

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 553**

51 Int. Cl.:

C07K 7/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011 PCT/NL2011/050793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12070936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011 E 11791636 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2643342**

54 Título: **Novedosos agonistas de receptor tipo 2 de angiotensina (AT2) y sus usos**

30 Prioridad:

23.11.2010 EP 10192208

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

14.09.2017

73 Titular/es:

**LANTHIOPEP B.V. (100.0%)
Rozenburglaan 13B
9727 DL Groningen, NL**

72 Inventor/es:

**DE VRIES, LOUWE;
NELEMANS, SIEGER ADRIAAN;
RINK, RICK;
ROKS, ANTONIUS JACOBUS MARINUS y
MOLL, GERT NIKOLAAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 632 553 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

Novedosos agonistas de receptor tipo 2 de angiotensina (AT2) y sus usos

5 La invención se relaciona con péptidos novedosos farmacéuticamente útiles, en particular péptidos cíclicos que son agonistas del receptor tipo 2 de angiotensina II (en lo sucesivo el receptor AT2). La invención se relaciona además con el uso de tales péptidos como fármacos, con composiciones farmacéuticas que los contienen y con rutas de síntesis para su producción.

10 La hormona endógena AngII es un octapéptido lineal (Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7-Fe8), y es el componente activo del sistema renina-angiotensina (RAS). Es producida por el procesamiento secuencial de la prohormona angiotensinógeno por enzima que convierte renina y angiotensina (ACE). El RAS juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, fluido corporal y homeostasis de electrolitos. Ang II ejerce estas acciones fisiológicas en muchos órganos incluyendo los riñones, las glándulas adrenales, el corazón, vasos sanguíneos, el cerebro, el tracto gastrointestinal y los órganos reproductores (de Gasparo et al, Pharmacol. Rev. (2000) 52, 415-472). Se han identificado dos clases de receptores de AngII, y se han designado como el receptor tipo 1 (en lo sucesivo el receptor AT1) y el receptor AT2. El receptor AT1 se expresa en muchos órganos y se cree que es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de AngII. El AT 2 es más prevalente que el receptor AT1 en tejidos fetales, los ovarios adultos, la médula adrenal y el páncreas. En una distribución igual es reportado en el cerebro y útero (Ardaillou, J. Am. Soc. Nephrol., 10, S30-39 (1999)). Varios estudios en individuos adultos parecen demostrar que, en la modulación de la respuesta que sigue al estímulo con AngII, la activación del receptor AT2 tiene efectos opuestos a aquellos mediados por el receptor AT1.

25 Se ha mostrado también que el receptor AT2 está involucrado en apoptosis e inhibición de la proliferación celular (véase de Gasparo et al, supra). Además, parece jugar un papel en el control de la presión sanguínea. La relevancia funcional del receptor AT2s en enfermedad cardiovascular es discutida en Jones et al. (Pharmacology & Therapeutics 120 (2008) 292-316). Se ha mostrado también que la expresión de los receptores AT2 aumenta durante circunstancias patológicas, tales como daño vascular, curación de heridas y falla cardíaca (véase de Gasparo et al, supra).

30 En de Gasparo et al, supra se describen de manera general los efectos farmacológicos esperados de agonismo del receptor AT2. Los agonistas de receptor AT2 han mostrado tener utilidad potencial en el tratamiento y/o profilaxis de desórdenes del tracto alimentario, tales como dispepsia y síndrome de colon irritable, así como múltiples fallas de órganos (véase WO 99/43339).

35 Los antagonistas de AngII (que se unen a los receptores AT1 y/o AT2) han sido divulgados entre otros en los documentos europeos EP 409 332, EP 512 675; en los documentos internacionales WO 94/27597, WO 94/02142, WO 95/23792 y WO 94/03435; y documentos de EEU nos. 5,091,390, 5,177,074, 5,412,097, 5,250,521, 5,260,285, 5,376,666, 5,252,574, 5,312,820, 5,330,987, 5,166,206, 5,932,575 y 5,240,928. El documento de EEUU 2009/326026 divulga el uso de compuestos tricíclicos que contienen imidazole como agonista de AT2. El documento WO 2004046128 se relaciona con compuestos bicíclicos que son útiles como agonistas selectivos del receptor AT2.

45 Por ejemplo, en los documentos internacionales WO 00/38676, WO 00/56345, WO 00/09144, WO 99/58140, WO 99/52540, WO 99/46285, WO 99/45945, WO 99/42122, WO 99/40107, WO 99/40106, WO 99/39743, WO 99/26644, WO 98/33813, WO 00/02905 y WO 99/46285; US 5,834,432; y documento japonés JP 143695 se han divulgado agonistas de péptido y no péptido de receptor AT2, no relacionados estructuralmente con aquellos descritos aquí, y usos potenciales de los mismos.

50 En vista del reconocimiento reciente del receptor AT2 como un nuevo objetivo importante para terapia, por ejemplo en el cuidado total de pacientes con hipertensión, hay disposición para identificar agonistas de receptor AT2 más efectivos y/o selectivos, de los que se espera encontrar utilidad, entre otros, en las condiciones mencionadas anteriormente. Se ha hallado de manera sorprendente que análogos de péptido de Ang(1-7) que forman ciclo con tioéter, extendidos con un aminoácido adicional en el extremo N, son potentes agonistas del receptor AT2.

55 De acuerdo con ello, se suministra un compuesto de péptido cíclico que consiste en la secuencia de aminoácidos Xaa¹- Asp-Arg- Ile/Val- Xaa⁵- Ile/Val- His- Xaa⁸ que comprende un enlace de puente de tioéter entre las cadenas laterales de Xaa⁵ y Xaa⁸, de modo que los aminoácidos Xaa⁵ y Xaa⁸ forman juntos una estructura de acuerdo con una cualquiera de la fórmula general:

A



60

B



C



5 en las que R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son seleccionados independientemente de -H, un grupo alquilo o aralquilo C₁-C₁₀, y en las que Xaa¹ es seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos cargados, aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos, y variantes de ellos resistentes a la proteasa, o una sal de ellos farmacéuticamente aceptable.

