



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104945** (13) **C2**  
(51) МПК  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61P 5/06** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2012 11831</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Дун Чжен Сінь (US), Чжан Цзюньдун (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>14.03.2011</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ІПСЕН ФАРМА С.А.С., 65, quai Georges Gorse, F-92100 Boulogne- Billancourt, France (FR)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.03.2014</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/340,290</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>US 2006/039862 A1, 23.02.2006 US 2005/0148515 A1, 07.07.2005 US 2008/0171700 A1, 17.07.2008</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>15.03.2010</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>10.12.2012, Бюл.№ 23</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.03.2014, Бюл.№ 6</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2011/028283, 14.03.2011</b>		

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ЛІГАНДІВ РЕЦЕПТОРІВ СЕКРЕТАГОГІВ ГОРМОНУ РОСТУ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується фармацевтичної композиції прозорого розчину, гелю або напівтвердої речовини, або суспензії, яка містить пептид відповідно до структури H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub>, який діє як ліганд рецептора GHS, або його фармацевтично прийнятну сіль, в якій даний пептид утворює депо in situ після підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції суб'єкту, де фармацевтична композиція додатково містить ПЕГ і вказаний пептид знаходиться у вигляді памоатної солі.

UA 104945 C2



Попередній рівень техніки

Даний винахід стосується удосконалень композицій, які містять пептиди, які є лігандами рецепторів секретогогів гормону росту (GHS), або їх фармацевтично прийнятні солі, способів отримання подібних композицій, і способів застосування подібних композицій для лікування ссавців. Зокрема, даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить памоатну сіль N-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arg-NH<sub>2</sub>, яка є лігандом рецептора GHS, і в якій, після підшкірного або внутрішньом'язового введення суб'єкту, білок утворює при фізіологічному значенні pH in situ депо, яке повільно розчиняється, і вивільняється в рідину тіла і кровотік. Крім того, даний винахід може також включати в себе органічний компонент, такий як диметилацетамід (DMA) або поліетиленгліколь середньої молекулярної маси менше 1000.

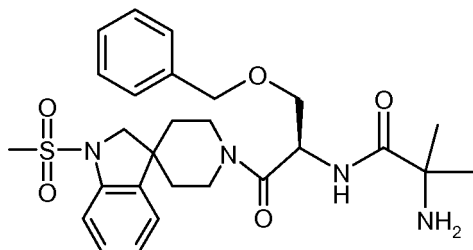
Пулсуюче вивільнення гормону росту з гіпофізарних соматотрофних клітин регулюється двома гіпоталамічними нейропептидами: гормоном, який вивільняє гормон росту, і соматостатином. Гормон, який вивільняє гормон росту, стимулює вивільнення гормону росту, тоді як соматостатин придушує секрецію гормону росту. (Frohman et al., *Endocr. Rev.* 1986, 7, 223-253, and Strobel et al., *Pharmacol. Rev.* 1994, 46, 1-34.)

Вивільнення гормону росту з гіпофізарних соматотрофних клітин може також регулюватися пептидами, які вивільняють гормон росту (GHRP's). Було знайдено, що гексапептид His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-амід (GHRP-6) вивільняє гормон росту з гіпофізарних соматотрофних клітин залежним від дози способом у декількох видів, включаючи людину. (Bowers et al., *Endocrinology* 1984, 114, 1537-1545). Подальші хімічні дослідження GHRP-6 привели до ідентифікації інших ефективних секретогогів гормонів росту, таких як GHRP-1, GHRP-2 і гексарелін (Cheng et al., *Endocrinology* 1989, 124, 2791-2798, Bowers, C. Y. *Novel GH-Releasing Peptides*. In: *Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders*. Ed: Melmed, S.; Endocrine Research and Education, Inc., Los Angeles, CA, USA 1993, 153-157, and Deghenghi et al. *Life Sci.* 1994, 54, 1321-1328):

