

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 147**

51 Int. Cl.:

A61K 38/33 (2006.01)

A61K 38/34 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2010 PCT/US2010/056690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11060352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010 E 10830850 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2501225**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de ligandos del receptor de melanocortina**

30 Prioridad:

16.11.2009 US 281360 P

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**IPSEN PHARMA S.A.S. (100.0%)
65, Quai Georges Gorse
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**DONG, ZHENG XIN y
ZHANG, JUNDONG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 147 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

Composiciones farmacéuticas de ligandos del receptor de melanocortina

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una sal de pamoato de Ac-Arg-ciclo(Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ que es un ligando del subtipo 4 del receptor de melanocortina (MC4-R) y en el que, después de su administración subcutánea o intramuscular a un sujeto, el péptido forma un depósito a pH fisiológico que se disuelve lentamente y se libera en el fluido corporal y en el torrente circulatorio. La composición de la presente invención comprende además el componente orgánico polietilenglicol (PEG) con un peso molecular medio de 200 o 400. Las melanocortinas son una familia de péptidos reguladores que se forman mediante el procesamiento postraducciona

l de pro-hormona pro-opiomelanocortina (POMC; 131 aminoácidos de longitud). La POMC se procesa en tres clases de hormonas; las melanocortinas, la hormona adrenocorticotropina y varias endorfinas (por ejemplo, lipotropina) (Cone, et al., Recent Prog. Horm. Res., 51: 287 - 317, (1996); Cone et al., Ann. NY Acad. Sci., 31: 342 - 363, (1993)).

Las melanocortinas se han encontrado en una amplia variedad de tejidos humanos normales, incluyendo el cerebro, glándulas suprarrenales, piel, testículos, bazo, riñón, ovario, pulmón, tiroides, hígado, colon, intestino delgado y páncreas (Tatro, J. B. et al., Endocrinol. 121: 1900 - 1907 (1987); Mountjoy, K. G. et al., Science 257: 1248 - 1251 (1992); Chhajlani, V. et al., FEBS Lett. 309: 417 - 420 (1992); Gantz, I. et al., J. Biol. Chem. 268: 8246 - 8250 (1993) y Gantz, I. et al., J. Biol. Chem. 268: 15174 - 15179 (1993)).

Se ha demostrado que los péptidos de melanocortina presentan una amplia variedad de actividades fisiológicas, incluyendo el control de la conducta y la memoria, que afectan a las propiedades neurotróficas y antipiréticas, al igual que afectan a la modulación del sistema inmunitario. Además de sus efectos bien conocidos sobre las funciones corticosuprarrenales (hormona adrenocorticotrópica o "ACTH") y sobre los melanocitos (hormona estimuladora de los melanocitos o "MSH"), también se ha demostrado que las melanocortinas controlan el sistema cardiovascular, la analgesia, la termorregulación y la liberación de otros agentes neurohumorales que incluyen prolactina, hormona luteinizante y aminas biogénicas (De Wied, D. et al., Methods Achiev. Exp. Pathol. 15: 167 - 199 (1991); De Wied, D. et al., Physiol. Rev. 62: 977 - 1059 (1982); Guber, K. A. et al., Am. J. Physiol. 257: R681 - R694 (1989); Walker J. M. et al., Science 210: 1247 - 1249 (1980); Murphy, M. T. et al., Science 221: 192 - 193 (1983); Ellerkmann, E. et al., Endocrinol., 130: 133 - 138 (1992) y Versteeg, D. H. G et al., Life Sci. 38: 835 - 840 (1986)).

También se ha demostrado que los sitios de unión para las melanocortinas se distribuyen en muchos tipos de tejidos diferentes, incluyendo glándulas lagrimales y submandibulares, páncreas, tejido adiposo, de la vejiga, duodeno, bazo, cerebro y gonadal, así como tumores de melanoma maligno. Hasta ahora han sido caracterizados cinco receptores de melanocortina. Estos incluyen receptor específico de melanocitos (MC1-R), receptor de ACTH corticoadrenal-específico (MC2-R), de melanocortina-3 (MC3-R), de melanocortina-4 (MC4-R) y receptor de melanocortina-5 (MC5-R). Todos los receptores de melanocortina responden a la clase de hormonas peptídicas de las hormonas estimuladoras de melanocitos (MSH) (Cone, R. D. et al., Ann. NY Acad. Sci., 680: 342 - 363 (1993); Cone, R. D. et al., Recent Prog. Horm. Res., 51: 287 - 318 (1996)).

El MC1-R, conocido en la técnica como receptor de hormona estimuladora de melanocitos (MSH-R), receptor de melanotropina o receptor de melanocortina-1, es una proteína transmembrana de 315 aminoácidos que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. El MC1-R es un receptor para MSH y ACTH. La actividad de MC1-R está mediada por proteínas G que activan la adenilato ciclasa. Los receptores MC1-R se encuentran en los melanocitos y el tejido corticosuprarrenal, así como en otros tejidos tales como glándulas suprarrenales, leucocitos, pulmones, ganglios linfáticos, ovarios, testículos, hipófisis, placenta, bazo y útero. El MC2-R, también llamado receptor de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH-R), es una proteína transmembrana de 297 aminoácidos que se encuentra en los melanocitos y el tejido corticoadrenal. El MC2-R media el efecto corticotrópico de ACTH. En seres humanos, el MC3-R es una proteína de 360 AA que se encuentra en el tejido cerebral; en ratones y ratas MC3-R es una proteína de 323 AA. El MC4-R es una proteína transmembrana de 332 aminoácidos que también se expresa en el cerebro así como en tejidos placentarios y del intestino. El MC5-R es una proteína transmembrana de 325 aminoácidos que se expresa en las glándulas suprarrenales, el estómago, el pulmón y el bazo y niveles muy bajos en el cerebro. El MC5-R también se expresa en las tres capas de la corteza suprarrenal, predominantemente en las células de la zona glomerulosa productoras de aldosterona.

Los cinco receptores de melanocortina conocidos difieren, sin embargo, en sus funciones. Por ejemplo, MC1-R es un receptor acoplado a proteína G que regula la pigmentación en respuesta a α -MSH, un potente agonista de MC1-R. El agonismo del receptor MC1-R da como resultado la estimulación de los melanocitos que produce la eumelanina y aumenta el riesgo de cáncer de piel. El agonismo de MC1-R puede tener también efectos neurológicos. La estimulación de la actividad de MC2-R puede dar como resultado un carcinoma de tejido suprarrenal. La confirmación farmacológica reciente ha establecido que los receptores MC4-R centrales son los principales mediadores de los efectos anoréxicos y orexigénicos publicados para los agonistas y antagonistas de la melanocortina, respectivamente. Los efectos del agonismo de MC3-R y MC5-R aún no se conocen.

Se ha suscitado un gran interés en los receptores de melanocortina (MC-R) como dianas para el diseño de nuevas terapias para tratar trastornos del peso corporal como la obesidad y la caquexia. Tanto la evidencia genética como la

farmacológica apuntan hacia los receptores MC4-R centrales como objetivo principal (Giraudo, S. Q. et al., *Brain Res.*, 809: 302 - 306 (1998); Farooqi, I. S. et al., *NE J Med.*, 348: 1085 - 1095 (2003); MacNeil, D. J. et al., *Eu. J. Pharm.*, 44: 141 - 157 (2002); MacNeil, D. J. et al., *Eu. J. Pharm.*, 450: 93 - 109 (2002); Kask, A. et al., *NeuroReport*, 10: 707 - 711 (1999)). El progreso actual con agonistas y antagonistas selectivos del receptor evidencia el potencial terapéutico de la activación del receptor de melanocortina, en particular el MC4-R.