10 Los compuestos de péptido y sales son denominados en lo sucesivo aquí como "los compuestos de la invención".

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Ejemplos de tales sales son sales de adición ácida formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares. Las sales pueden ser formadas también con ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico y similares. Pueden formarse sales con cationes de metal polivalente tales como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel y similares o con un catión orgánico formado de N,N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina, o combinaciones de ellos (una sal de tanato de zinc). Se prefieren las sales no tóxicas, fisiológicamente aceptables. Tales sales pueden formarse por medios convencionales, por ejemplo mediante reacción de una forma de ácido libre o base libre, de un compuesto de la invención con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiados, opcionalmente en un solvente, o en un medio en el cual la sal es insoluble, seguido por retiro de dicho solvente o dicho medio, usando técnicas estándar (por ejemplo secado al vacío o por congelación). Pueden prepararse las sales también intercambiando un ion contrario de un compuesto de la invención en la forma de una sal con otro ion contrario, por ejemplo usando una resina de intercambio iónico adecuada. Preferiblemente, se seleccionan R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ independientemente de H y CH₃.

Se encontró que la interacción de receptor AT₂ requiere la presencia de un anillo lantionina que une los aminoácidos en las posiciones 5 y 8 en la fórmula de arriba. Además, la extensión terminal en N debería estar limitada a un residuo individual de aminoácido, dado que se halló que la adición de un segundo residuo adicional anuló la interacción de receptor AT₂.

En una realización, la invención suministra un péptido que comprende un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula A, es decir en la que el enlace entre los aminoácidos en las posiciones 5 y 8 tiene el significado -RCR¹-S-R²CR³-, en la que R, R¹, R² y R³ son seleccionados independientemente de -H, un grupo alquilo o aralquilo C₁-C₁₀. R, R¹, R² y R³ son seleccionados preferiblemente de manera independiente de H y CH₃. Los péptidos que comprenden un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula A pueden ser hechos por ejemplo mediante enzimas lantibióticas o por extrusión de azufre de un disulfuro. El disulfuro a partir del cual el azufre es extrudido puede estar formado por una D-cisteína en posición 5 y una L-cisteína en posición 8 o por una D-cisteína en posición 5 y una L-penicilamina en posición 8 [Galande, Trent y Spatola 2003 Biopolymers 71, 534-551].

De modo alternativo, el enlace de los dos aminoácidos puede estar compuesto de RCR¹-R²CR³-S-R⁴CR⁵ (fórmula B) o RCR¹-S-R⁴CR⁵-R²CR³ (fórmula C), en las cuales R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan independientemente -H, un grupo alquilo o aralquilo C₁-C₁₀. Los péptidos que comprenden un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula B pueden ser hechos por ejemplo mediante extrusión de azufre de un disulfuro formado por una D-homocisteína en posición 5 y una L-cisteína en posición 8 [Galande, Trent y Spatola 2003 Biopolymers 71, 534-551]. De modo similar, pueden hacerse péptidos que comprenden un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula C por ejemplo mediante extrusión de azufre de un disulfuro formado por una D-cisteína en posición 5 y una L-homocisteína en posición 8 [Galande, Trent y Spatola 2003 Biopolymers 71, 534-551].

Es conveniente que un análogo de péptido de la divulgación pueda ser hecho en un sistema biológico, en particular haciendo uso de sistemas de enzima lantibiótica de una célula huésped (bacteriana). De acuerdo con ello, se prefieren los péptidos que comprenden un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula A.

5 En un aspecto, Xaa¹ es un aminoácido con carga positiva, preferiblemente Lys o Arg o variante resistente a la peptidasa o derivado de ellos. En otro aspecto, Xaa¹ es un aminoácido con carga negativa, preferiblemente Asp o Glu o variante resistente a la peptidasa o derivado de ellos. De modo alternativo Xaa¹ es un aminoácido hidrófobo, preferiblemente Ile, Leu o Val, o un aminoácido aromático, preferiblemente Tyr o Phe, o variante resistente a la peptidasa o derivado de ellos. Las variantes resistentes a la peptidasa y derivados pueden proteger los análogos
10 contra la degradación por amino peptidasa(s). En una realización, Xaa¹ es una variante de aminoácido resistente a peptidasa o derivado, por ejemplo uno de los aminoácidos mencionados anteriormente en la configuración D. Otros derivados adecuados incluyen aquellos en los cuales los grupos aminoácidos están formando ciclo para formar una estructura de anillo, como piroglutamato (piroGlu) en el que el extremo es un anillo de lactama.

15 Los residuos en las posiciones 2, 3, 4, 6 y 7 pueden variar, en tanto la actividad biológica se mantenga. En una realización preferida, Xaa² es Asp, Xaa³ es Arg, Xaa⁴ es Val, Xaa⁶ es Ile y/o Xaa⁷ es His. La estereoquímica de los residuos involucrados en el puente de tioéter puede estar en la forma L- o D-. Se prefieren los péptidos cíclicos en los que Xaa⁵ es un estereoisómero D y/o Xaa⁸ es un estereoisómero L. Se prefiere al máximo un análogo en el que Xaa⁵ es un estereoisómeros D y Xaa⁸ es un estereoisómero L. Los análogos de angiotensina-(1-7) que forman ciclo con tioéter son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Kluskens et al. (J Pharmacol Exp Ther. 2009 Mar; 328(3):849-54) y WO2008/130217. Los análogos lineales de angiotensina con o sin extensiones terminales en N de 1 a 3 aminoácidos, han sido descritos por K. Rodgers et al., por ejemplo en los documentos WO99/40106, WO99/52540 y WO96/39164. Sin embargo, no se ha enseñado o sugerido en la técnica un análogo de cAng(1-7)
20 que tiene una extensión terminal en N, con un residuo individual seleccionado de los aminoácidos cargados, aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos.

