

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 451**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 14/665 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2010 PCT/US2010/047108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11026015**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2010 E 10812701 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2473518**

54 Título: **Ligandos de melanocortina estabilizados**

30 Prioridad:

31.08.2009 US 238625 P

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

14.07.2017

73 Titular/es:

**TENSIVE CONTROLS, INC. (100.0%)
1601 S. Providence Road
Columbia, MO 65211-0001, US**

72 Inventor/es:

GRUBER, KENNETH A.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 624 451 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

LIGANDOS DE MELANOCORTINA ESTABILIZADOS

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente descripción se refiere a ligandos de melanocortina que tienen una extensión C-terminal resistente a degradación para minimizar o suprimir efectos cardiovasculares para uso en el tratamiento de diversas condiciones patológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Descripción de Técnica Relacionada

10 **[0002]** La siguiente discusión se refiere a una serie de publicaciones por autor(es) y año de publicación. La discusión de tales publicaciones aquí se da para presentar antecedentes más completos y no se debe interpretar como una admisión de que tales publicaciones sean "estado de la técnica".

15 **[0003]** Las melanocortinas son un grupo de péptidos pequeños que se unen a una familia de cinco receptores de melanocortina conocidos (MC1R hasta MC5R) (Cone, R.D., 2006, *Endocr. Rev.*, 27(7):736-749). Se derivan de una proteína precursora común, pro-opiomelanocortina (POMC), la cual se expresa en las neuronas del sistema nervioso central y periférico, y en la glándula pituitaria (Voisey, J et al., 2003, *Curr. Drug Targets*, 4(7):586-597). La escisión proteolítica de POMC se traduce en α - β - y γ -melanocortina y hormona adrenocortical (ACTH), además de varios otros péptidos biológicamente relevantes.

20 **[0004]** De los cinco receptores de melanocortina conocidos, se cree que MC3R y MC4R se expresan predominantemente en el cerebro mamífero, siendo MC3R el mayormente expresado en el núcleo arqueado del hipotálamo, y siendo MC4R expresado en el tálamo, hipotálamo, e hipocampo. MC1R se expresa principalmente en la periferia donde se encuentra, por ejemplo, en células de melanoma y melanocitos y células inmunes. En el sistema neuronal, MC1R solamente está presente sobre neuronas en la materia gris periacueductal del cerebro medio, donde se cree que desempeña un papel en controlar dolor. MC2R se expresa predominantemente en la corteza suprarrenal, donde controla esteroidogénesis. MC5R se encuentra predominantemente en tejidos periféricos tales como los epitelio secretores de muchas glándulas exocrinas, donde afecta controles secretores y tróficos.

25 **[0005]** Inicialmente se pensaba que los péptidos de melanocortina tienen una función fisiológica dirigida principalmente al control de pigmentación de la piel. Sin embargo, en los últimos 25 años, muchas actividades biológicas adicionales se han atribuido a las melanocortinas. Péptidos de melanocortina que bien son agonistas (activadores) o bien antagonistas (inhibidores), se han mostrado que controlan muchos procesos fisiológicos, incluyendo pigmentación, alimentación, tasa metabólica/homeostasis de energía total, secreción de glándulas endocrinas y exocrinas, inflamación, excreción de sodio por el riñón, sensación de dolor, comportamiento adictivo, y deseo sexual.

30 **[0006]** Por lo tanto, se han sintetizado análogos de melanocortina para la regulación y tratamiento potenciales de muchas afecciones, incluyendo la regulación del peso (por ejemplo, obesidad, anorexia, y caquexia), secreción hormonal, e hiposecreción de muchas glándulas exocrinas (por ejemplo, síndrome de Sjogren), afecciones inmuno-relevantes, y disfunción sexual (Cone, R.D., 2006, *Endocr. Rev.*, 27(7):736-749; Cone, R.D., 2005, *Nat. Neurosci.*, 8(5):571-578; Bazzani, C., et al., 2002, *Resuscitation*, 52(1):109-115; y Bertonlini, A., et al., 2009, *Pharmacol. Res.*, 59(1):13-47). Sin embargo, en la regulación de estos efectos fisiológicos, los análogos de melanocortina también se ha mostrado que causan hipertensión (Gruber, et al., 1984, *Hypertension*, 6:468-474 y Klein, et al., 1985, *Life Sci.* 36:769-775). Estudios experimentales han mostrado que la administración de análogos de melanocortina (ligandos) incrementa la presión arterial y la frecuencia cardíaca, y puede producir arritmias cardíacas (Gruber and Callahan, 1989, *Am. J. Physiol.* 257:R681-R694; y datos no publicados).

35 **[0007]** Los efectos reguladores fisiológicos de un péptido de melanocortina se logran mediante el farmacóforo de melanocortina: (His-Phe-Arg-Trp) (**SEQ ID NO: 1**); siendo este farmacóforo el conjunto mínimo de aminoácidos necesarios para la actividad regulada por melanocortina (Holder, J.R. and C. Haskel-Luevano, 2004, *Med. Res. Rev.*, 24(3):325-356). En general, todos los péptidos de melanocortina comparten la misma secuencia principal activa: His-Phe-Arg-Trp (**SEQ ID NO: 1**), incluyendo neuropéptidos de melanotropina y adrenocorticotropina. Se cree que los aminoácidos que rodean esta secuencia principal en péptidos de melanocortina que se dan de forma natural afectan a la afinidad relativa de un receptor de melanocortina específico.

40 **[0008]** Se han sintetizado diversos análogos de melanocortina que no se dan de forma natural que tienen afinidad mejorada por los receptores de melanocortina. Por ejemplo, Klemes et al. 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(2):722-728 sintetizaron los análogos de melanocortina (Ac-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp) y (Ac-Nle-Asp-His-Phe-Arg Trp) (**SEQ ID NO: 2**). Estos análogos modificados muestran una potencia incrementada para actividad melanotrópica.

Se han identificado varios análogos más de melanocortina. Más ejemplos de análogos de melanocortina que se han sintetizado, que tienen potencia incrementada, incluyen (Ac-Nle-ciclo-Asp-His-Phe-Arg-Trp-Lys) y (Ac-Nle-ciclo-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys) (al-Obeidi et al., 1989, *J. Med. Chem.*, 32(12):2555-2561); (Ac-Nle-ciclo-Asp-His-D-Nal 2'-Arg-Trp-Lys) y (Ac-ciclo-Cys-Glu-His-D-Nal 2'-Arg-Trp-Gly-Cys-Pro-Pro-Lys-Asp) (Balse-Srinivasan et al., 2003, *J. Med. Chem.*, 46(17):3728-3733); (Ac-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-D-Trp-Gly) (al-Obeidi et al., 1989, *Pept. Res.*, 2(1):140-146); y (His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val) (**SEQ ID NO: 3**), (Masman et al., 2008, *Bioorg. Med. Chem.*, 16(8):4347-58).