Agonista, antagonista u otros compuestos de ligando que activan uno o más receptores de melanocortina serían útiles para tratar una amplia variedad de indicaciones en un sujeto en necesidad de tratamiento o en riesgo, incluyendo enfermedades inflamatorias agudas y crónicas tales como inflamación general (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), enfermedad inflamatoria del intestino (patente de EE. UU. n° 6.713.487; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), inflamación cerebral (Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), sepsis (patente de EE. UU. n° 6.613.874, patente de EE. UU. n° 6.713.487; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)) y choque séptico (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)); enfermedades con un componente autoinmunitario tal como artritis reumatoide (patente de EE. UU. n° 6.713.487; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), artritis gotosa (Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004), Getting, S. J. et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2: 1064 - 1069 (2001)), y esclerosis múltiple ((patente de EE. UU. n° 6.713.487); enfermedades metabólicas y afecciones médicas acompañadas de ganancia de peso tal como obesidad (patente de EE. UU. n° 6.613.874; patente de EE. UU. n° 6.600.015; Fehm, H. LI et al., *J. Clin. Endo. 2 Metab.*, 86: 1144-1148 (2001)), Hansen, M. J. et al., *Brain Res.*, 1039: 137-145 (2005); Ye, Z. et al., *Peptides*, 26: 2017 - 2025 (2005); Farooqi, I. S. et al., *NE J Med.*, 348: 1085 - 1095 (2003); MacNeil, D. J. et al., *Eu. J. Pharm.*, 44: 141 - 157 (2002); MacNeil, D. J. et al., *Eu. J. Pharm.*, 450: 93 - 109 (2002); Kask, A. et al., *NeuroReport*, 10: 707 - 711 (1999); Schwartz, M. W., *J. Clin. Invest.*, 108: 963 - 964 (2001), Gura, T., *Science*, 287: 1738 - 1740 (2000), Raffin - Sanson, ML, *Eu. J. Endo.*, 144: 207 - 208 (2001), Hamilton, B. S. et al., *Obesity Res.* 10: 182 - 187 (2002)), trastornos de alimentación (patente de EE. UU. n° 6.720.324; Fehm, HL et al., *J. Clin. Endo. 2 Metab.*, 86: 1144 - 1148 (2001); Pontillo, J. et al., *Bioorganic 2 Med. Chem. Ltrs.*, 15: 2541 -2546 (2005)) y Síndrome de Prader-Willi (G. E., Y. et al., *Brain Research*, 957: 42-45 (2002)); enfermedades metabólicas y condiciones médicas acompañadas de pérdida de peso, tales como anorexia (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Wisse, B. R. et al., *Endo.*, 142: 3292 - 3301 (2001)), bulimia (patente de EE. UU. n° 6.720.324), emaciación por SIDA (Marsilje, T. H. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 3721 - 3725 (2004); Markison, S. et al., *Endocrinology*, 146: 2766 - 2773 (2005)), caquexia (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Lechan, RM et al., *Endo.*, 142: 3288 - 3291 (2001); Pontillo, J. et al., *Bioorganic 2 Med. Chem. Ltrs.*, 15: 2541 - 2546 (2005)), caquexia del cáncer (patente de EE. UU. n° 6.639.123) y pérdida en ancianos frágiles (patente de EE. UU. n° 6.639.123); diabetes (patente de EE. UU. n° 6.713.487) y trastornos relacionados con la diabetología y complicaciones de la diabetes tales como la retinopatía (patente de EE. UU. n° 6.525.019); proliferación neoplásica (patente de EE. UU. n° 6.713.487) tal como cáncer de piel (Sturm, R. A., *Melanoma Res.*, 12: 405 - 416 (2002); Bastiens, M. T. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 884 - 894 (2001)), y cáncer de próstata (Luscombe, C. J. et al., *British J. Cancer*, 85: 1504 - 1509 (2001); condiciones médicas reproductivas o sexuales tales como endometriosis (patente de EE. UU. n° 6.713.487) y sangrado uterino en mujeres (patente de EE. UU. n° 6.613.874), disfunción sexual (patente de EE. UU. n° 6.720.324; Van der Ploeg, L. H. T. et al., *PNAS*), Molinoff, P. B. et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 994: 96 - 102 (2003), Hopps, C. V. y col., *BJU International*, 92: 534 - 538 (2003)), disfunción eréctil ((patente de EE. UU. n° 6.613.874; Diamond, L. E. et al., *Urology*, 65: 755 - 759) (2005), Wessells, H. et al., *Int. J. Impotence Res.*, 12: S74 - S79 (2000), Andersson, K. E. et al., *Int. J. Impotence Res.*, 14: S82 - S92 (2002), Bertolini, A. et al., *Sexual Behavior: Pharmacology and Biochemistry*, Raven Press, NY, p 247 - 257 (1975); Wessells, H. et al., *Neuroscience*, 118: 755 - 762 (2003), Wessells, H. et al., *Urology*, 56: 641 - 646 (2000), Shadiack, A. M. et al., *Society for Neuroscience Abstract*, (2003); Wessells, H. et al., *J. Urology*, 160: 389 - 393 (1998), Rosen, R.C. et al., *Int. J. Impotence Res.*, 16: 135 - 142 (2004), Wessells, H. et al., *Peptides*, 26: 1972 - 1977 (2005)) y disminución de la respuesta sexual en las mujeres (patente de EE. UU. n° 6.713.487; Fourcroy, J. L., *Drugs*, 63: 1445 - 1457 (2003)); enfermedades o condiciones que resultan del tratamiento o lesiones del organismo tales como rechazo del trasplante de un órgano (patente de los Estados Unidos n° 6.713.487; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), lesión por isquemia y reperfusión (Mioni, C. et al., *Eu. J. Pharm.*, 477: 227 - 234 (2003); Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1-29 (2004)), tratamiento de lesión de médula espinal y aceleramiento de la curación de heridas (Sharma HS et al., *Acta. Neurochir. Suppl.*, 86: 399 - 405 (2003); Sharma H. S., *Ann. NY Acad. Sci.* 1053: 407 - 421 (2005); patente de EE. UU. n° 6.525.019), así como pérdida de peso causada por quimioterapia, radioterapia, inmovilización temporal o permanente (Harris, R. B. et al., *Physiol. Behav.*, 73: 599 - 608 (2001)) o diálisis; enfermedades cardiovasculares o afecciones tales como choque hemorrágico (Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), choque cardiogénico (patente de EE. UU. n° 6.613.874), choque hipovolémico (patente de EE. UU. n° 6.613.874), trastornos cardiovasculares (patente de EE. UU. n° 6.613.874) y caquexia cardíaca (Markison, S. et al., *Endocrinology*, 146: 2766 - 2773 (2005); enfermedades pulmonares o afecciones tales como síndrome de dificultad respiratoria aguda (patente de EE. UU. n° 6.350.430); Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (patente de EE. UU. n° 6.713.487), asma (patente de EE. UU. n° 6.713.487) y fibrosis pulmonar; tolerancia inmunológica (Luger, T. A. et al., *Pathobiology*, 67: 318 - 321 (1999)) y para combatir ataques al sistema inmunológico tales como los asociados con ciertas alergias (patente de EE. UU. n° 6.713.487) o rechazo de trasplante de órganos (patente de EE. UU. n° 6.713.487; Catania, A. et al., *Pharm. Rev.*, 56: 1 - 29 (2004)); tratamiento de enfermedades y afecciones dermatológicas tales como psoriasis (patente de EE. UU. n° 6.713.487), agotamiento de la pigmentación de la piel (patente de EE. UU. n° 6.713.487; Ye, Z. et al., *Peptides*, 26: 2017 - 2025 (2005)), acné (Hatta, N. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 116: 564 - 570 (2001); Bohm, M. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 118: 533 - 539 (2002)), formación de queloides (patente de EE. UU. n° 6.525.019) y cáncer de piel

(Sturm, R. A., Melanoma Res., 12: 405 - 416 (2002); Bastiens, M. T. et al., Am. J. Hum. Genet., 68: 884 - 894 (2001)); trastornos del comportamiento, del sistema nervioso central o neuronales, y trastornos tales como ansiedad (patente de EE. UU. n° 6.720.324; Pontillo, J. et al., Bioorganic 2 Med. Chem. Ltrs., 15: 2541 - 2546 (2005)), depresión (Chaki, S. et al., Peptides, 26: 1952 - 1964 (2005), Bednarek, M. A. et al., Expert Opinion Ther. Patents, 14: 327 - 336 (2004); patente de EE. UU. n° 6.720.324), memoria y disfunción de la memoria (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Voisey, J. et al., Curr. Drug Targets, 4: 586 - 597 (2003)), modulación de la percepción del dolor (patente de EE. UU. n° 6.613.874; Bertolini, A. et al., J. Endocrinol. Invest., 4: 241 - 251); Vrinten, D. et al., J. Neuroscience, 20: 8131 - 8137 (2000)) y tratamiento del dolor neuropático (Pontillo, J. et al., Bioorganic 2 Med. Chem. Ltrs., 15: 2541 - 2546 (2005)); afecciones y enfermedades asociadas con el consumo de alcohol, abuso del alcohol y/o alcoholismo (documento WO 05/060985; Navarro, M. et al., Alcohol Clin. Exp. Res., 29: 949 - 957 (2005)); y condiciones o enfermedades renales tales como el tratamiento de la caquexia renal (Markison, S. et al., Endocrinology, 146: 2766 - 2773 (2005)) o natriuresis (patente de EE. UU. n° 6.613.874).

Los compuestos de ligando que activan uno o más receptores de melanocortina serían útiles para modular una amplia variedad de actividades normalizadoras u homeostáticas en un sujeto que lo necesite, incluyendo la liberación de tiroxina (patente de EE. UU. n° 6.613.874), síntesis y liberación de aldosterona (patente de EE. UU. n° 6.613.874), temperatura corporal (patente de EE. UU. n° 6.613.874), presión sanguínea (patente de EE. UU. n° 6.613.874), frecuencia cardíaca (patente de EE. UU. n° 6.613.874), tono vascular (patente de EE. UU. n° 6.613.874), flujo sanguíneo cerebral (patente de EE. UU. n° 6.613.874), niveles de glucosa en sangre (patente de EE. UU. n° 6.613.874), metabolismo óseo, formación ósea o desarrollo (Dumont, LM y col., Peptides, 26: 1929-1935 (2005), peso ovárico (patente de EE. UU. n° 6.613.874), desarrollo placentario (patente de EE. UU. n° 6.613.874), prolactina y secreción de FSH (patente de EE. UU. n° 6.613.874), crecimiento fetal intrauterino (patente de EE. UU. n° 6.613.874), parto (patente de EE. UU. n° 6.613.874), espermatogénesis (patente de EE. UU. n° 6.613.874), secreción de sebo y de feromona (patente de EE. UU. n° 6.613.874), la neuroprotección (patente de EE. UU. n° 6.639.123) y el crecimiento nervioso (patente de EE. UU. n° 6.613.874) así como la motivación modulante (patente de EE. UU. n° 6.613.874), de aprendizaje (patente de EE. UU. n° 6.613.874) y otros comportamientos (patente de EE. UU. n° 6.613.874).

Existe la necesidad de formulaciones mejoradas de composiciones que contengan péptidos que sean ligandos de uno o más receptores de melanocortina, en particular ligandos que se unan selectivamente a MC4-R, que proporcionen un perfil aceptable de liberación sostenida con parámetros farmacocinéticos mejorados, con una única inyección subcutánea. Idealmente, tales formulaciones mejoradas de liberación sostenida comprenden nuevos péptidos que actúan como ligandos para uno o más receptores de melanocortina como se describe en las publicaciones internacionales anteriores propias debidas al solicitante WO2007/008704, WO2008/147556 y WO2008/156677. Además, entre otros efectos terapéuticos de las formulaciones de la presente invención, se encuentran la atenuación de los efectos secundarios y la mejora de eficacia asociada con un perfil de liberación más plano. Además, la presente invención proporciona una solución, que puede ser o no una solución clara, exenta de excipientes, simplificando así el proceso de fabricación.

Sumario de la invención.