De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, el compuesto de péptido cíclico es seleccionado del grupo que consiste en

30 Lys-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (abreviado a "K-cAng(1-7)")
Asp-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (abreviado a "D-cAng(1-7)")
Tyr-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (abreviado a "Y-cAng(1-7)")
Ile-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (abreviado a "I-cAng(1-7)")

35 Asn-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (abreviado a "N-cAng(1-7)") bajo la condición de que el péptido no contenga dos residuos Abu (ácido 2-aminobutírico). En vista de su potencia como péptidos con potente dilatación de vasos, se prefieren particularmente los compuestos K-cAng(1-7) y Y-cAng(1-7).

40 Los compuestos de la invención son útiles porque poseen actividad farmacológica. Por ello, los compuestos de la invención son indicados como fármacos. En particular, los compuestos de la invención son agonistas del receptor AT₂, y, en especial, son agonistas selectivos de aquel sub-receptor, por ejemplo como se demuestra en las pruebas descritas abajo. Se espera que los compuestos de la invención sean útiles en aquellas condiciones donde se expresan los receptores AT₂ y se desea o requiere su estímulo.

45 Los compuestos de la invención son indicados además en el tratamiento de condiciones caracterizadas por vasoconstricción, aumento del crecimiento celular y/o diferenciación, aumento en la contractilidad cardíaca, aumento en la hipertrofia cardiovascular, y/o aumento en la retención de fluidos y electrolitos. Además, los compuestos de la invención están indicados en el tratamiento de desórdenes relacionados con la tensión, y/o en la mejora de microcirculación y/o mecanismos protectores de la mucosa. De acuerdo con ello, se espera que los compuestos de la invención sean útiles en el tratamiento de desórdenes que pueden caracterizarse como se indicó anteriormente y que son de, por ejemplo, el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular, el tracto respiratorio, los riñones, los ojos, el sistema reproductivo femenino (ovulación) y el sistema nervioso central (CNS). También se suministra un método para acelerar la reparación de tejidos, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita, de una dosificación terapéuticamente efectiva de un compuesto de péptido de la invención.
50

55 Los desórdenes del tracto gastrointestinal que pueden mencionarse incluyen esofagitis, esófago de Barrett, úlceras gástricas, úlceras duodenales, dispepsia (incluyendo dispepsia de no-úlceras), reflujo gastroesofágico, síndrome de colon irritable (IBS), enfermedad inflamatoria de colon (IBD), pancreatitis, desórdenes hepáticos (tales como hepatitis), enfermedad de la vesícula biliar, falla múltiple de órganos (MOF) y sepsis. Otros desórdenes gastrointestinales que pueden mencionarse incluyen xerostomía, gastritis, gastroparesia, hiperacidez, desórdenes del tracto biliar, coelicia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diarrea, constipación, cólico, disfagia, vómito, náusea, indigestión y síndrome de Sjögren. Los desórdenes del tracto respiratorio que pueden mencionarse incluyen desórdenes inflamatorios, tales como asma, enfermedades pulmonares obstructivas (tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica), neumonitis, hipertensión pulmonar y síndrome de distensión respiratoria aguda. Los desórdenes de los riñones que pueden mencionarse incluyen falla renal, nefritis e hipertensión renal. Los desórdenes de los ojos que pueden mencionarse incluyen retinopatía diabética, retinopatía prematura y
60
65

microvascularización de la retina. Los desórdenes del sistema reproductivo femenino que pueden mencionarse incluyen disfunción de la ovulación. Los desórdenes cardiovasculares que pueden mencionarse incluyen hipertensión, hipertrofia cardíaca, falla cardíaca, arteriosclerosis, trombosis arterial, trombosis venosa, disfunción del endotelio, lesiones del endotelio, estenosis posdilatación con balón, angiogénesis, complicaciones diabéticas, disfunción microvascular, angina, arritmias cardíacas, claudicación intermitente, preeclampsia, infarto del miocardio, reinfarto, lesiones isquémicas, disfunción eréctil y proliferación neointima. Los desórdenes del CNS que pueden mencionarse incluyen disfunciones cognitivas, disfunciones de la ingesta de alimentos (hambre/saciedad) y sed, ataque fulminante, derrame cerebral, embolia cerebral e infarto cerebral. Los compuestos de péptido de la invención son de uso también para el aumento de la eritropoyesis, por ejemplo mediante contacto de células eritroides progenitoras con por lo menos un compuesto de péptido en una cantidad efectiva para aumentar la eritropoyesis.

Los compuestos de la invención pueden ser útiles también en la modulación del metabolismo de crecimiento y proliferación, por ejemplo en el tratamiento de desórdenes hipertróficos, hiperplasia de próstata, desórdenes autoinmunes, psoriasis, obesidad, regeneración neuronal, la curación de úlceras, inhibición de hiperplasia de tejido adiposo, diferenciación y proliferación de células del tallo, cáncer (por ejemplo en el tracto gastrointestinal, cáncer de pulmón, etc), apoptosis, tumores (en general) e hipertrofia, diabetes, lesiones neuronales y rechazo de órganos.

Los compuestos de la invención están indicados en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de las condiciones anteriores.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se suministran así los compuestos de la invención para uso como fármacos. También se suministra una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de péptido de la invención y un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas contienen los compuestos de acuerdo con la invención en mezcla con vehículos orgánicos o inorgánicos adecuados para la administración enteral o parenteral. Así, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas como liofilizados sólidos, en los cuales pueden usarse como vehículos diferentes compuestos inertes, que no reaccionan con péptidos, por ejemplo hidrocarburos. Cuando las composiciones farmacéuticas son formuladas como suspensiones o emulsiones diluidas o concentradas, ellas contienen también diferentes agentes conservantes y agentes estabilizantes. Ilustran los adyuvantes que pueden ser incorporados en comprimidos, cápsulas y similares, los siguientes: un aglutinante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como celulosa microcristalina; un agente de desintegración tal como almidón de maíz, almidón pregelatinizado, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina; un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, adicionalmente a los materiales de los tipos anteriores, un vehículo líquido como aceite graso. Pueden estar presentes otros materiales diferentes, como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con goma laca, azúcar o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un pigmento y un saborizante tal como sabor de cereza o naranja.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se suministra un método para el tratamiento de una condición en la cual la producción endógena de agonistas de receptor AT2 es deficiente, y/o una condición donde se desea o requiere un incremento en el efecto de agonistas de receptor AT2, y/o a condición donde los receptores AT2 se expresan y se desea o requiere su estímulo, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención a una persona que sufre de o es susceptible a, tal condición.