[0009] Sin embargo, debido a sus potentes efectos secundarios cardiovasculares (Greenfield et al., 2009, *N. Eng. J. Med.* 360:44-52; Gupta, 2007, *Reuters* Aug. 30, 2007; Mishra, 2007, *Reuters* Sept. 10, 2007; Nordheim et al., 2006, *Peptides* 27:438-443), los análogos de melanocortina sintetizados hasta la fecha aún no han resultado en un fármaco terapéutico aprobado por una agencia reguladora gubernamental para tratar cualquiera de las numerosas afecciones relacionadas con melanocortina. Los efectos cardiovasculares clínicamente inaceptables de análogos de melanocortina son mediados por un segundo farmacóforo (Arg-Trp), localizado dentro del primer farmacóforo. (Klein et al., 1985, *Life Sci.*, 36:769-775; Gruber and Callahan, 1989, *Am. J. Physiol.*, 257:R681-694). Se cree que este segundo farmacóforo interactúa con un subconjunto de la familia de receptores RFamida, resultando en la elevación del impulso simpático central y la iniciación de efectos cardiovasculares. El patrón generalizado de una secuencia de dipéptido Arg-aromático en o cerca del extremo C-terminal de muchos ligandos de melanocortina sintéticos es una descripción más inclusiva del farmacóforo de la clase RFamida (Gruber and Callahan, *Am. J. Physiol.*, 1989, 257:R681-694; Klein et al., 1985, *Life Sci.* 36:769-775; Clements et al., 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284:1189-1193).

[0010] A pesar de que durante mucho tiempo se ha creído que los efectos cardiovasculares de la melanocortina no se pueden separar de los efectos no hipertensivos, y potencialmente terapéuticos, Gruber y Callahan mostraron que esto es incorrecto. (Gruber and Callahan 1989, *Am. J. Physiol.*, 257:R681-694). La extensión peptídica C-terminal de un análogo de melanocortina puede minimizar actividad cardiovascular *aguda*, mientras preserva los efectos de melanocortina. Efectivamente, los aminoácidos C-terminales adicionales temporalmente "ocultan" el farmacóforo cardiovascular/similar a RFamida (Arg-Trp), moviéndolo más profundamente dentro de la estructura molecular del péptido. Esta suprime fuertemente los efectos cardiovasculares sin afectar la actividad de melanocortina.

[0011] No obstante, muchas de las extensiones C-terminales en análogos de melanocortina que han mostrado actividad cardiovascular minimizada en ensayos *in vitro* se ha mostrado que se degradan *in vivo*. Análogos de melanocortina que tienen extensiones C-terminales pueden inicialmente conferir solamente los efectos deseados, pero una vez que se produce degradación, el farmacóforo RFamida (Arg-Trp) es desenmascarado, confiriendo los efectos cardiovasculares asociados.

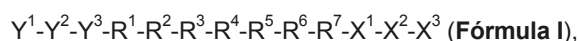
Bednarek *et al.* (2001), *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (22): 3665-3672 se refiere a antagonistas peptídicos de alta afinidad, selectivos, de la acción de α -melanotropina en el receptor humano 4 de melanocortina (síntesis y evaluación biológica *in-vitro*).

Giuliani *et al.* (2007), *British Journal of Pharmacology* 150 (5): 595-603 reporta que agonistas selectivos del receptor de melanocortina MC4 revierten choques hemorrágicos y previenen daño multiorgánico.

US 2005/038230 se refiere a péptidos lineales y cíclicos que son específicos para receptores de melanocortina y exhiben actividad agonista, antagonista, o agonista-antagonista mixta.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente solicitud se define en las reivindicaciones. En conformidad, la invención proporciona un ligando de melanocortina que no se da de forma natural el cual comprende un análogo de melanocortina acoplado a una extensión C-terminal resistente a degradación y una extensión N-terminal, donde el ligando de melanocortina que no se da de forma natural comprende la Fórmula I:



donde el análogo de melanocortina comprende R^1 a R^7 , donde:

R^1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, norleucina, norleucina acetilada, cisteína acetilada, D-fenilalanina, D-fenilalanina acetilada, ácido succínico, ácido *o*-ftálico, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, CO-cis-CH=CH-CO, un grupo *n*-pentanoilo, y un grupo *n*-hexanoilo;

R^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, cisteína, norleucina, arginina, ácido succínico, ácido glutámico, CO-cis-CH=CH-CO, un grupo *n*-pentanoilo, y un grupo *n*-hexanoilo;

R³ se selecciona del grupo que consiste en histidina, histidina metilada en posiciones 1 o 3, D-prolina, L-prolina, D-Nal(2'), L-Nal(2'), ácido succínico, tButGly, Hyp(Bzl), Mamb, Oic, norleucina, Aba, β-alanina, y Tic;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en histidina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, D-Nal(2'), pCl-D-Phe, y (o-Phe)Phe;

5 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en arginina, homoarginina, ornitina, alanina, prolina, Pip, Nip, Tic, Phg, Sar, y Azt;

R⁶ se selecciona de D-triptófano, L-triptófano, D-Nal(2'), L-Nal(2'), Tic, y Bip;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en cisteína, lisina, y ácido 2,3-diamino-propiónico;

donde si R³ es Aba, entonces R⁴ se selecciona del grupo que consiste en D-Phe, D-Nal(2'), y pCl-D-Phe; y

10 donde si R² es un grupo *n*-pentanoílo o un grupo *n*-hexanoílo, entonces R¹, Y¹, Y², e Y³ están ausentes;

donde la extensión N-terminal comprende Y¹ a Y³:

Y¹ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, y L-prolina;

Y² está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

15 Y³ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

donde la extensión C-terminal resistente a degradación comprende X¹ a X³ y

X¹ es D-treonina;

X² es D-prolina;

20 X³ es D-treonina

donde el ligando melanocortina está ciclado, y

cuando R² es cisteína y R⁷ es cisteína se forma un enlace disulfuro entre R² y R⁷;

cuando R² es ácido glutámico o ácido aspártico y R⁷ es lisina se forma un puente lactámico de cadena lateral entre R² y R⁷; y

25 cuando R² o R³ es ácido succínico y R⁷ es ácido 2,3-diamino-propiónico se forma un cierre lactámico entre R² o R³ y R⁷.

Otros aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones.

30 **[0012]** Dado que fármacos de melanocortina potencialmente se utilizarían para tratar afecciones crónicas, no deben producir efectos secundarios potencialmente peligrosos durante administración prolongada. Por lo tanto, la supresión de efectos cardiovasculares del ligando de melanocortina, durante la administración crónica, es importante para un fármaco de melanocortina clínicamente seguro. Esto requiere la separación prolongada *in vivo* de las acciones cardiovasculares RFamida del farmacóforo de melanocortina de sus efectos terapéuticos de melanocortina. Esto permitiría que análogos de melanocortina fueran utilizados como tratamientos para una variedad de afecciones patológicas, con riesgo mínimo de patología cardiovascular.

