suprimido; A₃₂ es His o está suprimido; A₃₃ es Thr o está suprimido; A₃₄ es Ala, Aib o está suprimido; cada uno de R₁ y R₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₁₂, fenilalquilo C₇₋₂₀, naftilalquilo C₁₁₋₂₀, hidroxialquilo C_{1-C12}, hidroxialquenilo C₂₋₁₂, hidroxifenilalquilo C₇₋₂₀, o hidroxinaftilalquilo C₁₁₋₂₀; o uno y sólo uno de R₁ y R₂ es COE₁ en el que E₁ es alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilalquilo C₇₋₂₀, naftilalquilo C₁₁₋₂₀, hidroxialquilo C₁₋₁₂, hidroxialquenilo C₂₋₁₂, hidroxifenilalquilo C₇₋₂₀, o hidroxinaftilalquilo C₁₁₋₂₀; y R₃ es OH, NH₂, alcoxi C₁₋₁₂, o NH-Y-CH₂-Z en el que Y es un resto hidrocarbonado C₁₋₁₂ y Z es H, OH, CO₂H o CONH₂; con la condición de que al menos uno de A₅, A₇, A₈, A₁₁, A₁₅, A₁₈, A₂₂, A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, A₃₀, o A₃₁ es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 13. Un péptido según la reivindicación 12, en el que al menos uno de A₁₂ o A₃₄ es Aib; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 14. Un péptido según la reivindicación 13, en el que A₂₂ es Phe o Cha; A₂₃ es Phe o Cha; A₂₅ es His; A₂₆ es His; A₂₇ es Leu o Cha; A₂₈ es Ile o Cha; A₂₉ es Ala; A₃₀ es Glu o Lys; A₃₁ es Ile o Cha; A₃₂ es His; A₃₃ es Thr; y A₃₄ es Ala; una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 15. Un péptido según la reivindicación 14, en el que al menos uno de A₇ o A₁₁ es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 16. Un péptido según la reivindicación 12, en el que A₂₂ es Glu, o Cha; A₂₃ es Leu, Lys, o Cha; A₂₅ es Glu; A₂₆ es Lys; A₂₈ es Leu, Lys, o Cha; A₂₉ es Glu; A₃₀ es Cha, o Lys; A₃₁ es Leu, Cha, o Lys; A₃₂ es His; A₃₃ es Thr; y A₃₄ es Ala; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

50 17. Un péptido según la reivindicación 16, en el que al menos uno de A₇ y A₁₁ es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

55 18. Un péptido según la reivindicación 12, en el que al menos uno de A₂₃, A₂₄, A₂₇, A₂₈, o A₃₁ es Lys; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

60 19. Un péptido según la reivindicación 18, en el que A₂₂ es Glu, o Cha; A₂₃ es Leu, Lys, o Cha; A₂₅ es Glu; A₂₆ es Lys; A₂₈ es Leu, Lys, o Cha; A₂₉ es Aib; A₃₀ es Cha, o Lys; A₃₁ es Leu, Cha, o Lys; A₃₂ es His; A₃₃ es Thr; y A₃₄ es Ala; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

65 20. Un péptido según la reivindicación 19, en el que al menos uno de A₇ y A₁₁ es Cha; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

21. Un péptido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en una composición terapéutica.

ES 2 329 233 T3

22. Un péptido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para su uso en una composición terapéutica con el fin de estimular el crecimiento óseo.

5 23. Un péptido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para su uso en una composición terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis y/o fracturas óseas.

10 24. El uso de un péptido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la fabricación de un medicamento con el fin de estimular el crecimiento óseo o un medicamento para el tratamiento de la osteoporosis y/o fracturas óseas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65