



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 159**

51 Int. Cl.:
C07K 14/585 (2006.01)
A61K 38/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98115797 .7**
96 Fecha de presentación : **21.08.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **0909765**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.1999**

54 Título: **Análogos de calcitonina que tienen una actividad hipocalcémica aumentada *en vivo*.**

30 Prioridad: **21.08.1997 DE 197 36 457**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung
der angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27C
80686 München, DE**

72 Inventor/es: **Kapurniotu, Afroditi;
Bernhagen, Jürgen y
Brunner, Herwig**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 316 159 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).

ES 2 316 159 T3

DESCRIPCIÓN

Análogos de calcitonina que tienen una actividad hipocalcémica aumentada *en vivo*.

5 La presente invención se refiere a calcitoninas y derivados de calcitonina con efecto hipocalcémico. Tales calcitoninas y derivados de calcitonina se emplean especialmente en el campo de la industria farmacéutica y en el campo de la medicina, por ejemplo para el tratamiento de osteoporosis de la enfermedad de Paget o de hipercalcemia.

10 Las calcitoninas son hormonas de péptidos, que están constituidas por 32 aminoácidos. En virtud de su efecto hipocalcémico y de la inhibición provocada con ello de la desintegración ósea, poseen gran importancia farmacéutica. Se emplean terapéuticamente para el tratamiento de osteoporosis, de la enfermedad de Paget o de hipercalcemia. En este caso se utilizan especialmente las calcitoninas del hombre (hCt), del cerdo (pCt) y de especies ultimobranquiales, como el salmón (sCt) y la anguila (eCt).

15 Las calcitoninas o sus derivados de especies ultimobranquiales posee *in vivo* una actividad de 20 a 25 veces mayor que la calcitonina humana. Por lo tanto, estas calcitoninas se emplean con preferencia para fines terapéuticos. Las calcitoninas de las especies ultimobranquiales se diferencian, sin embargo, en su secuencia de aminoácidos en una medida considerable del péptido de la calcitonina humana. Por ejemplo, la calcitonina de salmón se diferencia en 16 de los 32 aminoácidos de la calcitonina humana. Sin embargo, se aplica hasta ahora porque en virtud de su acción
20 considerablemente más elevada, se puede mantener más baja la dosificación para fines terapéuticos.

25 Sin embargo, en las calcitoninas de especies ultimobranquiales es un inconveniente que en virtud de las diferencias de aminoácidos, provocan una inmuno-reacción en el hombre. Esta alta antigenicidad conduce a la formación de anticuerpos contra la calcitonina respectiva empleada terapéuticamente, con frecuencia ya al cabo de seis meses después de la aplicación. Esta alta antigenicidad conduce a continuación a resistencia secundaria y a des-sensibilización frente a la calcitonina empleada. Esto requiere, por otra parte, la aplicación de dosis más elevadas, que conducen de nuevo a la formación más elevada de anticuerpos y, por lo tanto, a resistencia secundaria así como a otros efectos secundarios (contraindicaciones).

30 A partir de las calcitoninas conocidas se conocen otros derivados más activos frente a la forma nativa. Por ejemplo, una sustitución de tres a cinco restos de aminoácidos en el lado hidrófobo de la región α -helicoidal potencial (8-22) de hCt a través de leucinas conduce a análogos de calcitonina más activos. La actividad de los derivados de calcitonina se atribuye en este caso a una relación estrecha entre una región α -helicoidal anfífila potencial entre los restos de aminoácidos 8 y 22 y la acción biológica de la molécula, por otra parte se atribuye a la flexibilidad de la conformación
35 y a las acciones "a través del espacio" de diferentes regiones moleculares.

No obstante, aparte de sCt y de α -ácido aminosuberínico-1,7-eCt, estos análogos no han encontrado otra aplicación clínica hasta ahora para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

40 Puesto que, en virtud de la alta tasa de desintegración proteolítica (periodo de semi desintegración) de las calcitoninas empleadas terapéuticamente en este momento, deben administrarse cantidades relativamente altas, conduciendo esto -como se ha descrito anteriormente- a una formación rápida de anticuerpos (resistencia secundaria) y a eventuales efectos secundarios (contraindicaciones), se da una gran importancia a la elevación de la bioactividad o a la resistencia de proteolisis.