35 Por lo tanto, un ligando de melanocortina que no se da de forma natural como definido en las reivindicaciones comprende entre otras cosas un análogo de melanocortina acoplado a una extensión C-terminal resistente a degradación, produciendo de manera efectiva una separación crónica de melanocortina y de actividad cardiovascular RFamida.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0015] Se describe aquí una composición que comprende un ligando de melanocortina que no se da de forma natural acoplado con una extensión C-terminal resistente a degradación para suprimir exposición y efecto de la RFamida/farmacóforo cardiovascular, y una extensión N-terminal para prevenir la degradación enzimática N-a-C-terminal (es decir, de izquierda a derecha) del farmacóforo de melanocortina. Una extensión C-terminal resistente a

degradación como descrita aquí es al menos un aminoácido, al menos un aminoácido modificado, un péptido mimético (molécula pequeña no aminoacídica), o combinaciones de los mismos. Una extensión C-terminal resistente a degradación es una seleccionada para resistir degradación en condiciones fisiológicas, permitiendo así que el análogo de melanocortina mantenga al menos un efecto regulatorio fisiológico de melanocortina mientras exhibe efectos cardiovasculares minimizados o suprimidos, cuando se administra de manera aguda o crónica a un ser humano o mamífero.

Terminología

[0016] *Análogo de melanocortina* se refiere a al menos un farmacóforo de melanocortina. Análogos de melanocortina son moléculas que enlazan receptores de melanocortina en condiciones fisiológicas. Análogos de melanocortina incluyen polipéptidos de melanocortina que no se dan de forma natural y versiones truncadas y/o modificadas de una proteína o polipéptido de melanocortina de longitud completa. Por ejemplo, la proteína POMC de longitud completa, antes de la escisión proteolítica de "sub-péptidos", consiste en 241 aminoácidos. Escisión proteolítica de POMC específica por tejidos produce péptidos que varían en tamaño desde 13 aminoácidos hasta 76 aminoácidos (Bicknell and Lawry, 2000, *Encyclopedia of Stress*, vol. 3, 257-265, Academic Press). Análogos de melanocortina sintetizados, que no se dan de forma natural, los cuales tienen actividad receptora de melanocortina incrementada, como se trata aquí, tiene un tamaño de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos. Análogos de melanocortina exhiben funcionalidad de unión a receptores de melanocortina. Esta unión es o bien activante (agonista) o inhibidora (antagonista). Adicionalmente a péptidos, los análogos de melanocortina incluyen análogos de melanocortina de molécula pequeña o una parte de los mismos, compuestos por compuestos orgánicos o inorgánicos o una combinación de péptido y molécula pequeña - eso es, péptido miméticos.

[0017] Los análogos de melanocortina pueden ser estructuralmente similares y/o funcionalmente similares a las proteínas de melanocortina en su capacidad para unirse a receptores de melanocortina. Además, los análogos de melanocortina generalmente contienen el farmacóforo: His-Phe-Arg-Trp (**SEQ ID NO:1**) o una versión modificada del mismo, o un péptido mimético estructural o funcional del mismo.

[0018] *Péptido mimético* es una molécula no aminoacídica que mimetiza un péptido (una cadena de aminoácidos) o un residuo aminoacídico.

[0019] *Farmacóforo* es el mínimo conjunto de residuos aminoacídicos necesarios para lograr un efecto fisiológico; o una molécula pequeña que es (con respecto a un receptor) un mimético estructural de los residuos aminoacídicos requeridos para la unión a y activación de un receptor. His-Phe-Arg-Trp (**SEQ ID NO: 1**) y sus análogos son el farmacóforo de melanocortina para el efecto fisiológico regulado. Por lo tanto, análogos del farmacóforo de melanocortina que no se dan de forma natural pueden ser pequeños péptidos o moléculas orgánicas diseñados para mimetizar el aspecto o función (incluyendo activación o desactivación de la actividad receptora) del péptido de secuencia principal del farmacóforo de melanocortina.

[0020] *Efectos cardiovasculares* incluyen la definición médica de hipertensión, concretamente la de la presión arterial alta (al menos por encima de 120/80 mm Hg, y especialmente si es superior a 140/90 mm Hg (sistólica/diastólica), efectos patológicos sobre la vasculatura, riñón y corazón, y otros efectos asociados. Por el contrario, hipotensión es cuando la presión arterial desciende por debajo de los estándares médicamente aceptados. Arritmias cardíacas implican una alteración en el aspecto simétrico normal de la onda de presión pulsátil de la presión arterial. Esto puede ser latidos por minuto incrementados (taquicardia) o latidos por minuto reducidos (bradicardia). También puede implicar una alteración en el patrón de onda normal del electrocardiograma.

[0021] *Degradación sustancial* se refiere a la degradación de la extensión C-terminal, la extensión N-terminal, u otras regiones del análogo de melanocortina del ligando de melanocortina de la presente invención, mediante enzimas fisiológicas y otros factores, de tal manera o en tal grado que el farmacóforo RFamida sea nuevamente capaz de iniciar un efecto cardiovascular a través del receptor RFamida u otros sistemas fisiológicos, comparables a los ligandos de melanocortina o análogos de melanocortina sin una extensión C-terminal. De acuerdo con un aspecto preferido de la presente divulgación, un análogo de melanocortina que tiene una extensión C-terminal que resiste degradación sustancial es uno en el cual no más del 50% del ligando administrado puede restablecer un efecto cardiovascular, preferiblemente no más del 25%, y más preferiblemente menos del 10%, en comparación con un análogo de melanocortina que carece de una extensión C-terminal.

[0022] Una *composición farmacéutica* incluye un ligando de esta divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser una formulación líquida, por ejemplo, una solución tamponada, isotónica, acuosa. Vehículos farmacéuticamente aceptables también pueden incluir excipientes, tales como diluyentes, vehículos y similares, y aditivos, tales como agentes estabilizantes, conservantes, agentes solubilizantes, tampones y similares.

[0023] Una sal *farmacéuticamente aceptable* se refiere a una sal preparada a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férrico, ferroso, litio, magnesio, mangánico, manganeso, potasio, sodio, zinc, y similares. Son particularmente preferidas sales de amonio, calcio, litio, magnesio, potasio, y sodio.

5 Sales derivadas de bases farmacéuticamente aceptables, orgánicas, no tóxicas, incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas que se dan de forma natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas poliamínicas, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y resinas de intercambio iónico básicas similares.