Los compuestos de la invención serán administrados normalmente por vía oral, intravenosa, subcutánea, bucal, rectal, dérmica, nasal, traqueal, bronquial, por cualquier otra ruta parenteral o vía inhalación, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable.

Cuando la condición que va a ser tratada es falla múltiple de órganos, las rutas preferidas de administración son parenterales (por ejemplo por inyección). De otro modo, la ruta preferida de administración para compuestos de la invención es oral. Los compuestos de la invención pueden ser administrados solos, pero son administrados preferiblemente por la vía de formulaciones farmacéuticas conocidas, incluyendo comprimidos, cápsulas o elixires para la administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral o intramuscular, y similares.

Tales formulaciones pueden ser preparadas de acuerdo con prácticas farmacéuticas estándar y/o aceptadas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se suministra así una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención puede ser administrados también en combinación con otros agonistas de AT2 que son conocidos en la técnica, así como en combinación con antagonistas de receptor AT1 que son conocidos en la técnica, tales como losartan, o en combinación con un inhibidor de enzima que convierte angiotensina (ACE), o en

combinación con agonistas de receptor de Mas por ejemplo angiotensina-(1-7) cíclica 4,7 o enzima 2 que convierte angiotensina (ACE2).

5 En un aspecto específico, la divulgación se relaciona con el uso de compuestos de la invención para acelerar el crecimiento o curación de tejidos. Por ejemplo, se suministra un compuesto de péptido de acuerdo con la invención para uso en la reparación de tejidos. También se suministra una composición para acelerar la curación de heridas, que comprende un vehículo o diluyente adecuado y una cantidad efectiva para acelerar la curación de heridas de por lo menos un compuesto de péptido de la invención. El compuesto puede ser administrado en una solución matricial o micelar. En una realización, el compuesto es administrado a una rata de por lo menos 0.1 ng por 10 kilogramo de peso corporal, en un vehículo o diluyente adecuado. El vehículo o diluyente puede ser seleccionado del grupo que consiste en preparaciones de carboximetil celulosa, preparaciones cristaloides, viscoelásticas, polietilenglicoles y polipropilenglicoles. El compuesto puede ser administrado de manera ventajosa conjuntamente con un apósito para heridas.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se suministra un producto de combinación que comprende (A) un compuesto de péptido de la invención; y (B) seleccionado de un antagonista de receptor AT1 o un inhibidor de ACE, y/o (C) un agonista de receptor de Mas, o ACE2, en el que cada uno de los componentes (A), (B) y/o (C) es formulado en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales productos de combinación suministran la administración de compuestos de la invención conjuntamente con un antagonista de 20 receptor AT1, o un inhibidor de ACE, un agonista de receptor de Mas, o ACE2 y puede ser presentado así bien sea como formulaciones separadas, en las que por lo menos una de aquellas formulaciones comprende compuestos de la invención, y por lo menos una comprende por ejemplo antagonista de receptor AT1, o inhibidor de ACE, o puede ser presentada (es decir formulada) como una preparación combinada (es decir presentada como una formulación individual que incluye el compuesto de la invención y antagonista de receptor AT1 o inhibidor de ACE).

25 Así, se suministra adicionalmente:

(1) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención y un antagonista de receptor AT1, o un inhibidor de ACE o un agonista de receptor de Mas, o ACE2, en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y 30

(2) un kit de partes que comprende los componentes:

(a) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y 35

(b) una formulación farmacéutica que incluye un antagonista de receptor AT1, o un inhibidor de ACE, (c) un agonista de receptor de Mas, o ACE2 en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

cuyos componentes (a), (b) y (c) son suministrados en cada caso en una forma que es adecuada para la administración conjunta con los otros. 40

Dependiendo de la enfermedad y paciente que va a ser tratado y la ruta de administración, los compuestos de la invención pueden ser administrados en dosificaciones variables.

45 Aunque las dosificaciones variarán de paciente a paciente, las dosificaciones adecuadas, por ejemplo para administración subcutánea están en el intervalo de aproximadamente 1-1000 microgramos/kg/día por paciente, administrados en dosificaciones individuales. Las dosificaciones diarias más preferidas están en el intervalo de 40 a 80 microgramos/kg/día por paciente. Las dosificaciones intravenosas son idénticas a las dosificaciones subcutáneas. Las dosificaciones pulmonares son aproximadamente 4 veces más altas que las dosificaciones subcutáneas. Las dosificaciones orales son por lo menos cinco veces más altas que las dosificaciones subcutáneas y dependen fuertemente de la formulación aplicada. Los compuestos de la invención pueden ser administrados también una vez 50 por semana. Las dosificaciones semanales son aproximadamente 10 a 30 veces más altas que las dosificaciones diarias.

55 En cualquier caso, el facultativo o la persona experta, serán capaces de determinar la dosificación real que será más adecuada para un paciente individual, la cual probablemente variará con la condición que va a ser tratada, así como con la edad, peso, sexo y respuesta del paciente particular que va a ser tratado. Las dosificaciones mencionadas anteriormente son ejemplos del caso promedio; desde luego, puede haber casos individuales donde ameriten intervalos de dosificación más altos o más bajos, y ellos están dentro del alcance de esta invención. Los compuestos de la invención tienen como ventaja que se unen selectivamente a, y exhiben actividad agonista a, el receptor AT2. 60 Dentro de compuestos que "se unen selectivamente" al receptor AT2, se incluye que la relación de afinidad por el compuesto relevante (AT2:AT1) es por lo menos 5:1, preferiblemente por lo menos 10:1 y más preferiblemente por lo menos 20:1. Los compuestos de la invención pueden tener también como ventaja que ellos pueden ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, tener actividad más prolongada que, ser más potentes que, producir menos efectos secundarios que, ser más fácilmente absorbidos que, y/o tener un mejor perfil farmacocinético (por ejemplo mayor biodisponibilidad oral y/o menor holgura) que, y/o tener otras propiedades farmacológicas, físicas o químicas útiles, sobre compuestos conocidos en la técnica previa. 65

Leyenda a las figuras

Figura 1. KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) son vasodilatadores muy potentes.