Los autores de la presente invención hicieron el sorprendente descubrimiento de que una formulación de una composición farmacéutica que comprende una sal de pamoato de un péptido que actúa como ligando de uno o más de los receptores de melanocortina, muestra una solubilidad ideal para la liberación lenta *in vivo*. El péptido es el siguiente péptido al que se denomina "Ejemplo 1": Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂, un ligando del receptor de melanocortina subtipo 4, en el que después de la administración subcutánea o intramuscular a un sujeto, el péptido forma un depósito a pH fisiológico, que se disuelve lentamente y se libera en el fluido corporal y el torrente circulatorio, dando como resultado la atenuación de los efectos secundarios y una mejor eficacia.

La invención se puede resumir en los párrafos que siguen a continuación, así como en las reivindicaciones.

(1) En un aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica de una solución, un gel o un semisólido, o una suspensión, que comprende una sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His -D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ en el que la sal pamoato de dicho péptido se disuelve en una solución acuosa de PEG200 o PEG400, en la que la relación en volumen de PEG a agua es de 1:99 a 99:1, en la que el péptido forma un depósito después de la administración subcutánea o intramuscular a un sujeto.

(2) La composición farmacéutica según el párrafo 9, en la que dicho péptido se disuelve en una solución acuosa de PEG200 o PEG400, en la que la relación en volumen de PEG a agua es de 1:9 a 1:1.

(3) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, en la que la concentración peso a volumen de dicho péptido está entre 0,1 mg/mL y 600 mg/mL.

(4) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el pH de dicha composición está entre 3,0 y 8,0.

- (5) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 13, en donde dicha sal pamoato de Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución acuosa de PEG400, en donde la relación en volumen de PEG400 a agua es de 1:1, y en la que la concentración en peso del péptido en volumen es de 200 mg/mL.
- 5 (6) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 13, en donde dicha sal pamoato de Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución acuosa de PEG200, en la que la relación en volumen de PEG200 a agua es de 1:1, y en la que la concentración peso en volumen del péptido es de 200 mg/mL.
- (7) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 13, en la que dicha sal pamoato de Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución de PEG400/PBS, cuya relación en volumen de PEG400 a PBS es de 1:1, y en la que la concentración de peso del péptido en volumen es de 300 mg/mL.
- 10 (8) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 13, en la que dicha sal pamoato de Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución de PEG400 en solución salina, en donde la relación en volumen de PEG400 a volumen de solución salina es de 1:1, y en la que la concentración peso-volumen del péptido es de 300 mg/mL.
- 15 (9) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende además un conservante.
- (10) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 9, en la que dicho conservante se elige entre el grupo formado por m-cresol, fenol, alcohol bencílico y metilparabeno.
- (11) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 10, en la que dicho conservante está presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 100 mg/ml.
- 20 (12) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende adicionalmente un agente isotónico.
- (13) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 12, en la que dicho agente isotónico está presente en una concentración de 0,01 mg/mL a 100 mg/mL.
- 25 (14) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende adicionalmente un estabilizante.
- (15) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 14, en el que dicho estabilizante se elige entre el grupo que consiste en imidazol, arginina e histidina.
- (16) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende además un agente tensioactivo.
- 30 (17) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende además un agente quelante.
- (18) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende además un tampón.
- 35 (19) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 18, en la que dicho tampón se elige entre el grupo que consiste en Tris, acetato amónico, acetato sódico, glicina, ácido aspártico y Bis-Tris.
- (20) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, que comprende además un metal divalente.
- (21) La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 20, en el que dicho metal divalente es el zinc.

Breve descripción de los dibujos.

- 40 La FIG. 1A y la FIG. 1B muestran gráficas a tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) obtenidos después de una única administración subcutánea a ratas Sprague-Dawley dosificadas a razón de 2,5 mg/kg de peso corporal, de una formulación que comprende 200 mg/mL (20% p/v) de la sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en un disolvente de 50% de PEG400 y 50% de agua (v/v), en una escala normal y en una escala logarítmica, respectivamente.
- 45 La FIG. 2A y la FIG. 2B muestran gráficas a tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) obtenidos después de una sola administración subcutánea a ratas Sprague-Dawley dosificadas a razón de 2,5 mg/kg de peso corporal, de una formulación que comprende 200 mg/mL (20% p/v) de la sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en un disolvente de 50% de PEG200 y 50% de agua (v/v), en una escala normal y en una escala logarítmica, respectivamente.

La FIG. 3A y la FIG. 3B muestran gráficas a tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) obtenidos después de una sola administración subcutánea a ratas Sprague-Dawley dosificadas a razón de 3,75 mg/kg de peso corporal, de una formulación que comprende 300 mg/mL (30% p/v) de la sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en un disolvente de 50% de PEG400 y 50% de PBS (v/v), en una escala normal y en una escala logarítmica, respectivamente.

La FIG. 4A y la FIG. 4B muestran gráficas a tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) obtenidos después de una única administración subcutánea a ratas Sprague-Dawley dosificadas a razón de 3,75 mg/kg de peso corporal, de una formulación que comprende 300 mg/mL (30% p/v) de la sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en un disolvente de 50% de PEG400 y 50% de solución salina (v/v), en una escala normal y en una escala logarítmica, respectivamente.

La FIG. 5A y la FIG. 5B muestran gráficas de curso completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) obtenidos después de una única administración subcutánea a ratas Sprague-Dawley dosificadas a razón de 0,5 mg/kg de peso corporal de una formulación que comprende sal acetato del Ejemplo 1 disuelta en una solución salina/2% de suero de ratón inactivado por calor/DMA al 5%/ 2% de disolvente Tween-80, en una escala normal y en una escala logarítmica, respectivamente.

La FIG. 6A y la FIG. 6B muestran las mismas gráficas de curso completo de los perfiles farmacocinéticos (valores medios) como se muestra en FIG. 1A a FIG. 5A en una escala normal, así como en las Figuras 1B a 5B en una escala logarítmica, como una comparación por pares de las diferentes formulaciones usadas en los experimentos como se describe en este documento.

20 Descripción detallada de la invención.

La nomenclatura utilizada para definir los péptidos en el presente texto es la que se usa en la técnica normalmente, en la que el grupo amino en el extremo N aparece a la izquierda y el grupo carboxilo en el extremo C aparece a la derecha. Cuando el aminoácido tiene formas isómeras, está representada la forma L del aminoácido, a menos que se indique explícitamente otra cosa. A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente texto tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

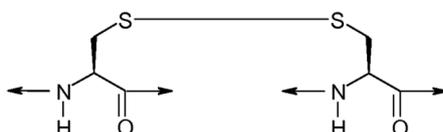
Las abreviaturas utilizadas en este documento se definen de la siguiente manera:

Ac:	acetilo
Ala o A:	alanina
30 Arg o R:	arginina
Cys o C:	cisteína
Glu o E:	ácido glutámico
Gly o G:	glicina
His o H:	histidina
35 Phe o F:	fenilalanina
Trp o W:	triptófano
Tyr o Y:	tirosina

A menos que se indique otra cosa, todas las abreviaturas (por ejemplo Ala) de aminoácidos en esta descripción representan la estructura de $-\text{NH}-\text{C}(\text{R})(\text{R}')-\text{CO}-$, donde R y R' son independientemente cada uno de ellos hidrógeno o la cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, R = CH_3 y R' = H para Ala), o R y R' se pueden unir para formar un sistema de anillo.

La designación " NH_2 " en, por ejemplo, Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)- NH_2 , indica que el extremo C del péptido está amidado.

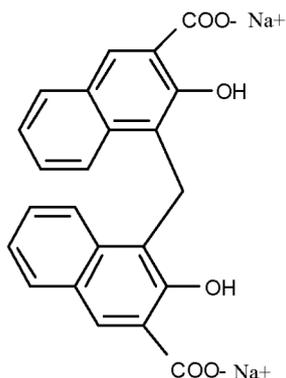
"-cyclo (Cys-Cys)-" denota la estructura:



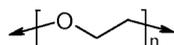
El término "aproximadamente" como se usa en el presente texto, en asociación con parámetros y cantidades, significa que el parámetro o cantidad está dentro de $\pm 5\%$ del parámetro o cantidad establecido.

Otras abreviaturas utilizadas en el presente texto se definen de la siguiente manera:

- Boc: terc-butiloxicarbonilo
- 5 BSA: albúmina de suero bovino
- DCM: diclorometano
- DIPEA: diisopropiletilamina
- DMF: dimetilformamida
- DTT: ditioneitol
- 10 Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
- HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
- HOBt: 1-hidroxi-benzotriazol
- HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución
- IBMX: isobutilmetilxantina
- 15 pamoato sódico: sal disódica del ácido pamoico que tiene la estructura:



- LC-MS: cromatografía de líquidos con espectrometría de masas
- LOQ: límite de cuantificación
- MRM: monitorización de reacción múltiple
- 20 NMP: N-metilpirrolidona
- PBS: solución salina tamponada con fosfato
- PEG: poli(etilenglicol), que tiene la estructura



en donde n es un número entero entre 1 y 2.000

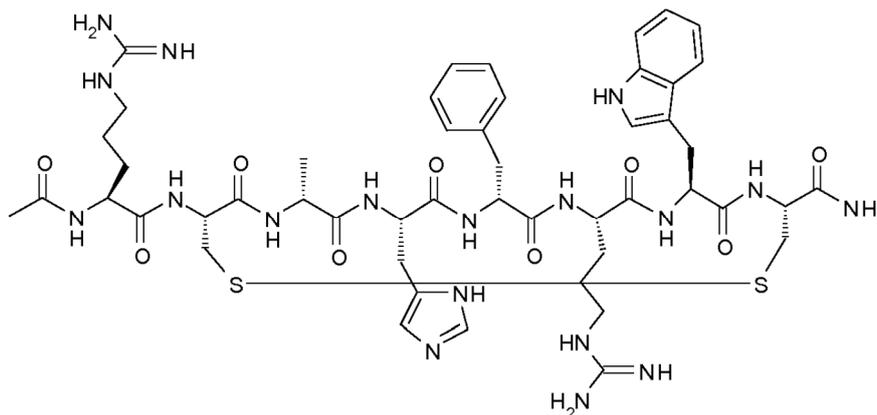
- 25 PEG200: poli(etilenglicol) con un peso molecular medio de aproximadamente 200 Da
- PEG400: poli(etilenglicol) con un peso molecular medio de aproximadamente 400 Da
- TFA: ácido trifluoroacético
- TIS: triisopropilsilano
- Tris-HCl: hidrocloreuro de tris (hidroximetil) aminometano

Trt: tritilo

Síntesis.