[0024] Cuando el compuesto de la presente invención es básico, se pueden preparar sales a partir de ácidos farmacéuticamente aceptables no tóxicos, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, malónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, propiónico, succínico, sulfúrico, tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, y ácidos similares. Son particularmente preferidos ácido cítrico, fumárico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico, y tartárico.

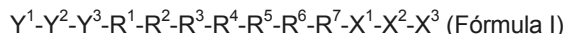
[0025] Se entenderá que, como se usa aquí, las referencias a los compuestos de Fórmula I y Fórmula II pretenden incluir también las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos, tales como sales de hidrocloreuro, etc.

[0026] *Abreviaturas* en la lista de compuestos tienen su significado convencional. Por lo tanto, "Nle" es norleucina; "Nal" es noralanina; "D-Nal" es D-noralanina; "Asp" es ácido aspártico; "His" es histidina; "D-Phe" es D-fenilalanina; "Arg" es arginina; "Trp" es triptófano; "Lys" es lisina; "Gly" es glicina; "Pro" es prolina; "Tyr" es tirosina; "Ser" es serina; "Cys" es cisteína; "Val" es valina; "D/L-Thr" es cualquiera de D-treonina o L-treonina; "D/L-Pro" es cualquiera de D-prolina o L-prolina. Adicionalmente, "Ac" es N-acetilo y "ciclo" se refiere a una estructura cíclica, que también se muestra en la literatura como "c" o se refiere como una "lactama".

[0027] Abreviaturas adicionales se definen como sigue: Nal(2')=D-2'-naftilalanina; tBu=tert-butilo; Hyp(Bzl)=bencil-L-hidroxi-prolina; Mamb=ácido 3-aminometil-benzoico; conector de ácido glutámico=CO-(CH₂)₃-CO; Pen=L-Penicilamina; Aib=Ácido 2-aminoisobutírico; Tic=Ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico; Aba=4-amino-1,2,4,5-tetra-hidro-2-benzazepin-3-ona; Pip=ácido piperidin-2-carboxílico; Nip=ácido piperidin-3-carboxílico; Tic=ácido tetrahydroquinolin-3-carboxílico; Bip=bifenilalanina; Phg=α-Fenil-glicina; Sar=Sarcosina; Azt=3'-azido-3'-desoxitimidina; Oic=Ácido octohidroindol-2-carboxílico.

Ánálogo de Melanocortina

[0028] Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural se puede representar mediante la Fórmula I como se muestra, y comprende un análogo de melanocortina acoplado a una extensión C-terminal resistente a degradación y una extensión N-terminal opcional:



donde Y¹-Y²-Y³ representa residuos N-terminales estabilizantes opcionales o un mimético de residuo aminoacídico; R¹ a R⁷ representan residuos del análogo de melanocortina; y X¹-X²-X³ representa residuos C-terminales resistentes a degradación o un mimético de residuo aminoacídico.

En conjunto, R¹ a R⁷ (R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷) pueden ser uno de muchos análogos de melanocortina conocidos, donde cada uno de los siete residuos es independientemente un aminoácido o péptido mimético. Algunos análogos de melanocortina tienen menos de siete residuos. R¹ a R⁷, en conjunto, pueden representar análogos de melanocortina alfa; R¹ a R⁷, en conjunto, también pueden representar análogos de melanocortina que se unen a receptores MC3-MC5 como agonistas o antagonistas.

[0029] Un ligando de melanocortina se puede representar mediante la Fórmula I anterior, y residuos R¹ a R⁷, en conjunto, representan el análogo de melanocortina, donde

R¹ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, norleucina, norleucina acetilada, cisteína acetilada, D-fenilalanina, D-fenilalanina metilada, ácido succínico, ácido o-ftálico, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, CO-*cis*-CH=CH-CO, un grupo *n*-pentanoilo, y un grupo *n*-hexanoilo;

R² está ausente o se selecciona del grupo que consiste en prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, cisteína, norleucina, arginina, ácido succínico, ácido glutámico, CO-cis-CH=CH-CO, un grupo n-pentanoílo, y un grupo n-hexanoílo;

5 R³ se selecciona del grupo que consiste en histidina, histidina metilada en posiciones 1 o 3, D-prolina, L-prolina, D-Nal(2'), L-Nal(2'), ácido succínico, tButGly, Hyp(Bzl), Mamb, Oic, norleucina, Aba, β-alanina, y Tic;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en histidina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, D-Nal(2'), pCl-D-Phe, y (o-Phe)Phe;

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en arginina, homoarginina, ornitina, alanina, prolina, Pip, Nip, Tic, Phg, Sar, y Azt;

R⁶ se selecciona de D-triptófano, L-triptófano, D-Nal(2'), L-Nal(2'), Tic, y Bip;

10 R⁷ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en glicina, ácido glutámico, cisteína, lisina, y ácido 2,3-diaminopropiónico;

donde, si R³ es Aba, entonces R⁴ se selecciona del grupo que consiste en D-Phe, D-Nal(2'), y pCl-D-Phe; y

donde si R² es un grupo n-pentanoílo o un grupo n-hexanoílo, entonces R¹, Y¹, Y², e Y³ están ausentes.

[0030] Un ligando de melanocortina también se puede representar mediante la Fórmula II:

15
$$Y^1-Y^2-Y^3-R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8-R^9-X^1-X^2-X^3 \quad (\text{Fórmula II}).$$

En conjunto, R¹ a R⁹ (R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷-R⁸-R⁹) pueden ser uno de muchos análogos de melanocortina conocidos, donde cada uno de los nueve residuos es un aminoácido o péptido mimético. Algunos análogos de melanocortina tienen menos de nueve residuos. R¹ a R⁹, en conjunto, pueden representar análogos de melanocortina gamma. R¹ a R⁹, en conjunto, también pueden representar análogos de melanocortina que se unen a receptores MC3 como antagonistas.

20 **[0032]** Un ligando de melanocortina se puede representar mediante la Fórmula II anterior, y residuos R¹ a R⁹, en conjunto, representan el análogo de melanocortina, donde:

R¹ es tirosina;

R² es valina;

R³ se selecciona del grupo que consiste en metionina, norleucina, cisteína, y L-penicilamina;

25 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en glicina, D-cisteína, L-cisteína, ácido aspártico, y norleucina;

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en histidina, norleucina, prolina, y Aib;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, D-Nal(2'), y L-Nal(2');

R⁷ es arginina,

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en triptófano y D-Nal(2'); y

30 R⁹ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico, cisteína, penicilamina, y lisina.

[0033] También se puede representar un ligando de melanocortina mediante la Fórmula I o la Fórmula II, donde al menos un residuo de D-fenilalanina, o todos los residuos de D-fenilalanina, están halogenados (por ejemplo, flúor o cloro) para conferir una interacción mejorada proteína de melanocortina-ligando con su(s) correspondiente(s) receptor(es) MC (Ippolito, J.A and D.W. Christianson, 1992, *Int. J. Biol. Macromol*, 14(4):193-197.)