45 Tales análogos estabilizados de conformación de hCt con elevada acción hipocalcémica se conocen a partir del documento DE 44 31 121 A1. En esta publicación se describen derivados de hCt, en los que a través de la introducción de un puente de lactama covalente entre los aminoácidos en posiciones 17 y 21 se genera una estructura de anillo de 10 eslabones, por ejemplo porque el aminoácido en posición 17 es ácido asparágico y el aminoácido en posición 21 es lisina. Estos análogos hCt poseen una estabilidad de conformación elevada y una acción hipocalcémica elevada.
50

Sin embargo, esta acción hipocalcémica no es todavía suficiente para posibilitar una aplicación terapéutica de estos análogos hCt para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente.

55 El cometido de la presente invención es poner a disposición calcitoninas y derivados de calcitoninas, que presentan una estabilidad de conformación elevada y poseen una actividad biológica alta.

Este cometido se soluciona a través de las calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 en combinación con sus rasgos característicos.

60 Las calcitoninas y los derivados de calcitonina de acuerdo con la invención poseen un puente entre los aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 17 y 2 de la calcitonina humana. En estas posiciones están incorporados aminoácidos de tal manera que a través del puente se forma un anillo, que presenta 18 ó 19 eslabones. En oposición a la estructura de anillo de 20 eslabones conocida a partir del estado de la técnica, las calcitoninas de acuerdo con la invención están estabilizadas con respecto a su conformación, de manera que se ralentiza la desintegración proteolítica. Además, estas calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la invención presentan una actividad muy alta, con lo que es posible una dosificación reducida. Puesto que la secuencia es muy similar a la molécula humana, no se produce ninguna inmuno reacción (ninguna resistencia secundaria). En general, se ha comprobado
65

ES 2 316 159 T3

que la reducción del anillo en comparación con el estado de la técnica conduce a una actividad muy alta, de manera que una estructura de anillo de 19 ó 18 eslabones es adecuada como estructura de guía para otros análogos potentes de calcitonina más allá de los descritos en los ejemplos.

5 Los desarrollos ventajosos de las calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Los aminoácidos en las posiciones 17 y 21 pueden estar puenteados por medio de enlaces adecuados o, con una selección correspondiente de los aminoácidos, a través de un puente de lactama. Poseen propiedades especialmente ventajosas las calcitoninas, en las que en las posiciones mencionadas se encuentran ácido asparagínico y ornitina en lugar de asparagina y treonina. Esta calcitonina es 360 veces más activa que la calcitonina humana original y siempre todavía 3 veces más activa que la calcitonina de salmón (sCt).

15 También a través de la introducción de ácido glutamínico y ácido α , γ -diaminobutírico en lugar de asparagina y treonina en las posiciones 17 y 21 se genera un anillo de 19 eslabones y un análogo de alta actividad.

El derivado de calcitonina de acuerdo con la invención con anillo de 18 eslabones se obtiene a través de la sustitución de los aminoácidos asparagina y treonina en las posiciones 17 y 21, respectivamente, por ácido asparagínico y ácido α , γ -diaminobutírico. Este derivado de calcitonina es aproximadamente 30 veces más activo que la calcitonina humana original.

En esta invención se indican otros análogos muy activos con un anillo de 19 ó 18 eslabones, incluyendo las siguientes parejas de aminoácidos en las posiciones 17 y 21 de la calcitonina 21: ácido asparagínico y ácido α , γ -diaminobutírico o ácido α , γ -diaminobutírico y ácido asparagínico o ácido glutamínico y ácido α , γ -diaminobutírico o ácido α , γ -diaminobutírico y ácido glutamínico o ácido 2-aminoadípico y serina o serina y ácido 2-aminoadípico o ácido glutamínico y serina o serina y ácido glutamínico.