Los péptidos de esta invención pueden prepararse mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar. Véase p. ej. Stewart, J. M., et al., *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2ª edición, 1984). Los ejemplos que siguen describen métodos de síntesis para preparar un péptido de esta invención, métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Otros métodos son también conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y en modo alguno pretenden limitar el alcance de la presente invención.

• Síntesis del Ejemplo 1, es decir, Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Tro-Cys)-NH₂



El péptido del título que tiene la estructura anterior se ensambló usando química Fmoc en un sintetizador de péptidos Apex (Aapptec, Louisville, KY, EE. UU.). Se pusieron 220 mg de resina Rink Amide MBHA (Polymer Laboratories, Amherst, MA, EE.UU.) de 0,91 mmol/g (0,20 mmoles) en un pocillo de reacción y se hincharon previamente en 3,0 mL de DMF antes de la síntesis. Para el ciclo 1, la resina se trató con dos porciones de 3 mL de piperidina al 25% en DMF durante 5 y 10 minutos respectivamente, seguido por 4 lavados de DMF de 3 mL, consistiendo cada lavado en añadir 3 mL de disolvente, mezclar durante 1 minuto y vaciar durante 1 minuto. Los stocks de aminoácidos se prepararon en NMP como soluciones 0,45 M que contienen HOBt 0,45 M. Se preparó HBTU como una solución 0,45 M en NMP y se preparó DIPEA como una solución 2,73 M en NMP. A la resina, se añadieron 2 mL del primer aminoácido (0,9 mmoles, Fmoc-Cys (Trt)-OH) (Novabiochem, San Diego, CA, EE. UU.) junto con 2 mL (0,9 mmoles) de HBTU y 1,5 mL (4,1 mmoles) de DIPEA. Después de una hora de mezcla constante, los reactivos de acoplamiento se drenaron de la resina y se repitió la etapa de acoplamiento. Después de la acilación de aminoácidos, la resina se lavó con dos partes alcuotas de 3 mL de DMF durante 1 minuto. El proceso de ensamblaje del péptido (desbloqueo/lavado/acilato/lavado) se repitió para los ciclos 2 - 9 idénticos a los descritos para el ciclo 1. Se usaron los siguientes aminoácidos: ciclo 2) Fmoc-Trp (Boc)-OH (Genzyme, Cambridge, MA, EE. UU.); ciclo 3) Fmoc-Arg (Pbf)-OH (Novabiochem); ciclo 4) Fmoc-DPhe-OH (Genzyme); ciclo 5) Fmoc-His (Trt)-OH (Novabiochem); ciclo 6) Fmoc-D-Ala-OH (Genzyme); ciclo 7) Fmoc-Cys (Trt)-OH, (Novabiochem); y ciclo 8) Fmoc-Arg (Pbf)-OH (Genzyme). El Fmoc N-terminal se eliminó con piperidina al 25% en DMF como se describió anteriormente, seguido por cuatro lavados con 3 mL de DMF durante 1 minuto. La acetilación del extremo N-terminal se realizó añadiendo a la resina 0,5 mL de DIPEA 3 M en NMP junto con 1,45 mL de anhídrido acético 0,45 M en NMP. La resina se mezcló durante 30 minutos y se repitió la acetilación. La resina se lavó con 3 mL de DMF durante un total de 5 veces, seguido de 5 lavados con 5 mL de DCM cada uno.

Para escindir y desproteger el péptido, se añadieron a la resina 5 mL del siguiente reactivo: 2% de TIS/5% de agua/5% (p/v) de DTT/88% de TFA. La solución se dejó agitando durante 3,5 horas. El filtrado se recogió en 40 mL de éter etílico anhidro frío. El precipitado se sedimentó durante 10 minutos a 3500 rpm en una centrifuga refrigerada. El éter se decantó y el péptido se resuspendió en éter fresco. El tratamiento de éter se realizó tres veces. Después del último lavado con éter, el péptido se dejó secar al aire para eliminar el éter residual.

El péptido se disolvió en acetonitrilo al 10% y se analizó mediante espectrometría de masas y HPLC de fase inversa empleando una columna C18 de 30 x 4,6 cm (Vydac, Hesperia, CA, EE. UU.) con un gradiente de 2 - 60% de acetonitrilo (TFA al 0,1%) durante 30 minutos. Este análisis identificó un producto con ~53% de pureza. El análisis de masas que emplea ionización por electropulverización identificó un producto principal que contiene una masa de 1118,4 correspondiente al producto lineal deseado. El producto crudo (~ 100 mg) se diluyó hasta una concentración de 2 mg/mL en ácido acético al 5%. A esta solución, se añadió yodo 0,5 M/metanol gota a gota con agitación vigorosa hasta que se consiguió un color amarillo pálido. La solución se agitó vigorosamente durante otros 10 minutos. El yodo en exceso se apagó después añadiendo tiosulfato sódico 1,0 M bajo mezcla continua hasta que la mezcla se volvió incolora. El péptido se volvió a examinar mediante análisis de espectrometría de masas y HPLC. El análisis de espectrometría de masas identificó una especie principal con una masa de 1116,4 que indicaba una

oxidación con éxito para formar el péptido cíclico. La solución de péptido se purificó en una HPLC preparativa equipada con una columna C18 usando un gradiente de elución similar. El producto purificado se analizó de nuevo mediante HPLC para pureza (> 95%) y espectrometría de masas (1116,9 que concuerda con la masa esperada de 1117,3), y a continuación se liofilizó. Después de la liofilización, se obtuvieron 28 mg de producto purificado, lo que representa un rendimiento del 24%.

Los otros péptidos ejemplificados se sintetizaron sustancialmente de acuerdo con el procedimiento descrito para el proceso de síntesis anteriormente descrito. Los datos físicos para los péptidos seleccionados a modo de ejemplo se dan en la Tabla 1.

Tabla 1

Número de Ejemplo	Peso molec. (calculado)	Peso molec. (ES-MS)	Pureza (HPLC)
1	1117,3	1116,9	95,1%
2	1117,3	1116,8	99,2%
3	1280,5	1280,6	98,0%
5	1216,37	1216,20	99,9%

• Preparación de sal pamoato del Ejemplo 1.

La sal acetato del Ejemplo 1 (200 mg, 0,18 mmol) se disolvió en 10 mL de agua. El pamoato sódico (155 mg, 0,36 mmol) se disolvió en 10 mL de agua. Las dos soluciones se combinaron y se mezclaron bien. Los precipitados se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, se lavaron tres veces con agua y se secaron por liofilización.

Estudios *in Vitro*.

Los compuestos de la presente invención fueron ensayados en cuanto a su actividad como ligandos de uno o más de los receptores de melanocortina de acuerdo con los procedimientos que siguen. Un experto en la técnica sabrá que pueden usarse procedimientos similares a los descritos en el presente texto para ensayar las actividades de unión de los compuestos de la invención a moléculas receptoras de melanocortina.

• Ensayo de unión de radioligando

Las membranas celulares usadas para los ensayos de unión al receptor *in vitro* se obtuvieron a partir de células CHO-K1 transgénicas que expresan establemente los subtipos 1, 3, 4 o 5 del receptor hMC-R. Las células CHO-K1 que expresan el tipo de receptor hMC-R deseado fueron tratadas con ultrasonidos (Branson®, CT, EE.UU.; ajuste 7, aproximadamente 30 segundos) en Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo a pH 7,4 y luego se centrifugaron a 39.000 g durante 10 minutos a una temperatura de aproximadamente 4 °C. Los sedimentos fueron resuspendidos en el mismo tampón y se centrifugaron a 50.000 g durante 10 minutos a una temperatura de aproximadamente 4 °C. Los sedimentos lavados que contienen las membranas celulares se almacenaron a aproximadamente -80 °C.

La inhibición competitiva de la unión de [¹²⁵I] (Tyr²)-(Nle⁴-D-Phe⁷)α-MSH([¹²⁵I]-NDP-α-MSH; Amersham Biosciences®, Piscataway, NJ, EE. UU.) se llevó a cabo en placas de polipropileno de 96 pocillos. Las membranas celulares (1-10 µg de proteína/pocillo), preparadas como se describió anteriormente, se incubaron en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, que contenía 0,2% de BSA, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM y 0,1 mg/mL de bacitracina, con concentraciones crecientes del compuesto de ensayo y [¹²⁵I]-NDP-α-MSH 0,1 - 0,3 nM durante aproximadamente 90 - 120 minutos a aproximadamente 37 °C. El ligando [¹²⁵I]-NDP-α-MSH unido se separó del [¹²⁵I]-NDP-α-MSH libre por filtración a través de placas de filtro de fibra de vidrio GF/C (Unifilter®, Meriden, CT, EE. UU.) previamente empapadas con 0,1% (p/p) de polietilénimina (PEI), usando una recolectora Packard Filtermate® (Millipore, Danvers, MA, EE. UU.). Los filtros se lavaron tres veces con Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 a una temperatura de aproximadamente 0 - 4 °C, y luego se analizó la radioactividad usando un contador de centelleo Packard Topcount® (GMI, Inc., Ramsey, MN, EE. UU.). Los datos de unión fueron analizados mediante análisis de regresión no lineal asistido por ordenador (XL fit, IDBS, Burlington, MA, EE. UU.).