35

Extensión C-terminal

[0034] Una extensión C-terminal pretende conferir al análogo de melanocortina R¹ a R⁷ de Fórmula I, o al análogo de melanocortina R¹ a R⁹ (R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷-R⁸-R⁹) de Fórmula II, resistencia a degradación de la extensión C-terminal para prevenir la exposición de la secuencia RFamida.

40 **[0035]** Una extensión C-terminal se puede representar mediante X¹-X²-X³ de la Fórmula I, donde

X¹ se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

X^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona; y

X^3 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, y un anillo de piperazin-2-ona;

[0036] Una extensión C-terminal también se puede representar mediante $X^1-X^2-X^3$ de la Fórmula II, donde

5 X^1 se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

X^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona; y

X^3 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, y un anillo de piperazin-2-ona.

10 **[0037]** Una extensión C-terminal puede tener una conformación que inhibe crónicamente la degradación por carboxi peptidasas. Ejemplos de una extensión C-terminal que crónicamente inhibe degradación incluyen los di- y tripéptidos D-Pro-D-Pro, D-Thr-D-Pro, D-Thr-D-Pro-D-Thr, como descrito en Tugyi et al., 2005, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 102 (2): 413-418.

15 **[0038]** Un mimético de prolina (anillo de piperazin-2-ona) se puede sustituir por D-Pro. En un enfoque, un mimético de prolina se sintetiza como descrito por Teixido, M., et al., 2007, *Brain Res. Bull.*, 73 (1-3):103-107. El anillo de piperazin-2-ona también se trata en Bhatt, U. y Just, G., 2000, *Helvetica Chimica Acta*, 83:722-727. Para la sustitución de prolina por un anillo de piperazin-2-ona, se incorpora un puente de etileno entre las moléculas de nitrógeno de dos grupos α -amino adyacentes. Esto produce un anillo de seis miembros, que contiene dos átomos de nitrógeno y cuatro de carbono, una estructura que es similar a un anillo de prolina (aunque de seis miembros) entre los dos grupos funcionales de residuos de aminoácido adyacentes.

20 **[0039]** De acuerdo con las enseñanzas aquí, la extensión C-terminal del análogo de melanocortina es resistente a degradación sustancial antes de que el ligando sea eliminado del torrente sanguíneo cuerpo humano o animal. Una extensión C-terminal puede ser de suficiente estabilidad de manera que el ligando de melanocortina no cause efectos cardiovasculares, o tenga efectos cardiovasculares minimizados cuando se administra a un ser humano o animal. Como la estabilidad de péptidos, aminoácidos, y moléculas pequeñas varía ampliamente, los ligandos de melanocortina pueden tener extensiones C-terminales de longitud variable en el entorno fisiológico extracelular. La extensión C-terminal es de suficiente estabilidad (por ejemplo, longitud, estructura estérica) de manera que cualquier degradación en el cuerpo antes de su eliminación del torrente sanguíneo no vuelva a exponer el farmacóforo cardiovascular para lograr su efecto.

30

Extensión N-terminal

[0040] Se puede acoplar una extensión N-terminal al análogo de melanocortina. La extensión N-terminal se representa como $Y^1-Y^2-Y^3$ en la Fórmula I, donde

Y^1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, y L-prolina;

35 Y^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona; e

Y^3 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona.

[0041] Una extensión N-terminal también se puede representar como $Y^1-Y^2-Y^3$ en la Fórmula II, donde

40 Y^1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, y L-prolina;

Y^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona; e

Y^3 está ausente o es uno seleccionado del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona.

45 Ciclación del Ligando de Melanocortina de Fórmula I

[0042] Análogos de melanocortina ciclados han demostrado una eficacia y estabilidad mejoradas (Balse-Srinivasan et al., 2003, *J. Med. Chem.*, 46(17):3728-3733 y Bednarek et al., 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645;

Kavarana, et al., 2002, *J. Med. Chem.*, 45(12):2644-2650). Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural, representado por la Fórmula I, puede estar ciclizado. Lo siguiente representa un listado no limitante de ejemplos de cómo se puede ciclar el ligando de melanocortina representado mediante la Fórmula I:

5 [0043] Un enlace disulfuro entre R^1 o R^2 y R^7 o X^1 cuando R^1 o R^2 es cisteína y R^7 o X^1 es cisteína, como descrito en Balse-Srinivasan et al., 2003, *J. Med. Chem.*, 46(23):4965-4973. Cuando X^1 es cisteína, X^2 no está ausente, pero se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona.

[0044] Un puente lactámico entre R^1 y R^7 cuando R^1 es norleucina y R^7 es ácido glutámico, como descrito en Mayorov et al., 2006, *J. Med. Chem.*, 49:1946-1952, y Bednarek et al., 2001, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645.

10 [0045] Un puente lactámico de cadena lateral entre R^2 y R^7 , cuando R^2 es ácido glutámico o ácido aspártico y R^7 es lisina, como descrito en Bednarek et al., 2001 *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645.

[0046] Un cierre lactámico entre R^1 y R^7 cuando R^1 es ácido succínico o ácido o-ftálico y R^7 es lisina, como descrito en Bednarek et al., 2001, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645 y Kavarana, et al., 2002, *J. Med. Chem.*, 45(12):2644-2650.

15 [0047] Un cierre lactámico entre R^2 o R^3 y R^7 cuando R^2 o R^3 es ácido succínico y R^7 es ácido 2,3-diamino-propiónico como descrito en Bednarek et al., 2001 *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645.

[0048] Un péptido ciclizado "columna vertebral" se forma mediante la formación de enlace covalente entre el terminal N y/o C de un péptido lineal de interés. Un ejemplo de esto se describe en el enlace de dos nitrógenos de amida mediante un puente que consiste en grupos alquilo y una amida, como descrito por Hess et al., 2007, *J. Med. Chem.*, 50: 6201-6211.

20 Aminoácidos - isómeros y aminoácidos no estándar

[0049] Los residuos de aminoácidos, como descrito aquí para ligandos de melanocortina que no se dan de forma natural, pueden ser cualquiera de D- o L-aminoácidos o pueden ser sustituidos por sus homólogos no estándar, isoméricos. Por ejemplo, aminoácidos alfa se pueden sustituir por beta aminoácidos, y L-aminoácidos se pueden sustituir por D-aminoácidos. Un aminoácido descrito aquí que no está designado como un isómero D- o L-, puede ser cualquiera de los isómeros. La invención, como mencionado, se define en las reivindicaciones.