5 KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) inducen vasodilatación de anillos de aorta de rata Sprague Dawley contraídos previamente con fenilefridina. x: control; □: angiotensina-(1-7) nativa; ■: cAng-(1-7); ○: KcAng-(1-7); ●: YcAng-(1-7).

Figura 2. Análogos de cAng-(1-7) extendida en N requieren el anillo tioéter 4,7 para acción agonística a través del receptor AT2.

10 cAng-(1-7) es una Ang-(1-7) con puente de tioéter 4,7. XcAng-(1-7), que es cAng-(1-7) con un aminoácido variable adicional en la posición -1 (es decir el residuo marcado como Xaa¹ aquí anteriormente), induce fosforilación de Erk1 (Fig 2A) y Erk2 (Fig 2B) y Erk total (Fig 2C). Barras abiertas: controles; barras rayadas: fosforilación de Erk inducida por péptido; barras negras: fosforilación de Erk inducida por péptido, después del tratamiento con el antagonista de receptor AT2 PD123319. En las barras (Fig 2A y 2B) se indica la identidad del aminoácido "X" en la posición -1 de XcAng-(1-7). El tratamiento previo con PD123319 no afectó la fosforilación de Erk2 inducida por ScAng-(1-7) (Fig 2B), ni la fosforilación total de Erk inducida por DDRVAIHA lineal (Fig 2C). dKcAng-(1-7) es cAng-(1-7) con una extensión terminal en N con un isómero D de Lys.

Figura 3. El estímulo del receptor AT2 no es ejercido por análogos de cAng-(1-7) con extensión terminal en N de dos aminoácidos. Panel A: fosforilación de Erk1 inducida por DcAng-(1-7) y IcAng-(1-7) de Erk1 en células HBE. Panel B: fosforilación total de Erk IDcAng-(1-7) e inducida por IDRRVAIHA en células HBE. Barras abiertas: control; barras rayadas: fosforilación de ERK inducida por péptido sin tratamiento en las células HBE; barras negras: fosforilación de ERK inducida por péptido después de un tratamiento previo con PD123319.

Figura 4. Análogos de cAng-(1-7) extendidos en N no actúan a través del receptor Mas.

25 El antagonista D-Pro7 de receptor Mas no inhibe la vasodilatación inducida por KcAng-(1-7)- y YcAng-(1-7) de anillos de aorta de rata Sprague Dawley contraídos previamente con fenilefridina. x: control; ○: KcAng-(1-7); ∇: KcAng-(1-7) y antagonista D-Pro7 de receptor Mas; ●: YcAng-(1-7); ▼: YcAng-(1-7) y antagonista D-Pro7 de receptor Mas.

30 Ejemplos

Ejemplo 1. KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) son potentes vasodilatadores.

35 Este ejemplo demuestra que los análogos de cAng-(1-7) con extensión en N pueden inducir fuertemente la vasodilatación en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley contraídos previamente.

Materiales y métodos.

40 Péptidos: se compraron de JPT, KDRVdCIHC, y YDRVdCIHC en los que dC representa D-cisteína. Se usaron ratas especificadas Sprague Dawley (SD) masculinas libres de patógenos (Harlan, Zeist, Holanda), con un peso de 350-450 gramos. Antes del experimento, se albergaron los animales juntos con libre acceso a corriente y comida sólida (Harlan, Zeist, Holanda) en una sala con temperatura y humedad controladas y un ciclo luz/oscuridad de 12/12h. Todos los protocolos descritos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Groningen.

45 Se obtuvieron péptidos con puente de tioéter, a partir del péptido con puente de disulfuro mediante extrusión de azufre ayudada con base, como anteriormente (Galante AK, et al 2003. Biopolymers 71:534-551).

50 Vasodilatación sobre anillos de aorta contraídos previamente. Se prepararon anillos arteriales para experimentos de baño de órganos, como se describió anteriormente (Kluskens LD, et al. 2009. J Pharmacol Exp Ther 328:849-54). Antes de probar los efectos de vasodilatación de los péptidos, se contrajeron previamente los anillos hasta el 50% de su máximo nivel de contracción con fenilefrina 30 nM (PE). Los péptidos KDRV[AIHA]_c o YDRV[AIHA]_c con puente de tioéter 5,8 fueron añadidos de manera acumulativa en un intervalo de 0.1 nM a 1 μM. Los datos de vasodilatación están representados como porcentaje de relajación de contracción PE 30 nM.

55 Resultados. La Fig 1 demuestra la capacidad de KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) para inducir la vasodilatación de anillos de aorta de ratas de Sprague Dawley contraídos previamente. Ambos péptidos tenían ya a concentración sub-nM, significativa capacidad de vasodilatación.

60 Conclusión. Estos datos demuestran que KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) son péptidos vasodilatadores muy potentes.

Ejemplo 2. Análogos de cAng-(1-7) extendidos en N requieren el anillo tioéter 4,7 para acción agonística vía el receptor AT2.

65 Introducción. Este ejemplo muestra la capacidad de cAng-(1-7) con puente de tioéter, si tiene extensión con un aminoácido terminal en N, para estimular la fosforilación de quinasa regulada por señal extracelular (ERK) en células

epiteliales bronquiales humanas (HBE). La especificidad de los péptidos con puente de tioéter anteriores por el receptor AT2 es establecida midiendo si la fosforilación de ERK inducida por péptido podría ser inhibida o no por PD123319, un antagonista bien conocido del receptor AT2. Adicionalmente, se demuestra que se requiere el anillo de tioéter en los análogos extendidos con terminación en N para la acción agonística acción vía el receptor AT2.

5

Materiales y métodos.