Se probó una selección de las realizaciones preferidas usando el ensayo discutido anteriormente y las constantes de unión (K_i en nM) se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Número de ejemplo	Ki (nM) hMC1-R	Ki (nM) hMC3-R	Ki (nM) hMC4-R	Ki (nM) hMC5-R
1	3,87	10,1	2,09	430
2	4,01	12,1	1,76	352
3	8,53	21,2	3,72	714
5	8,59	94,1	2,44	7760

• *Bioensayo de AMP cíclico.*

- 5 Los niveles de AMP cíclico intracelular (cAMP) se determinaron mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE. UU., denominado en adelante "MSD"). Las células CHO-K1 que expresan de forma estable los subtipos del receptor hMC fueron suspendidas en tampón de ensayo RMPI 1640® (el tampón RMPI 1640 contiene IBMX 0,5 mM, y 0,2% de cóctel de proteína (bloqueador MSD A)). Las células CHO-K1 transgénicas que expresan establemente los subtipos 1, 3, 4 ó 5 del receptor de hMC se dispensaron a una densidad de aproximadamente 7.000 células/pocillo en placas Multi-Array de 384 pocillos (MSD) que contienen electrodos de carbono integrados y se recubrieron con anticuerpo anti-cAMP. Se añadieron concentraciones crecientes de los compuestos de ensayo y las células se incubaron durante aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 37°C. Después de esta incubación, se añadió tampón para lisis (solución salina tamponada con HEPES con MgCl₂ y Triton X-100® a pH 7,3) que contenía 0,2% de cóctel de proteína y cAMP marcado con rutenio TAG™ (MSD) 2,5 nM y las células se incubaron durante aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente. Al final del segundo período de incubación, se añadió tampón de lectura (solución tamponada con Tris que contiene un co-reactivo de ECL y Triton X-100 a pH 7,8) y se determinaron inmediatamente los niveles de cAMP en los lisados celulares mediante la detección de ECL con un lector Sector Imager 6000 reader® (MSD). Los datos se analizaron usando un análisis de regresión no lineal asistido por ordenador (ajuste XL; IDBS) y se presentaron como un valor EC₅₀ o un valor Kb.
- 10
- 15
- 20 EC₅₀ representa la concentración de un compuesto agonista necesario para obtener el 50% de la respuesta de reacción máxima, por ejemplo 50% del nivel máximo de cAMP como se determina usando el ensayo descrito anteriormente. El valor de Kb refleja la potencia de un antagonista y se determina por el análisis de Schild. En resumen, las curvas de concentración-respuesta de un agonista se llevan a cabo en presencia de concentraciones crecientes de un antagonista. El valor de Kb es la concentración de antagonista que produciría un desplazamiento de 2 veces en la curva de concentración-respuesta para un agonista. Se calcula extrapolando a cero en el eje Y la línea en un diagrama de Schild.
- 25

Una selección de compuestos fue ensayada usando los ensayos discutidos anteriormente y los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplo Número	EC ₅₀ hMC1-R	EC ₅₀ hMC3-R	EC ₅₀ hMC4-R	EC ₅₀ hMC5-R
1	5,79	5,25	0,313	1630
2	6,17	5,6	0,397	1020
3	6,42	2,39	0,194	1540
5	8,83	7,86	0,0979	4010

30

Estudios de solubilidad

- Preparación de la formulación de sal pamoato del Ejemplo 1.

- 35 La sal pamoato del Ejemplo 1 (50 mg) se pesó en un tubo de microcentrifuga y a continuación se añadieron 125 µL de PEG400 y 125 µL de agua. La mezcla se sometió a ultrasonidos para facilitar la disolución. Se obtuvo una solución clara.

La solubilidad de la sal acetato del Ejemplo 1 se determinó pesando una cierta cantidad del péptido y disolviéndolo en un volumen apropiado de agua, solución salina o PBS, y los resultados se muestran en la Tabla 4A.

Tabla 4A

Disolvente	Concentración (p/v)	pH	ZnCl ₂	Solubilidad
Agua	10%	7,0	no	soluble
Agua	10%	7,0	1:1 molar	soluble
Agua	20%	7,0	no	soluble
Agua	20%	7,0	1:1 molar	soluble
Agua	50%	7,0	no	soluble
Agua	50%	7,0	1:1 molar	soluble
Agua	70%	7,0	no	soluble
Agua	70%	7,0	1:1 molar	soluble
Agua	90%	7,0	no	soluble
Agua	90%	7,0	1:1 molar	soluble
Agua	50%	8,0	no	soluble
Sol. salina	50%	7,0	no	soluble
Sol. salina	50%	7,0	1:1 molar	soluble
Sol. salina	50%	8,0	no	soluble
PBS	50%	7,0	no	soluble
PBS	50%	7,0	1:1 molar	soluble
PBS	50%	8,0	no	soluble

- 5 La solubilidad de la sal pamoato del Ejemplo 1 se determinó mezclando el péptido en agua o PBS, seguido de la determinación por HPLC de la concentración en el sobrenadante, y los resultados se muestran en la Tabla 4B.

Tabla 4B

Solubilidad de	agua, pH 7,0	PBS, pH 7,4
Sal pamoato del Ejemplo 1	0,06 mg/mL	0,21 mg/mL
Sal pamoato del Ejemplo 1 con Zn	0,05 mg/mL	0,12 mg/mL

• Estudios farmacocinéticos de formulaciones de sales de ácidos grasos del Ejemplo 1 en

- 10 Se prepararon las siguientes "Formulaciones 1 - 6" del Ejemplo 1:

(1) "Formulación 1": sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en una solución de 50% de PEG400 y 50% de agua (v/v), a una concentración de 200 mg/mL (20% p/v).

(2) "Formulación 2": sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en una solución de 50% de PEG200 y 50% de agua (v/v), a una concentración de 200 mg/mL (20% p/v).

- 15 (3) "Formulación 3": sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en una solución de 50% de PEG400 y 50% de PBS (v/v), a una concentración de 300 mg/mL (30% p/v).

(4) "Formulación 4": sal pamoato del Ejemplo 1 disuelta en una solución de 50% de PEG400 y 50% de solución salina (v/v), a una concentración de 300 mg/mL (30% p/v).

(5) "Formulación 5": la sal acetato del Ejemplo 1 disuelta en una solución salina / 2% de suero de ratón inactivado por calor / DMA al 5% / solución de Tween-80 al 2%.

• Dosificación

5 Para las Formulaciones 1 y 2, se administró a ratas Sprague-Dawley mediante inyección subcutánea una cantidad fija de 5 µL/rata o 1,0 mg/rata, o una cantidad variable de 2,5 mg/kg de peso corporal.

Para las formulaciones 3 y 4, se administró a ratas Sprague-Dawley mediante inyección subcutánea una cantidad fija de 5 µL/rata o 1,5 mg/rata, o una cantidad variable de 3,75 mg/kg de peso corporal,

Para la Formulación 5, se administró a ratas Sprague-Dawley mediante inyección subcutánea una cantidad variable de 0,5 mg/kg de peso corporal.

10 • Preparación de la muestra.

Para las Formulaciones 1 y 2, se acidificaron 100 µL de plasma con 5 µL de ácido fórmico y se precipitaron con 300 µL de acetonitrilo. El sobrenadante se recogió por centrifugación y se secó mediante un concentrador centrífugo bajo vacío *speed-vac*. El sedimento seco se disolvió en 100 µL de agua, que luego se centrifugó. Se inyectaron 50 µL del preparado para el análisis por LC-MS/MS.

15 Para las Formulaciones 3 y 4, se acidificaron 200 µL de plasma con 10 µL de ácido fórmico y se precipitaron con 600 µL de acetonitrilo. El sobrenadante se recogió por centrifugación y se secó mediante *speed-vac*. El sedimento seco se disolvió en 150 µL de agua que luego se centrifugó. Se inyectaron 50 µL del preparado para el análisis por LC-MS/MS.

20 Para la Formulación 5, se acidificaron 200 µL de plasma con 10 µL de ácido fórmico y se precipitaron con 600 µL de acetonitrilo. El sobrenadante se recogió por centrifugación y se secó mediante *speed-vac*. El sedimento seco se disolvió en 150 µL de acetonitrilo al 30%, que luego se centrifugó. Se inyectaron 50 µL del preparado para el análisis por LC-MS/MS.

• Análisis por LC-MS/MS.

25 Para las formulaciones 1 y 2, se realizó el análisis de LC-MS/MS con un sistema de espectrómetro de masas API4000 equipado con una sonda Turbo Ionspray. Se utilizó el modo MRM de detección de iones moleculares con un par iónico de 559,5 y 110,1. La separación por HPLC se realizó con una columna Luna C8 (2) de 2 x 30 mm 3 µ que funciona de 0% de B a 80% de B en 10 minutos a un caudal de 0,3 mL/minuto. El tampón A es ácido fórmico al 1% en agua y el tampón B es ácido fórmico al 1% en acetonitrilo. El LOQ era 5 ng/mL.

30 Para las formulaciones 3 y 4, se realizó el análisis de LC-MS/MS con un sistema de espectrómetro de masas API4000 equipado con una sonda Turbo Ionspray. Se utilizó el modo MRM de detección de iones moleculares con un par iónico de 559,5 y 110,1. La separación por HPLC se realizó con una columna Luna C8 (2) de 2 x 30 mm 3 µ que funciona de 0% de B a 80% de B en 10 minutos a un caudal de 0,3 mL/minuto. El tampón A es ácido fórmico al 1% en agua y el tampón B es ácido fórmico al 1% en acetonitrilo. El LOQ era 2 ng/mL.

35 Para la formulación 5, se llevó a cabo el análisis de LC-MS/MS con un sistema de espectrómetro de masas API4000 equipado con una sonda Turbo Ionspray. Se utilizó el modo MRM de detección de iones moleculares con un par iónico de 559,5 y 110,1. La separación por HPLC se realizó con una columna Luna C8 (2) de 2 x 30 mm 3 µ que funciona de 0% de B a 80% de B en 10 minutos a un caudal de 0,3 mL/minuto. El tampón A es ácido fórmico al 1% en agua y el tampón B es ácido fórmico al 1% en acetonitrilo. El LOQ era 1 ng/mL.