Ciclación del Ligando de Melanocortina de Fórmula II

30 [0050] Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural, representado mediante la Fórmula II, puede estar ciclizado. El análogo de melanocortina representado mediante la Fórmula II se puede ciclar mediante una cadena lateral lactámica entre R^4 y R^9 cuando R^4 es ácido aspártico y R^9 es lisina, como descrito (Bednarek et al., 2001, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 286(3):641-645 y Mayorov et al., 2006, *J. Med. Chem.*, 49:1946-1952.

Ligandos de Melanocortina para Unión a Receptor MC

35 [0051] Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural puede ser un agonista del receptor MC4, un antagonista del receptor MC4, un agonista del receptor MC3, un antagonista del receptor MC3, y/o un agonista de MC5, del grupo de la hormona estimulante de melanocitos alfa (MSH).

[0052] Por ejemplo, un ligando de melanocortina que no se da de forma natural puede ser un antagonista de MC3 del grupo de la hormona estimulante de melanocitos gamma.

[0053] Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural también puede ser un agonista de MC3 del grupo de la hormona estimulante de melanocitos gamma.

40 Síntesis de Péptidos y Extensiones

[0054] En general, los ligandos de melanocortina descritos se sintetizan mediante síntesis en fase sólida, por ejemplo, y se purifican de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica. Una serie de procedimientos bien conocidos que utilizan una variedad de resinas y reactivos se utilizan para preparar los compuestos de esta invención. De manera similar, se sintetizan moléculas orgánicas de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica.

45 [0055] Ligandos de esta invención pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. Sales de adición ácida de los ligandos de esta invención se preparan en un disolvente adecuado a partir de la molécula y un exceso de un ácido, tal como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, maleico, succínico, o metanosulfónico. Cuando los ligandos incluyen una unidad ácida, sales farmacéuticamente aceptables adecuadas

pueden incluir sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o de potasio, o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio.

[0056] Se pueden preparar péptidos mediante metodología de fase sólida empleando la resina de alcohol p-benciloxibencilico para péptidos de C-terminal libre con síntesis manual. Todos los aminoácidos se acoplan como derivados de 9-fluoroenilmetoxicarbonilo (Fmoc), como descrito por Fields et al., 1992, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, New York, 77-183; y Fields and Noble, 1990, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35:161-214; Fields et al., 1991, *Peptide Res.* 4:95-101. En resumen, el grupo terc-butilo se aplica como un grupo protector para la metodología in situ de éster activo con 1-hidroxibenzotriazol/N,N'-diisopropylcarbodiimida en N, N-dimetilformamida (DMF). Los grupos Fmoc se eliminan mediante 20% de piperidina en DMF, o 2% de piperidina y 2% de diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno en DMF, respectivamente. El éxito del acoplamiento y desprotección se monitoriza mediante la prueba de ninhidrina y/o el ensayo de isatina. Después de completar la síntesis, los péptidos se escinden de la resina con ácido trifluoroacético que contiene 5% de agua. Los productos brutos se purifican mediante RP-HPLC en una columna Supelcosil C18 utilizando una elución en gradiente con los siguientes eluyentes: A, 0,1% de ácido trifluoroacético en agua; y B, 0,1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo/agua (80:20, vol/vol). Después de una elución isocrática con más del 5% de eluyente B durante 5 min, se genera un gradiente lineal del 0-25% de B o del 5-30% de B a lo largo de 25 minutos a temperatura ambiente y con una velocidad de flujo de 4 ml/min. La detección por UV se realiza a $\lambda = 214$ nm. La pureza de los péptidos se investiga mediante análisis RP-HPLC en una columna Synergi (4,6 mm x 25 cm, MAX-RP 80 Angstrom, 4 μ m).

[0057] Las siguientes referencias divulgan métodos para sintetizar los residuos y uniones descritos aquí. Para el anillo de piperizin-2-ona - ver Bhatt, U and Just, G, 2000, *Helvetica Chimica Acta*, 83:722-727; Mohamed, N., et al., 1998, *Tetrahedron Lett.*, 39:8213-8216; Teixido, M., et al., 2007, *Brain Res. Bull.*, 73(1-3):103-107. Para Nal(2') - ver Kavarana, MJ et al., 2000, *J. Med. Chem.*, 45:2644-22650; y Holder, J.R., et al., 2002, *J. Med. Chem.*, 45:5736-5744. Para los dipéptido miméticos de Aba-D-Phe, Aba-PCL-D-Phe, y Aba-D-Nal(2') - ver Ballet, S., et al., *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, 2007, 17:2492-2498. Para OIC, BIP and PIP - ver Bednarek, M.A., et al., 2007, *J. Med. Chem.*, 50:2520-2526. Para el enlazador de ácido glutámico - ver Mayorov, A.V. et al., 2008, *J. Med. Chem.* 51:187-195. Para Hyp(Bzl), t-butilglicina, y MAMB - ver Grieco, P., et al., 2007, *Peptides* 28:1191-1196. Para Azt, Pip, Nip, Tic, Oic - ver Bednarek, M.A., 2007, *Chem. Biol. Drug Design.*, 69:350-355. Para ciclación lactámica - ver Mayorov, A.V., et al., 2006, *J. Med. Chem.* 49:1946-1952. Para Pen y Aib - ver Balse-Srinivasan. P., et al., 2003 *J. Med. Chem.*, 46:4965-4973. Para un grupo n-pentanoilo y grupo n-hexanoilo - ver Cheung A.W.-H., et al., 2003, *Bio-organic & Med. Chem. Lett.*, 13:1307-1311. ORN (ornitina) y homoArg - ver Holder, J.R. et al., 2003, *Peptides*, 24:73-82. Para Phg - ver Holder, J. R. et al., 2002, *J. Med. Chem.*, 45, 3073-3081. Para ácido 2,3-diaminopropiónico - ver 2004, Vig, B.S., et al., *J. Med. Chem.*, 47(2):446-455.

Ensayo de Efectos Cardiovasculares Utilizando Ligando de Melanocortina de la Presente Invención

[0058] Hay muchos métodos posibles que serían conocidos, obvios, o disponibles para el experto en la materia para ensayar directamente e indirectamente la degradación y efectos cardiovasculares de un ligando de melanocortina de la presente invención.