Se compraron péptidos de JPT: DDRVAIHA, dKDRVdCIHC, KDRVdCIHC, DDRVdCIHC, IDRVdCIHC, NDRVdCIHC, SDRVdCIHC lineales, en los cuales dK representa D-lisina y dC representa D-cisteína. El antagonista de receptor AT2 PD123319 era de Axon Medchem. Se ejecutaron estudios usando la línea de célula epitelial bronquial humana inmortal HBE (Cozens AL, et al. 1994 CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 10:38-47). Todos los medios de cultivo y suplementos, placas multipozos y frascos eran de PAA.

15 Cultivo celular. Las placas multipozo recibieron 1 ml de una solución de recubrimiento (para 112 ml: 100 ml de medio F12; 10 ml de albúmina de suero bovino (1 mg/ml); colágeno I, bovino 1 ml (3 mg/ml); fibronectina humana 1 ml (1 mg/ml)) y se incubaron por 6 horas a 37°C y 5% de CO₂. A continuación se descartó la solución de recubrimiento y se secaron las placas por 2 horas en la cabina de flujo laminar. En cada placa de 12 pozos se inoculó 8x10⁴ células de HBE por pozo, seguido de incubación por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se preparó medio de cultivo celular añadiendo 432.2 ml de medio básico MEM 199 a 50 ml (15%) de FCS y 5 ml de L-glutamina (200 mM), 10 ml de penicilina/estreptomicina (10.000 unidades/ml / 10 mg/ml) y 2.8 ml de gentamicina (10 mg/ml). A una confluencia de 85-90% se reemplazó el medio por medio sin FCS y factores de crecimiento seguido por otra incubación durante 24 a 37°C y 5% de CO₂.

25 Fosforilación de Erk1 y Erk2. Se retiró el medio de cada pozo y se lavó una vez con amortiguador de HBS sin calcio y magnesio. Se probó la capacidad del péptido a 10⁻⁶ M después de incubación previa por 20 min con 10⁻⁶ M de PD123319 o controles concomitantes, seguido de lavado. Se ejecutaron controles de desafío y concomitantes a 1 ml/pozo durante 10 min. Todas las muestras fueron probadas en triplicado. Después del desafío se añadieron a cada pozo 150 µl de amortiguador de RIPA (RIPA, TBS, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, azida de sodio 0.004%, PMSF 1% (concentración final 2 mM), ortovanadato de sodio 1% (concentración final 1 mM) y cóctel inhibidor de proteasa 1%). Se incubaron las placas por 15 minutos a 4°C. Se rascaron de la superficie las células sometidas a lisis. El producto de lisis fue transferido a tazas eppendorf de 1.5 ml y sometido a centrifugación por 5 minutos a 12.700 x g hasta formar pellas con los residuos celulares. Se transfirió el sobrenadante a nuevas tazas y de una muestra de 5 µl se determinó el contenido total de proteína mediante el ensayo de acuerdo con lowry (Bio-Rad), usando BSA como proteína de calibración. Se separó la proteína sobre gel y se realizó prueba de mancha con anticuerpo monoclonal IgG2a p-ERK de ratón y anticuerpo anti-rata IgG1 GAPDH de ratón y como un segundo anticuerpo, IgG-AP anti-ratón de cabra. Las proteínas Erk fosforiladas y GAPDH fueron teñidas con BCIP/NBT y cuantificadas respecto a GAPDH y Erk total usando el software TotalLab. De manera alternativa, se midió fosforilación Erk total después de permeabilización de las células no desprendidas.

40 Resultados. La Figura 2AB muestra que los análogos de cAng-(1-7) que tiene extensión con un aminoácido en el extremo N estimulan la fosforilación de ERK1 y en una menor extensión la de ERK2. La fosforilación de ERK1 y ERK2 pudieron ser inhibidas por el antagonista de AT2 PD123319. La extensión en la cual el antagonista de AT2 PD123319 pudo inhibir la fosforilación de ERK inducida por péptido dependió del aminoácido en la posición "-1" extendida en el extremo N. la inhibición de la fosforilación de ERK por PD123319 fue completa en los casos de Asp, Lys y Ile en la posición extendida. Cuando estuvieron presentes Asn o Ser en la posición extendida, la inhibición de la fosforilación de ERK1 fue menor y la inhibición de fosforilación de ERK2 fue también inferior o ausente. La Figura 2C demuestra que el péptido DDRVAIHA lineal indujo fosforilación de Erk, pero la fosforilación inducida de Erk por este péptido lineal no pudo ser inhibida por PD123319. Por otro lado, la fosforilación de Erk inducida por dKcAng-(1-7) con fuente de tioéter pudo ser inhibida por PD123319.

55 Conclusiones. Estos datos prueban claramente que cAng-(1-7) con una extensión terminal en N de aminoácido individual estimula la fosforilación de ERK vía el receptor AT2. La interacción con el receptor AT2 del cAng-(1-7) extendido en el extremo N depende del aminoácido de la posición "-1" en el extremo N. En esta posición "-1" en el extremo N, marcada en otra parte como Xaa¹, un aminoácido con carga positiva o negativa o un aminoácido hidrófobo condujo a elevada especificidad de receptor AT2; un péptido extendido con un aminoácido hidrofílico sin carga neta, tal como Ser y Asn no tuvo interacción o la tuvo difícilmente con el receptor AT2. El anillo de tioéter es necesario para la acción de los péptidos cAng-(1-7) extendidos en N, vía el receptor AT2, dado que el antagonista de AT2 PD123319 no pudo inhibir la fosforilación de Erk inducida por un análogo de Ang-(1-7) lineal extendido en N.

60 Ejemplo 3. El estímulo del receptor AT2 no es ejercido por análogos de cAng-(1-7) con extensión de dos aminoácidos en el extremo N.

65 Introducción. En este ejemplo se investiga si análogos de cAng-(1-7) con una extensión de dos aminoácidos en el extremo N estimulan o no el receptor AT2. Como en el ejemplo 2, se midió la fosforilación de ERK inducida por péptido en células HBE y la dependencia de esta fosforilación sobre el antagonista AT2 PD123319.

Materiales y métodos.