Resultados y sumario.

40 Las concentraciones en plasma del Ejemplo 1, dosificadas con las Formulaciones 1 - 5, se calcularon con su gráfica de calibración estándar y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Tiempo	Concentración de plasma (ng/mL) del Ejemplo 1 dosificado con la formulación 1	Concentración de plasma (ng/mL) del Ejemplo 1 dosificado con la formulación 2	Concentración de plasma (ng/mL) del Ejemplo 1 dosificado con la formulación 3	Concentración de plasma (ng/mL) del Ejemplo 1 dosificado con la formulación 4	Concentración de plasma (ng/mL) del Ejemplo 1 dosificado con la formulación 5
5 minutos	55,35	84,40	44,1	56,0	83,8
10 minutos	57,05	153,50	69,5	84,0	200,7

ES 2 654 147 T3

15 minutos	83,65	187,50	94,7	109,0	245,0
30 minutos	94,80	212,00	165,0	150,7	298,3
1 hora	123,00	237,00	N/A	193,0	292,0
2 horas	127,00	304,50	559,7	269,0	160,7
3 horas	N/A	N/A	N/A	N/A	72,4
4 horas	182,50	420,00	768,3	644,5	38,4
5 horas	N/A	N/A	N/A	N/A	16,6
8 horas	135,00	235,50	478,7	495,0	N/A
12 horas	71,30	86,00	239,0	167,5	N/A
16 horas	42,85	42,25	142,5	181,0	N/A
20 horas	24,30	31,60	112,8	68,0	N/A
24 horas	16,50	27,85	86,9	75,9	N/A

Las representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos de la Formulación 1 se muestran en una escala normal en la FIG. 1A, y en una escala logarítmica en la FIG. 1B.

5 Las representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos de la Formulación 2 se muestran en una escala normal en la FIG. 2A, y en una escala logarítmica en la FIG. 2B.

Las representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos de la Formulación 3 se muestran a escala normal en la FIG. 3A, y en una escala logarítmica en la FIG. 3B.

Las representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos de la Formulación 4 se muestran a escala normal en la FIG. 4A, y en una escala logarítmica en la FIG. 4B.

10 Las representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos de la Formulación 5 se muestran a escala normal en la FIG. 5A, y en una escala logarítmica en la FIG. 5B.

15 La FIG. 6A y 6B muestran las mismas representaciones del curso del tiempo completo de los perfiles farmacocinéticos (valores de la mediana) como se muestra en la FIG. 1A a la FIG. 5A en una escala normal, así como en las Figuras 1B a 5B en una escala logarítmica, como una comparación por pares de las diferentes formulaciones usadas en los experimentos como se describe en el presente texto.

Algunos parámetros farmacocinéticos del Ejemplo 1, dosificado con las Formulaciones 1-5 se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

	Ejemplo 1 dosificado con la formulación 1	Ejemplo 1 dosificado con la formulación 2	Ejemplo 1 dosificado con la formulación 3	Ejemplo 1 dosificado con la formulación 4	Ejemplo 1 dosificado con la formulación 5
Dosis (mg/kg)	2,5	2,5	3,75	3,75	0,5
T _{max} (horas)	4	4	4	4	1
C _{max} (ng/mL)	182	420	768	644	290
AUC (ng-h/mL)	2141	3873	7519	6366	697
CL (mL/hora)	934	516	465	549	716
T _{1/2} (horas)	5,3	5,3	6,6	6,1	0,94

- Los resultados indican que las formulaciones del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención, como se describe en el presente texto, proporcionan formulaciones de liberación sostenida aceptables con parámetros farmacocinéticos mejorados y perfiles de liberación más planos, que pueden dar como resultado la atenuación de los efectos secundarios y una mejor eficacia. Por ejemplo, se muestra que la Formulación 1 tiene un perfil de liberación de aproximadamente 24 horas después de una única inyección subcutánea, con C_{max} significativamente baja y T_{max} larga. Además, todas las formulaciones de sal pamoato del Ejemplo 1, es decir, las Formulaciones 1 a 4, muestran un valor de $T_{1/2}$ significativamente aumentado en comparación con la formulación de sal de acetato del Ejemplo 1, es decir, la Formulación 5, como se muestra en la Tabla 6.
- Formas de realización adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción anterior, y se pretende que estén comprendidas en la invención como se describe completamente en el presente texto y se define en las reivindicaciones que siguen.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de una solución, un gel o un semisólido, o una suspensión, que comprende una sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂,
 5 en la que la sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución acuosa de PEG200 o PEG400, en donde la solución acuosa comprende una relación volumen a volumen de PEG a agua de 1:99 a 99:1,
 en la que Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ forma un depósito después de la administración subcutánea o intramuscular a un sujeto.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la solución acuosa comprende una
 10 relación en volumen de PEG a agua de 1:9 a 1:1.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la concentración en peso a volumen de la sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ está entre 0,1 mg/mL y 600 mg/mL.
4. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de
 15 dicha composición está entre 3,0 y 8,0.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que dicha sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución acuosa de PEG400, en donde la relación en volumen de PEG400 a agua es de 1:1 y la concentración del péptido en peso a volumen es de 200 mg/mL.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que dicha sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-
 20 Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución acuosa de PEG200 en la que la relación en volumen de PEG200 a agua es de 1:1 y la concentración del péptido en peso a volumen es de 200 mg/mL.
7. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que dicha sal pamoato de Ac-Arg-ciclo (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución de PEG400/PBS en la que la relación en volumen de PEG400 a PBS es de 1:1 y la concentración del péptido en peso a volumen es de 300 mg/mL.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que dicha sal de pamoato de Ac-Arg-ciclo
 25 (Cys-D-Ala-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys)-NH₂ se disuelve en una solución de PEG400/solución salina, en la que la relación en volumen de PEG400 a solución salina es de 1:1 y la concentración del péptido en peso a volumen es de aproximadamente 300 mg/mL.
9. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende
 30 además un conservante, un agente isotónico, un estabilizante, un tensioactivo, un agente quelante, un tampón o un ion de metal divalente, o cualquier combinación de los mismos.
10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que:
 dicho conservante se elige entre el grupo que consiste en m-cresol, fenol, alcohol bencílico y metilparabeno, y está presente en una concentración de 0,01 mg/mL a 100 mg/mL;
 35 dicho agente isotónico está presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 100 mg/ml;
 dicho estabilizante se elige entre el grupo que consiste en imidazol, arginina e histidina;
 dicho tampón se elige entre el grupo que consiste en Tris, acetato amónico, acetato sódico, glicina, ácido aspártico y Bis-Tris; o
 dicho metal divalente es zinc;
 40 o cualquier combinación de los mismos.