[0059] Se realizan estudios cardiovasculares tanto agudos como crónicos utilizando los ligandos de melanocortina de la presente invención con el fin de determinar si las extensiones C-terminales como descritas aquí pueden proteger de exposición el farmacóforo RF. De esta manera, la resistencia a degradación C-terminal se mide indirectamente, pero de una manera terapéuticamente aplicable. Además, con las mediciones cardiovasculares tanto agudas como crónicas, se conocen entonces los efectos cardiovasculares cuando se introduzca/administre el ligando de melanocortina a un ser humano o mamífero, y hasta que el ligando de melanocortina se elimine del torrente sanguíneo del cuerpo humano o mamífero. Registros cardiovasculares agudos permiten un análisis continuo de las acciones de estos fármacos a lo largo de un período de horas, permitiendo una observación intensiva de los efectos después de la administración del ligando. Los parámetros cardiovasculares para el estudio cardiovascular agudo incluyen: componentes directos de presión arterial (sistólica, diastólica, presión arterial promedio, y frecuencia cardíaca) y el ECG. Los componentes de presión arterial se miden mediante un transductor de presión de estado sólido Millar en la arteria femoral. Esto permite una evaluación más precisa de cualquier anomalía de la presión arterial /frecuencia cardíaca. La señal del transductor Millar se amplifica en un módulo de presión arterial Transonic, y después se transmite a ordenador que ejecuta el software EMKA (EMKA Technologies, Inc., Falls Church, VA). Señales de los componentes de presión arterial se miden habitualmente sobre una base segundo a segundo, a pesar de que análisis por milisegundos o latido a latido sean una medición alternativa. Este último análisis se puede realizar de manera retrospectiva, mediante una reproducción del experimento. Inicialmente, los componentes de presión arterial a ser analizados incluyen PAM (presión arterial media) máxima y respuestas de FC (frecuencia cardíaca), y las áreas bajo cada curva respectiva. Debido a que los análogos de melanocortina que tienen farmacóforos RF expuestos producen acciones presoras y cardioaceleradoras prolongadas y variables, se calcula el área bajo cada curva (ABC) (ver, por ejemplo, D'Angelo et al., 2005, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 288(4):H1829-H1835), como lo son las derivadas primera y segunda de las ecuaciones que

describen cada curva de parámetro cardiovascular. Para la prueba cardiovascular crónica, sistemas de telemetría permiten la monitorización de múltiples animales a lo largo de largos períodos de tiempo (días o semanas). Cada animal solamente se registra durante unos pocos segundos (por ejemplo, 5-10 seg) por minuto para maximizar la duración de la batería y permite que sean monitorizados múltiples animales. Sin embargo, modelos más recientes permiten ahora la recarga inalámbrica de transmisores implantados. A continuación se describe un modelo telemétrico para estudio cardiovascular crónico.

[0060] Se puede usar un sistema telemétrico para la monitorización simultánea y continua con entrada directa a un ordenador que ejecuta EMKA ecgAuto-Cardio2+. En este enfoque se implanta quirúrgicamente un transmisor telemétrico, utilizando procedimientos asépticos, en la cavidad abdominal de una rata. Durante la cirugía, el catéter del transmisor se inserta en la aorta abdominal y se asegura con adhesivo tisular. Se suturan subcutáneamente electrodos de unidad telemétrica en el músculo pectoral derecho superior y el músculo de la pared abdominal superior izquierda. Estas unidades proporcionan simultáneamente señales de ECG y presión arterial. A los animales se les permite habitualmente 7-10 días de recuperación quirúrgica, utilizando el retorno de la ritmicidad circadiana de la presión arterial y FC como una métrica objetiva. Para experimentos agudos, se conduce una línea femoral IV a la espalda superior, se exterioriza, y se almacena dentro de un conjunto de acero en forma de botón, suturado en la espalda del animal. El transmisor producirá una señal de presión arterial (a través de una aorta abdominal canulada) y una señal de ECG utilizando la configuración con derivación II. Para esto, las derivaciones se implantan bajo la musculatura del cuadrante superior derecho del pecho, y dentro de la musculatura de la región abdominal superior izquierda. Estos procedimientos están bien descritos en la literatura (Stieber et al., 2006, *Mol. Pharmacol.*, 69(4): 1328-37), así como los procedimientos del fabricante.

[0061] Para administración crónica del ligando de melanocortina a un modelo de rata, se utilizan tanto minibombas Alza para infusión IV como pellets de liberación sostenida (Strader, A.D., et al., 2007, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322(3): 1153-1161; e Innovative Research of America, Sarasota, FL). La dosis diaria eficaz de partida para un ligando de melanocortina de la presente invención es de 1 mg/kg/día durante 14 días, y se titula hasta 10 mg/kg por día. Como control de la degradación del fármaco en las minibombas, se realizaron y evaluaron controles paralelos incubados (37 °C) para cualquier degradación peptídica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

[0062] Métodos de administración incluyen administración por inyección, oral, nasal y mucosal. Si la administración es por inyección, la inyección puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o por otros medios conocidos en la técnica. El ligando de melanocortina de esta invención puede formularse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica, incluyendo pero no limitado a la formulación como tabletas, cápsulas, comprimidos, suspensiones, polvos, preparaciones liofilizadas, supositorios, gotas oculares, parches dérmicos, formulaciones solubles orales, pulverizaciones, aerosoles y similares, y se pueden mezclar y formular con tampones, aglutinantes, excipientes, estabilizadores, antioxidantes, y otros agentes conocidos en el estado de la técnica. La administración nasal incluye cualquier forma de administración intranasal de un ligando de melanocortina de esta invención. Un ligando de melanocortina de esta invención puede estar en una solución acuosa, tal como una solución que incluye solución salina, citrato, u otros excipientes o conservantes comunes. El ligando de melanocortina también puede estar en una formulación seca, en polvo o formulación liofilizada.

[0063] Los efectos cardiovasculares reducidos (presión arterial y arritmias) son relativos en el ser humano o animal cuando se administra con diferentes ligandos de melanocortina de la presente invención. Se reduce relativamente cuando se compara entre un ligando de melanocortina que tiene una extensión C-terminal de acuerdo con la presente invención frente a su equivalente sin una extensión C-terminal.

[0064] Se emplea una composición farmacéutica y/o un kit que comprende el ligando de melanocortina de la presente invención para regular y tratar muchas afecciones que van desde la regulación del peso (por ejemplo, obesidad, anorexia y caquexia), secreción hormonal, hipersecreción de glándula exocrina, afecciones inmuno-relevantes, y disfunción sexual.

Aplicaciones

[0065] Efectos reguladores fisiológicos de un ligando de melanocortina de la presente invención, que van desde mecanismos hormonales, neuronales, enzimáticos y otros extracelulares e intracelulares afectan además condiciones corporales tales como la regulación del peso (por ejemplo, obesidad, anorexia y caquexia), secreción hormonal (por ejemplo, síndromes del ojo seco y/o de la boca seca), así como afecciones inmuno-relevantes y disfunción sexual. La disfunción de muchos de estos mecanismos fisiológicos conduce a enfermedad. En la presente solicitud, son distinguibles y separados efectos reguladores fisiológicos de efectos cardiovasculares.