La síntesis de péptido con puente de tioéter y el cultivo celular y mediciones de fosforilación de Erk1 y total Erk fueron esencialmente como en el ejemplo 2.

5 Resultados. La Figura 3A muestra que tanto el análogo de IcAng-(1-7) como DcAng-(1-7) con puente de tioéter indujeron fosforilación de Erk1, la cual es inhibida por el tratamiento previo con PD123319. Sin embargo, en el caso de una extensión con dos aminoácidos como en IDcAng-(1-7) - y en el caso de la fosforilación de Erk inducida por IDDRVAIHA lineal, no se obtuvo en absoluto inhibición por tratamiento previo con el antagonista AT2 PD123319 (Figura 3B).

10 Conclusiones. El ejemplo 2 había demostrado ya que se requería un anillo para el estímulo del receptor AT2 de Ang-(1-7) con extensión en N. De modo consistente, también la extensión con dos aminoácidos de una variante lineal no estimuló el receptor AT2. Puesto que el cAng-(1-7) no lineal extendido en el extremo en N con dos aminoácidos tampoco estimuló el receptor AT2, se concluye que la extensión de cAng-(1-7) con un aminoácido en el extremo en N, es la extensión terminal en N límite para el agonista de receptor AT2s.

Ejemplo 4. Análogos de cAng-(1-7) extendidos en N no actúan vía el receptor Mas.

20 Introducción. En este ejemplo se demuestra que el D-Pro7-Ang-(1-7) antagonista de receptor de Mas no puede inhibir la vasodilatación inducida por KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) en anillos de aorta contraídos previamente de ratas Sprague Dawley.

Materiales y métodos.

25 D-Pro7-ang-(1-7), ang-(1-7) con un isómero D de prolina en la posición 7, que es un antagonista de receptor de Mas, eran de JPT y se purificaron por HPLC antes del uso. El antagonista fue usado como en Kluskens et al 2009: 10 min antes de la adición de PE 30 nM a una concentración de 0.1 µM. Otros materiales y métodos fueron como en el ejemplo 1. Resultados. La Fig 4 demuestra que el D-Pro7 antagonista de receptor de Mas no inhibe la vasodilatación inducida por KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) en anillos de aorta contraídos previamente de ratas Sprague Dawley.

30 Conclusión. KcAng-(1-7) y YcAng-(1-7) no actúan vía receptor de Mas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto cíclico de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos Xaa¹- Asp-Arg- Ile/Val- Xaa⁵- Ile/Val- His- Xaa⁸ que comprende un enlace de puente de tioéter entre las cadenas laterales de Xaa⁵ y Xaa⁸ tal que Xaa⁵ y Xaa⁸ forman juntos una estructurada acuerdo con una de la fórmula general:

A



B



C



en las que R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son seleccionados independientemente de -H, un grupo alquilo o aralquilo C₁-C₁₀, preferiblemente en las que R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son seleccionados independientemente de H y CH₃, y en las que Xaa¹ es seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos cargados, aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos y variantes de los mismos resistentes a proteasa, o una sal de ellos farmacéuticamente aceptable.

2. Compuesto de péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Xaa¹ es seleccionado del grupo que consiste en un estereoisómero D de aminoácidos cargados, aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos.

3. Compuesto de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que Xaa¹ es un aminoácido con carga positiva, preferiblemente en el que Xaa¹ es Lys o Arg.

4. Compuesto de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que Xaa¹ es un aminoácido con carga negativa, preferiblemente en el que Xaa¹ es Asp, Glu o piroGlu.

5. Compuesto de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que Xaa¹ es un aminoácido hidrófobo, preferiblemente en el que Xaa¹ es Ile, Leu o Val.

6. Compuesto de péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que Xaa¹ es un aminoácido aromático, preferiblemente en el que Xaa¹ es Tyr o Phe.

7. Compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Xaa⁵ es un estereoisómero D.

8. Compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Xaa⁸ es un estereoisómero L.

9. Compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Xaa⁵ es un estereoisómero D y Xaa⁸ es un estereoisómero L.

10. Compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo consistente en:

Lys-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (K-cAng(1-7))
Asp-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (D-cAng(1-7))

Tyr-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (Y-cAng(1-7))
Ile-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (I-cAng(1-7))
Asn-Asp-Arg-Val-Abu/Ala-Ile-His-Abu/Ala (N-cAng(1-7))

- 5 bajo la condición de que el péptido no contenga dos residuos Abu (ácido 2-aminobutírico).
11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 12. Uso *in vitro* de un compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como agonista de receptor tipo 2 de Angiotensina II (AT₂).
13. Un compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la cual se requiere y/o se desea agonismo selectivo del receptor
- 15 AT2.
14. Compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en el tratamiento y/o prevención de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha condición es diabetes (tipo II), enfermedad cardiovascular, hipertensión, falla cardíaca, infección, alopecia, anemia, citopenia, enfermedad neural, inflamación, fibrosis, cáncer, síndrome de distensión respiratoria aguda o curación de heridas.
- 20 15. Un producto de combinación que comprende como entidades separadas (A) un compuesto de péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y (B) un compuesto seleccionado de antagonistas de receptor AT1 e inhibidores de ACE, y/o (C) un compuesto seleccionado de agonistas de receptor de Mas y ACE2, en el que cada uno de los componentes (A), (B) y/o (C) es formulado en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25