FIG. 1A

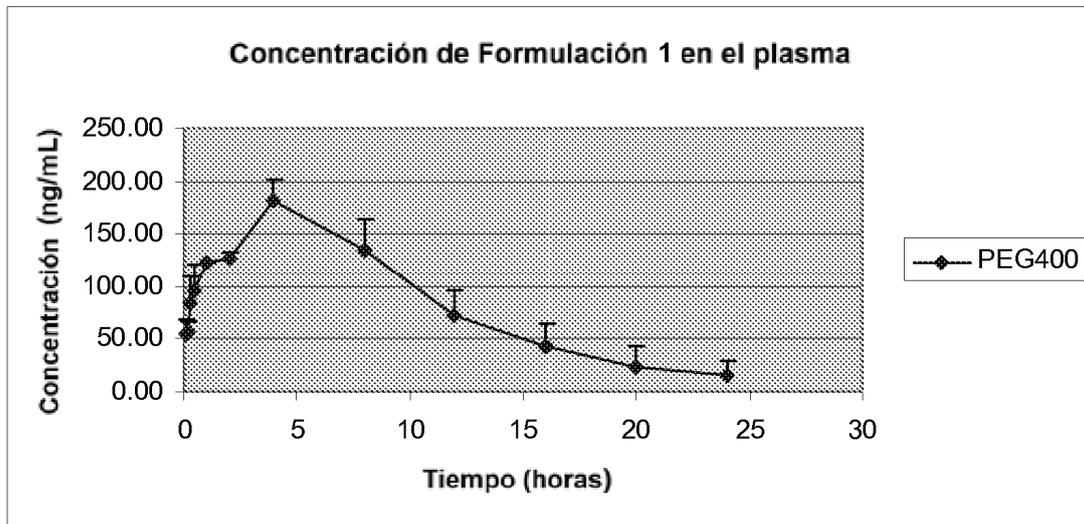


FIG. 1B

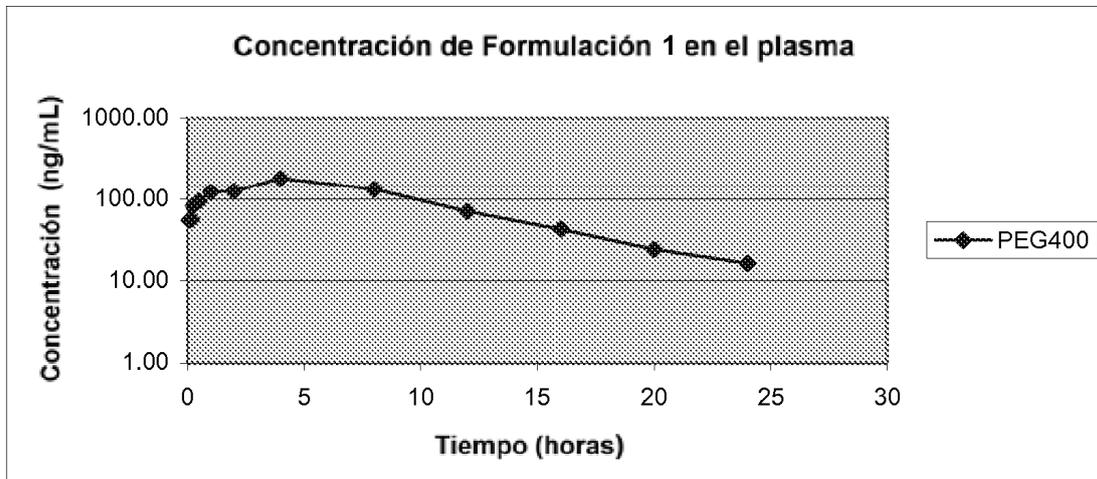


FIG. 2A

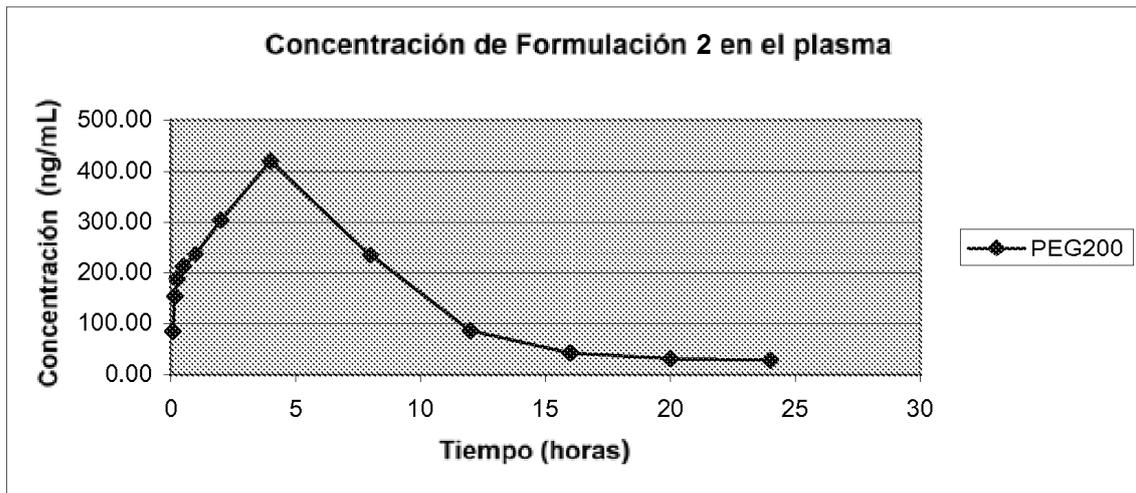


FIG. 2B

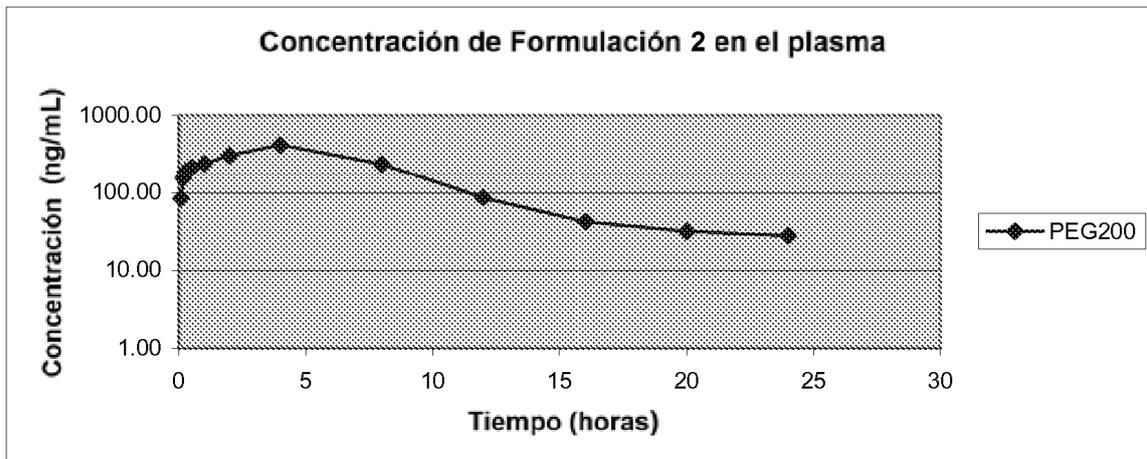


FIG. 3A

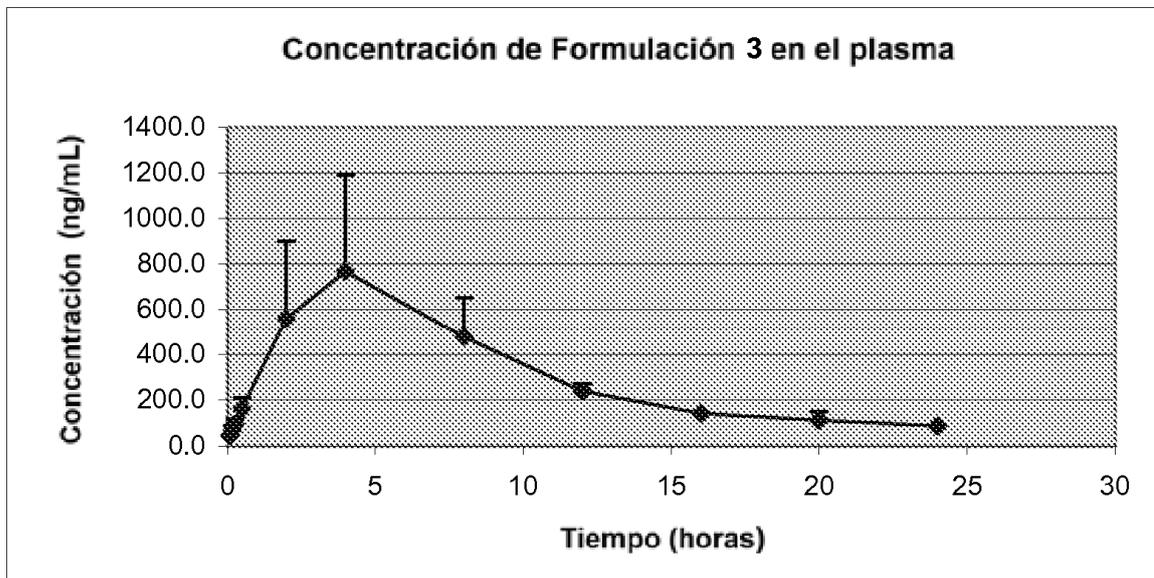


FIG. 3B