[0066] En una realización, los efectos reguladores fisiológicos de un ligando de melanocortina de la presente invención se logran utilizando análogos agonistas de melanocortina (al-Obeidi et al., *J. Med Chem*, 1989, 32 (12), 2555-2561). En

otra realización, los efectos reguladores fisiológicos se logran utilizando análogos antagonistas de melanocortina (Hruby et al, 1995, *J. Med Chem*, 38: 3454-3461; Jayawickreme et al, 1994, *J. Biol Chem*, 269: 29846-29854).

5 **[0067]** En resumen, se proporciona un ligando de melanocortina que no se da de forma natural, que comprende un análogo de melanocortina acoplado con una extensión C-terminal resistente a degradación y, opcionalmente, una extensión N-terminal, para producir un ligando de melanocortina estable que tiene una actividad cardiovascular reducida o suprimida, mientras retiene la actividad reguladora de melanocortina deseada.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural el cual comprende un análogo de melanocortina acoplado a una extensión C-terminal resistente a degradación y una extensión N-terminal, donde el ligando de melanocortina que no se da de forma natural comprende la Fórmula I:

5 $Y^1-Y^2-Y^3-R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-X^1-X^2-X^3$ (Fórmula I)

donde el análogo de melanocortina comprende R^1 a R^7 , donde:

R^1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, norleucina, norleucina acetilada, cisteína acetilada, D-fenilalanina, D-fenilalanina acetilada, ácido succínico, ácido *o*-ftálico, tirosina, ácido aspártico, ácido glutárico, CO-cis-CH=CH-CO, un grupo *n*-pentanoílo, y un grupo *n*-hexanoílo;

10 R^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, cisteína, norleucina, arginina, ácido succínico, ácido glutárico, CO-cis-CH=CH-CO, un grupo *n*-pentanoílo, y un grupo *n*-hexanoílo;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en histidina, histidina metilada en posiciones 1 o 3, D-prolina, L-prolina, D-Nal(2'), L-Nal(2'), ácido succínico, *t*ButGly, Hyp(Bzl), Mamb, Oic, norleucina, Aba, β -alanina, y Tic;

15 R^4 se selecciona del grupo que consiste en histidina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, D-Nal(2'), pCl-D-Phe, y (*o*-Phe)Phe;

R^5 se selecciona del grupo que consiste en arginina, homoarginina, ornitina, alanina, prolina, Pip, Nip, Tic, Phg, Sar, y Azt;

R^6 se selecciona de D-triptófano, L-triptófano, D-Nal(2'), L-Nal(2'), Tic, y Bip;

20 R^7 se selecciona del grupo que consiste en cisteína, lisina, y ácido 2,3-diamino-propiónico;

donde si R^3 es Aba, entonces R^4 se selecciona del grupo que consiste en D-Phe, D-Nal(2'), y pCl-D-Phe; y

donde si R^2 es un grupo *n*-pentanoílo o un grupo *n*-hexanoílo, entonces R^1 , Y^1 , Y^2 , e Y^3 están ausentes;

donde la extensión N-terminal comprende Y^1 a Y^3 :

Y^1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, y L-prolina;

25 Y^2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

Y^3 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

donde la extensión C-terminal resistente a degradación comprende X^1 a X^3 y

30 X^1 es D-treonina;

X^2 es D-prolina;

X^3 es D-treonina

donde el ligando de melanocortina se cicla mediante una unidad seleccionada del grupo que consiste en:

cuando R^2 es cisteína y R^7 es cisteína se forma un enlace disulfuro entre R^2 y R^7 ;

35 cuando R^2 es ácido glutámico o ácido aspártico y R^7 es lisina se forma un puente lactámico de cadena lateral entre R^2 y R^7 ; y

cuando R^2 o R^3 es ácido succínico y R^7 es ácido 2,3-diamino-propiónico se forma un cierre lactámico entre R^2 o R^3 y R^7 .

40 2. El ligando de melanocortina que no se da de forma natural de la reivindicación 1, donde D-fenilalanina está halogenada en la posición *para* cuando R^4 es D-fenilalanina.

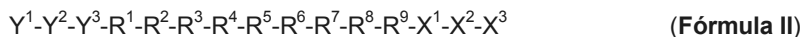
3. El ligando de melanocortina que no se da de forma natural de la reivindicación 1, donde el análogo de melanocortina es un agonista del receptor MC4, un antagonista del receptor MC4, un agonista del receptor MC3, un antagonista del receptor MC3, y/o un agonista de MC5.

5 4. Una composición farmacéutica que comprende el ligando de melanocortina que no se da de forma natural de la reivindicación 1 y una sal farmacéutica.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, donde, cuando utilizada en terapia, son reducidos cualquiera efectos cardiovasculares.

10

6. Un ligando de melanocortina que no se da de forma natural que comprende un análogo de melanocortina acoplado a una extensión C-terminal resistente a degradación y una extensión N-terminal, donde el ligando de melanocortina que no se da de forma natural comprende la Fórmula II:



15 donde el análogo de melanocortina comprende R¹ a R⁹, donde:

R¹ es tirosina;

R² es valina;

R³ se selecciona del grupo que consiste en metionina, norleucina, cisteína y L-penicilamina;

R⁴ es ácido aspártico;

20 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en histidina, norleucina, prolina, y Aib;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, D-Nal(2'), y L-Nal(2');

R⁷ es arginina;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en triptófano y D-Nal(2'); y

R⁹ es lisina;

25 donde la extensión N-terminal comprende Y¹ a Y³:

Y¹ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, y L-prolina;

Y² está ausente o se selecciona del grupo que consiste en D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina, y un anillo de piperazin-2-ona;

30 Y³ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en cisteína, D-treonina, L-treonina, D-prolina, L-prolina y un anillo de piperazin-2-ona;

donde la extensión C-terminal resistente a degradación comprende X¹ a X³ y:

X¹ es D-treonina;

X² es D-prolina; y

X³ es D-treonina; y

35 donde el ligando de melanocortina está ciclado y se forma un puente lactámico de cadena lateral entre R⁴ y R⁹.

7. El ligando de melanocortina que no se da de forma natural de la reivindicación 6, donde el análogo de melanocortina es un antagonista de MC3.

8. Una composición farmacéutica que comprende el ligando de melanocortina que no se da de forma natural de la reivindicación 6 y una sal farmacéutica.

5 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde, cuando utilizada en terapia, son reducidos cualquiera efectos cardiovasculares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Controles tensivos

<120> LIGANDOS DE MELANOCORTINA ESTABILIZADOS

<130> T154 1010PCT 61156 0003.4

5 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Farmacóforo

<400> 1

His Phe Arg Trp

15 1

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Farmacóforo

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

25 <223> ACETILACIÓN, Nle

<400> 2

Leu Asp His Phe Arg Trp

1 5

30 <210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Farmacóforo

35 <400> 3

His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

1 5