La elevación mencionada de la estabilidad y de la actividad a través de la introducción del sistema de anillo de 18 eslabones o bien de 19 eslabones de acuerdo con la invención no se obtiene, sin embargo, solamente en calcitonina humana, sino también en las calcitoninas del cerdo o de las especies ultimobranquiales como salmón y anguila o sus análogos conocidos hasta ahora. Por ejemplo, la actividad de un análogo altamente activo conocido, en el que las posiciones 1 y 7 están sustituidas por un resto de ácido α -aminosuberínico, se puede incrementar adicionalmente a través de la introducción de un anillo de 18 eslabones o de 19 eslabones, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, también en los análogos ya conocidos, a través de la invención la estructura de anillo de 18 o bien de 19 eslabones de acuerdo con la invención se obtiene una mejora de la estabilidad y de la actividad.

A continuación se muestran algunos ejemplos de las calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la invención así como su producción. En este caso:

40 La figura 1 muestra la estructura primaria de la calcitonina humana de acuerdo con el código de una letra para aminoácidos.

La figura 2 muestra la estructura primaria de la ciclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt de acuerdo con el código de una letra para aminoácidos.

45 La figura 1 muestra la estructura primaria de la calcitonina humana. En las posiciones 17 y 21 se encuentra asparagina o bien treonina.

La figura 2 muestra una calcitonina humana de acuerdo con la invención, en la que los aminoácidos en las posiciones 17 y 21 están sustituidos por ácido asparagínico u ornitina y sus cadenas laterales están unidas covalentemente para la generación de un anillo de 19 eslabones a través de un puente de lactama. En este caso, la secuencia de aminoácidos está escrita en el código de una letra, pero los aminoácidos 17 y 21 se representa, para una ilustración mejorada, de acuerdo con el código de tres letras y sus cadenas laterales conectadas a través de un puente de lactama con sus fórmulas de la estructura. Además, se indica el puente S-S entre Cys¹ y Cys⁷.

55 Esta calcitonina de acuerdo con la invención posee una actividad, que está en el ensayo *in vivo* en el ratón en torno a 363 veces por encima de la actividad de la calcitonina humana representada en la figura 1. Por consiguiente, en esta calcitonina representada en la figura 2 son ventajosas su alta actividad y su alta estabilidad de conformación, por lo que es posible una dosificación reducida para fines terapéuticos. Esto conduce a que no sean previsibles resistencias secundarias. Además, en este caso se trata de la primera calcitonina humana, que presenta una actividad suficientemente alta para la aplicación terapéutica. Puesto que la estructura primaria, además de la sustitución de asparagina por ácido asparagínico solamente en otro aminoácido (ornitina en lugar de treonina) se desvía en una medida insignificante de la estructura primaria de la calcitonina humana nativa, solamente son previsibles inmuno reacciones muy reducidas o ninguna y, por lo tanto, se pueden prevenir en gran medida los efectos secundarios (como, por ejemplo, resistencia secundaria).

En lugar de ácido asparagínico u ornitina en las posiciones 17 y 21, respectivamente, se consigue también a través de la utilización de ácido glutamínico un anillo de 19 eslabones, con lo que se obtiene un derivado de calcitonina

ES 2 316 159 T3

humana, que presenta de la misma manera una alta actividad y alta estabilidad con una inmuno reacción al mismo tiempo extraordinariamente reducida.

Como ejemplo de un anillo de 18 eslabones se indica aquí el derivado de calcitonina, en el que en las posiciones 17 y 21 están dispuestos, respectivamente, ácido asparagínico y ácido α , γ -diaminobutírico. De esta manera se obtiene un derivado de la calcitonina humana con un anillo de 18 eslabones, que presenta igualmente una alta actividad, alta estabilidad de conformación, de manera que en virtud de las reducidas diferencias con respecto a la secuencia primaria de la calcitonina humana nativa, solamente se produce una inmuno reacción reducida.

Las mejoras mencionadas de la actividad y de la estabilidad se pueden conseguir igualmente en calcitoninas ya conocidas, por ejemplo del salmón, de la anguila o del cerdo, y sus análogos ya conocidos.

Las calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la invención se producen esencialmente por síntesis de péptidos.

A continuación se describe a modo de ejemplo la síntesis y purificación, caracterización y ensayo de la actividad biológica de la ciclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt de la figura 1.