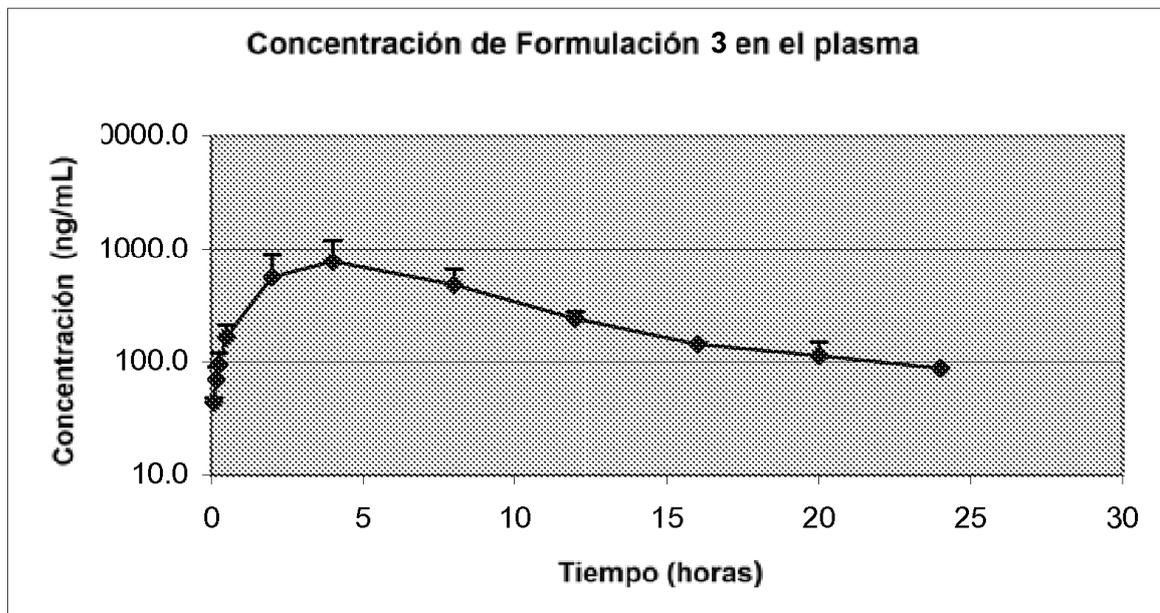


FIG. 4A

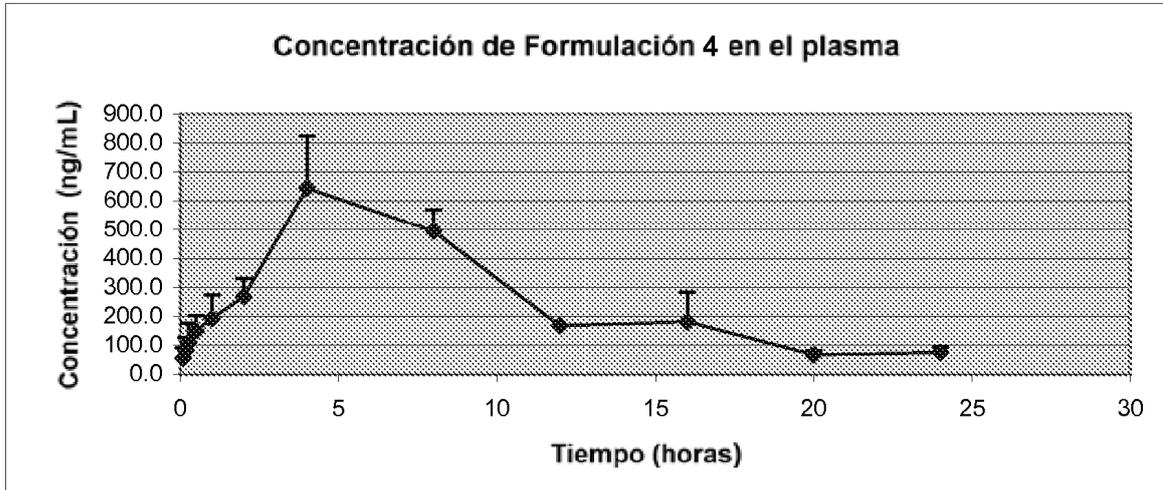


FIG. 4B

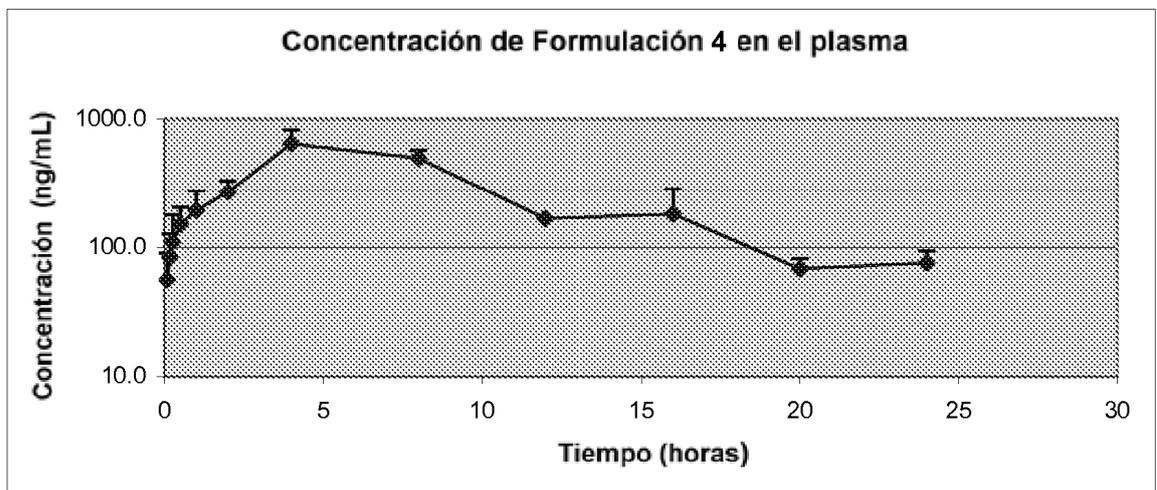


FIG. 5A

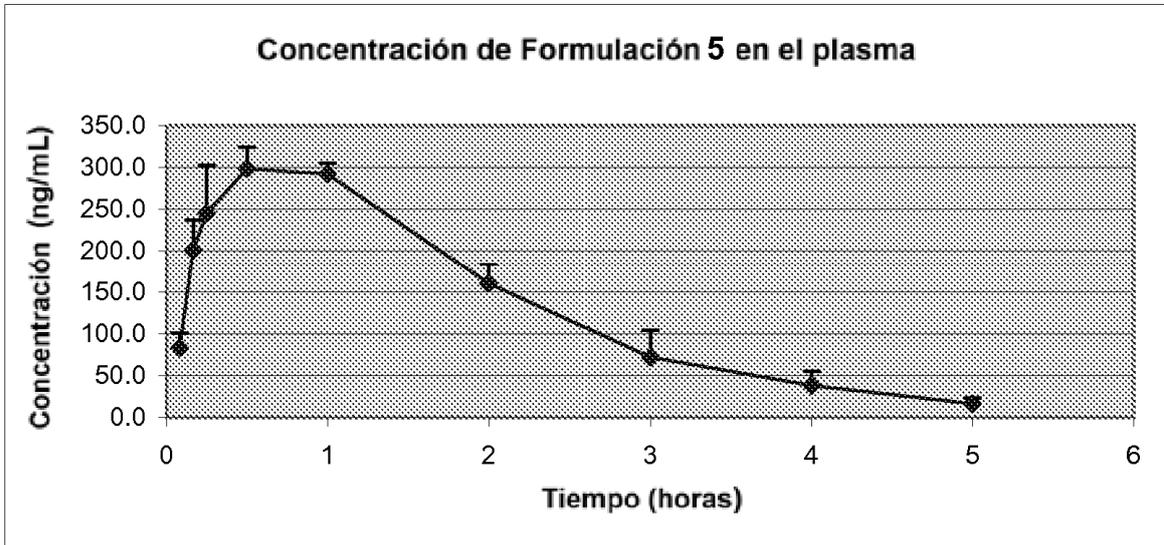


FIG. 5B

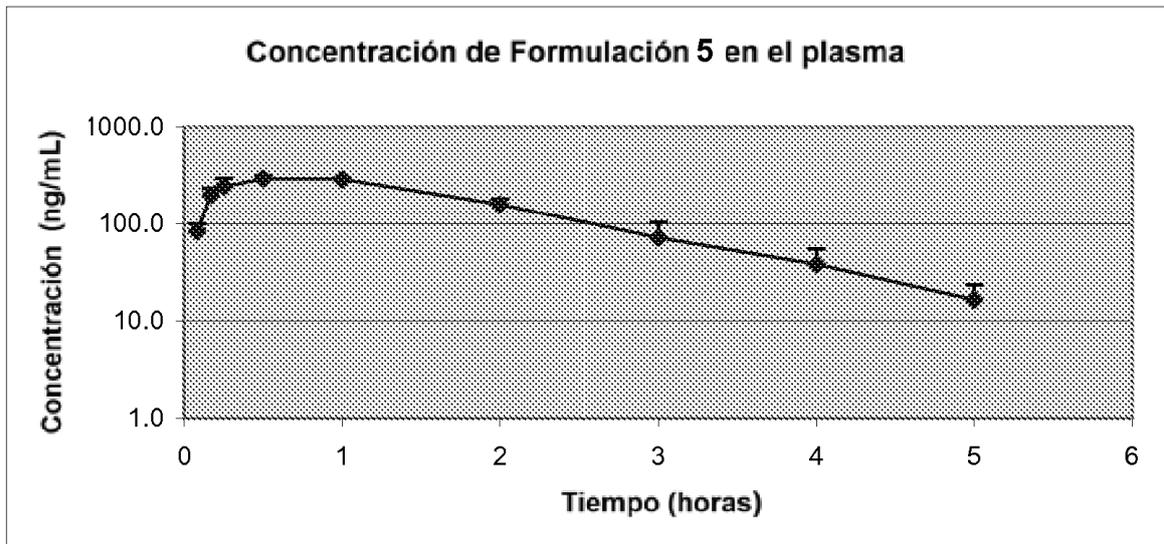


FIG. 6A

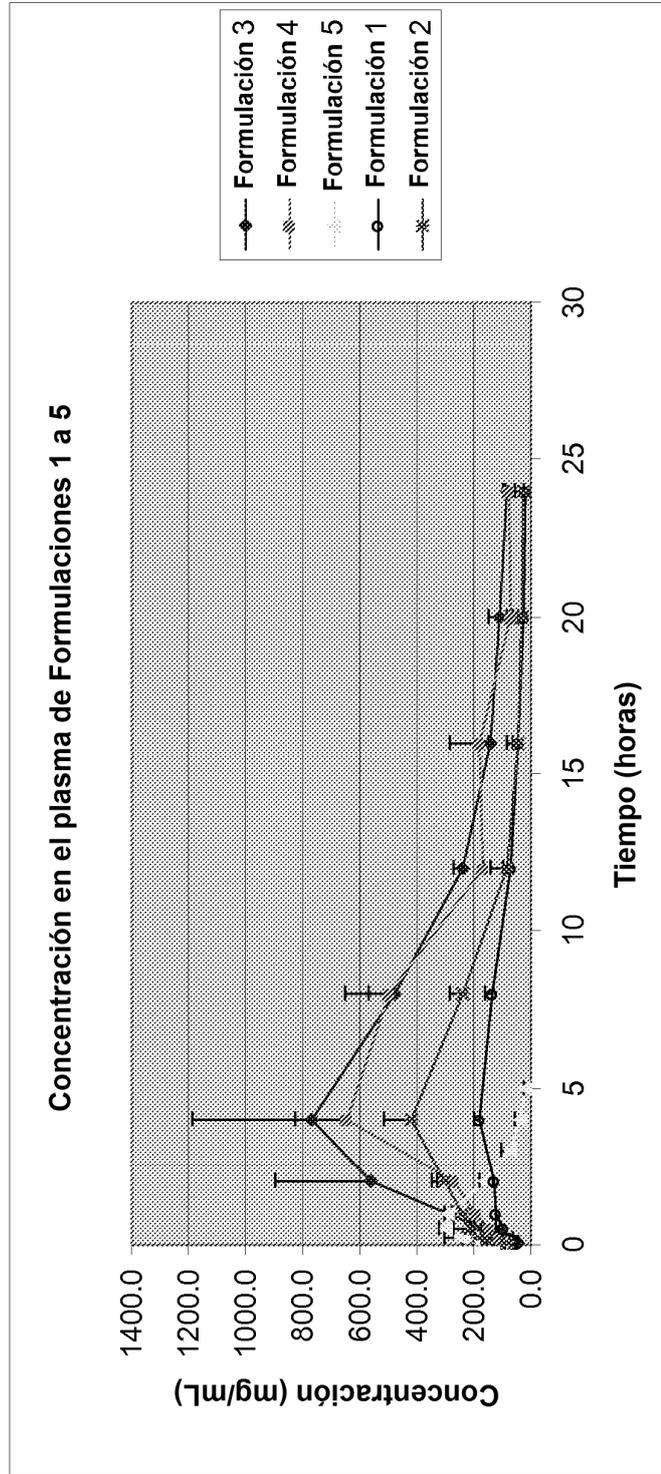


FIG. 6B