Figura 1

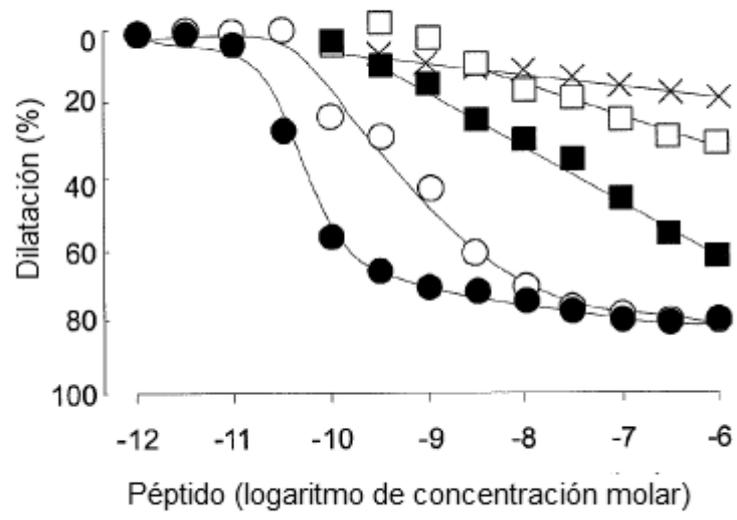


Figura 2

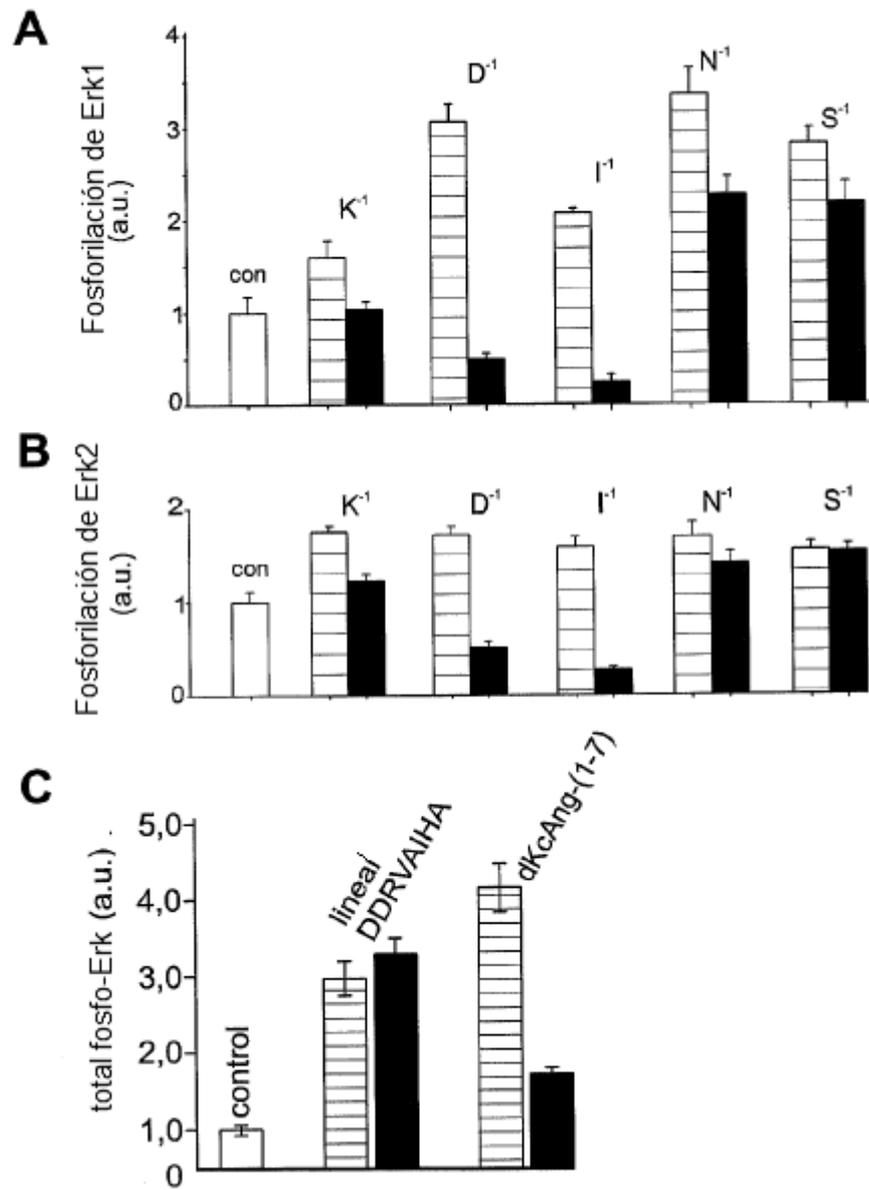


Figura 3

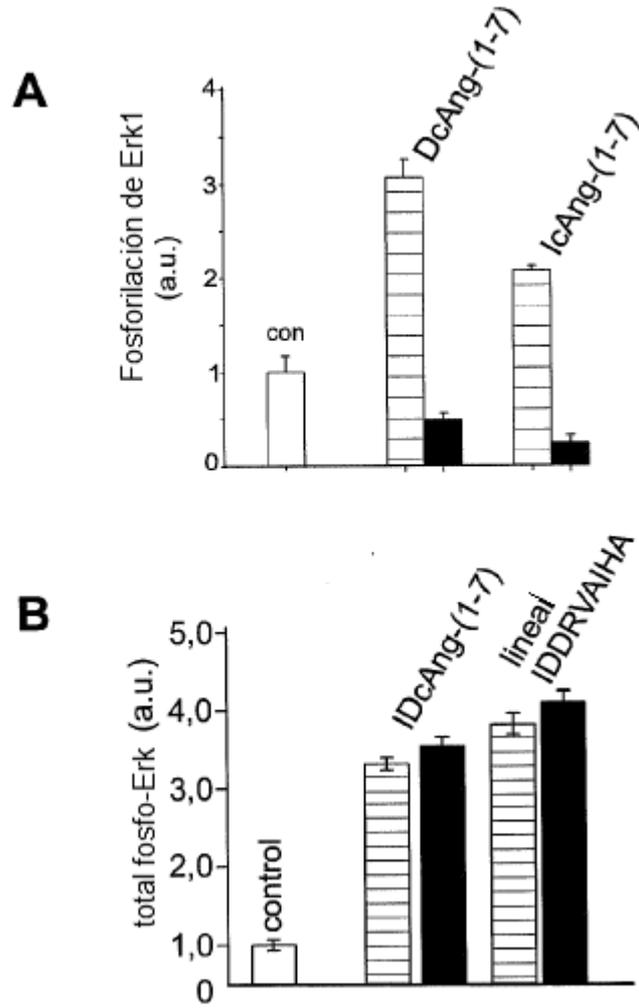


Figura 4