Síntesis y purificación

Para la síntesis de los análogos de calcitonina estabilizados en la conformación descritos en esta invención se emplea el método de fases fijas de la síntesis de péptidos en combinación con un método para la producción de péptidos cíclicos puenteados con lactama a través de las cadenas laterales, directamente sobre el soporte polímero (resina) según Félix A. M. y col (Int. J. Pept. Prot. Res. 32 (1988), 441-445). La síntesis del análogo hCt ciclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt se describe en detalle a continuación.

En primer lugar se produce la resina de péptido (N-Boc-(hCt(22-32))-MBHA) de acuerdo con métodos habituales de la síntesis de péptido de fases fijas como se indica a continuación:

Se neutralizaron 4 g de una resina de p-metilbenzidrilamina, que estaba presente en forma de una sal HCl, con una carga de 0,65 mmol/g, en un agitador en primer lugar con trietilamina en DMF (dimetilformamida) y se lavaron con diclorometano (DCM). Siguió la adición de Boc-Pro-OH y DCC en exceso triple (7,2 mmol) en diclorometano (30 ml), y la suspensión de reacción se agitó en el transcurso de 18 horas. A continuación, se lavó el polímero con DCM, iPrOH, DCM, DMF y se determinó la carga de la resina de acuerdo con el método de ácido pícrico (0,62 mmol/g). Los grupos amino libres se acetilaron por medio de anhídrido de ácido acético (26 mmol) y piridina (26 mmol) en DCM (30 ml) (1 h) y se lavaron, como es habitual. Para la prolongación siguiente de la cadena de péptidos se utilizó el método TBTU (exceso triple de aminoácido protegido) en DMF. La terminación de los acoplamientos se verificó por medio del ensayo de Kaiser. Para Ile²⁷ y Phe²² se realizaron acoplamientos dobles. Los derivados de aminoácido están protegidos con N-Boc y se introdujo Thr como Boc-Thr(Bz). Para la disociación del grupo Boc se utilizó TFA al 50% (ácido trifluoroacético) en DMC (30 minutos). La resina de péptido 1 obtenida como se ha descrito anteriormente tiene una sustitución de 0,57 mmol/g y se caracteriza por medio de análisis de aminoácido y FAB-MS después de la disociación del péptido a partir de la parte pequeña de la resina de péptido. Una parte de la resina de péptido a obtenida descrita anteriormente (500 mg; 0,17 mmol) se acopló con Boc-Orn (Fmoc) (1 mmol) y a continuación se acetiló en presencia de piridina (1 mmol). La resina de péptido "diluida" obtenida (carga 0,21 mmol/g de resina) se prolongó entonces hasta el resto de aminoácido Asp¹⁷ (método de acoplamiento como se ha descrito para 1). En este caso, se utilizaron derivados de aminoácido protegidos con N-Boc, y se emplearon His²⁰ y Lys¹⁸ como Boc-Lys (2ClZ) y Boc-His (Bom). El grupo N^o-Fmoc de Orn²¹ y la protección de fluorenil metil éster (OFM) del β -carboxilo de Asp¹⁷ se disociaron a través de tratamiento con una solución de piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min; 1 x 28 min) de acuerdo con el método de Felix y col. (Felix, A. M. Y col., Int. J. Pept. Protein res. 32 (1988) 441-454). El puente de lactama entre las cadenas laterales, liberadas de grupos de protección, de Asp¹⁷ y Orn²¹, se realizó entonces a través de la adición de BOL (benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio hexa fluorofosfato) (0,3 mmol) y DIEA (0,34 mmol) en DMF (50 ml) a la resina de péptido y a través de agitación siguiente (durante 4 horas). La ciclación se siguió a través del ensayo de Kaiser.

Después de la retirada de los reactivos de acoplamiento, se acetiló la resina de péptido como se ha descrito anteriormente. La prolongación siguiente de la resina de péptido obtenida de esta manera con aminoácidos protegidos con N-Boc se realizó de acuerdo con el método de acoplamiento TB TU. Las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales se protegieron de la siguiente manera:

Se trataron Asp (β -OCH₃), Cys(S-p-Mb), Glu (γ -Obzl), Thr (Bzl) y Tyr(2BrZ) · 100 g del NH₂-ciclo^{17,21} -[Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt-MBHA con una mezcla de HF/anisol/ dietilsulfuro/p-tiocresol en la relación 10/1/1/0,2 /v/v/v/p), que contenía también cisteína en una concentración final de 0,27 M, (durante 30 minutos a 20°C y 1 hora a 0°C). El producto bruto liberado de grupos de protección y disociado de la resina se precipitó a través de la adición de éter, se lavó tres veces con éter y se extrajo en ácido acético al 10% (4 x 20 ml) y se liofilizó. Siguió la oxidación al aire de este producto bruto para cerrar el puente de disulfuro en una solución de 0,1 M NH₄HCO₃ con alta disolución (10-4 M) en la oscuridad (24 horas). A continuación se liofilizó la solución. El producto bruto obtenido de esta manera se purificó a través de fases invertidas preparatorias sobre una columna de C¹⁸. Se utilizó un gradiente de 30-70% B durante 30

ES 2 316 159 T3

minutos, donde A está constituido por 0,058% TFA en agua y B está constituido por 0,05% TFA en acetonitrilo al 90%. La detección de los péptidos se realizó a 220 nm.

5 La síntesis y purificación de los otros análogos de hCt con estructura de anillo de 19 ó 18 eslabones se realizó de una manera similar.

Caracterización

10 La pureza de la ciclo^{17,21}-[Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt obtenida de esta manera se determinó a través de análisis de aminoácidos. Para la verificación de la identidad se empleó, además, MALDI-TOP-espectrometría de masas o electrospray-espectrometría de masas. La determinación de la conformación de los análogos se realizó a través de circulas dicroísmo - espectropolarimetría.

15 *Ensayo de la actividad biológica*

La actividad biológica de los análogos se determinó por medio de un ensayo hipocalcémico *in vivo* en ratones BALB/c.

20 La tabla 1 muestra la determinación en función de la dosis del efecto hipocalcémico de la ciclo^{17,21}-[Asp¹⁷, Orn²¹]-hCt en comparación con calcitonina humana nativa (hCt) y calcitonina de salmón (sCt). La actividad biológica se representa como porcentaje [%] de actividad del efecto hipocalcémico máximo alcanzable en este ensayo, como se consigue a través de 2 µg hCt.

25

TABLA 1

30

Concentración	Ciclo ^{17,21} [Asp ¹⁷ , Orn ²¹]- hCt	hCt	sCt
(ng/ml)	(%)	(%)	(%)]
10	86,8	35,2	-
1	76,3	15,8	63,2
0,1	68,4	5,8	51,6
0,01	36,8	-	21,1

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Calcitoninas y derivados de calcitonina con un puente entre los aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 17 y 21 de la calcitonina humana, **caracterizados** porque en estas posiciones están dispuestos aquellos aminoácidos, en los que el anillo formado por el puente presenta 18 ó 19 eslabones.

10 2. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados** porque los aminoácidos en las posiciones 17 y 21 están puenteados por medio de un puente de lactama.

15 3. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados** porque los aminoácidos están puenteados en las posiciones 17 y 21 a través de enlaces adecuados.

20 4. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados** porque en las posiciones 17 y 21 se encuentran, respectivamente, ácido asparagínico o bien ornitina u ornitina o bien ácido asparagínico.

25 5. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados** porque en las posiciones 17 y 21 se encuentran parejas de ácido asparagínico y de ácido α , γ -diaminobutírico y ácido asparagínico o ácido glutamínico y ácido α , γ -diaminobutírico o ácido α , γ -diaminobutírico y ácido α , γ -diaminobutírico y ácido glutamínico o ácido 2-aminoadípico y serina o serina y ácido 2-aminoadípico o ácido glutamínico y serina o serina y ácido glutamínico.

30 6. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados** porque su secuencia de aminoácidos corresponde, por lo demás, a la secuencia de las calcitoninas conocidas o bien los análogos de calcitonina, especialmente del hombre, del salmón, de la anguila o del cerdo.

35 7. Calcitoninas y derivados de calcitonina de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados** porque los restos de cisteína en las posiciones 1 y 7 están sustituidos por un resto de ácido α -aminosuberínico.

40

45

50

55

60

65