GHRP-1	Ala-His-D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
GHRP-2	D-Ala-D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Nal-Lys-NH <sub>2</sub>
Гексарелін	His-D-2-MeTrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>

GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6 і гексарелін являють собою синтетичні секретогоги гормону росту (GHS's). GHS's стимулюють секрецію гормону росту за механізмом, який відрізняється від механізму у випадку гормону, який вивільняє гормон росту. (Bowers et al., *Endocrinology* 1984, 114, 1537-1545, Cheng et al. *Endocrinology* 1989, 124, 2791-2798, Bowers, C. Y. *Novel GH-Releasing Peptides*. In: *Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders*. Ed: Melmed, S.; Endocrine Research and Education, Inc., Los Angeles, CA, USA 1993, 153-157, and Deghenghi et al., *Life Sci.* 1994, 54, 1321-1328).

Низька пероральна біодоступність (<1%) пептидильних секретогогів гормону росту стимулює пошук не-пептидних сполук, міметичних дію GHRP-6 в гіпофізі. Повідомлялося, що декілька бензолактамів і спіроінданів стимулюють вивільнення гормону росту у різних видів тварин і у людини. (Smith et al., *Science* 1993, 260, 1640-1643, Patchett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92, 7001-7005, and Chen et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 2163-2169.) Конкретним прикладом малого спіроіндану є MK-0677 (Patchett et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92, 7001-7005).



Ймовірно, дія згаданих вище GHS's (як пептидних, так і не-пептидних) опосередковується певним рецептором секретогогів гормону росту (рецептором GHS). (Howard et al., *Science* 1996, 273, 974-977, and Pong et al, *Molecular Endocrinology* 1996, 10, 57-61.) Даний рецептор присутній в гіпофізі і гіпоталамусі різних видів ссавців (GHSR1a) і відрізняється від рецептора гормону, який вивільняє гормон росту (GHRH). Рецептор GHS був також виявлений в інших ділянках центральної нервової системи і в периферичних тканинах, наприклад, в наднирковій і щитовидній залозах, серці, легенях, нирках і скелетних м'язах. (Chen et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 2163-2169, Howard et al, *Science* 1996, 273, 974-977, Pong et al, *Molecular*

Endocrinology 1996, 10, 57-61, Guan et al, Mol. Brain Res. 1997, 48, 23-29, and McKee et al., Genomics 1997, 46, 426-434.) Повідомлялося про процесований варіант GHSR1a (Howard et al., Science 1996, 273, 974-977).

Рецептор GHS являє собою рецептор, зв'язаний з G-білком. Ефекти активації рецепторів GHS включають в себе деполяризація і інгібування калієвих каналів, підвищення міжклітинних концентрацій трифосфату інозиту (IP3) і короткочасне підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію. (Pong et al., Molecular Endocrinology 1996, 10, 57-61, Guan et al., Mol. Brain Res. 1997, 48, 23-29, and McKee et al., Genomics 1997, 46, 426-434.)

Грелін являє собою існуючий в природі пептид, який, приблизно, є ендogenous лiгандом для рецептора GHS (Kojima et al., Nature 1999, 402, 656-660). Відомі природні структури грелінів декількох видів ссавців і тварин які не є ссавцями. (Kaiya et al., J. Biol. Chem. 2001, 276, 40441-40448; International Patent Application PCT/JP00/04907 (WO 01/07475). Було знайдено, що ділянка ядра, яка є в греліні, забезпечує активність для рецептора GHS. Дана ділянка ядра включає в себе чотири N-термінальних амінокислоти, де серин в 3 положенні нормальним чином модифікований n-октановою кислотою. Крім того, було помічено, що крім ацилування n-октановою кислотою, нативний грелін ацилується n-декановою кислотою (Kaiya et al., J. Biol. Chem. 2001, 276, 40441-40448). Аналоги греліну мають ряд різних терапевтичних застосувань, а також застосування як інструменти досліджень.

Суть винаходу

У даному винаході наданий склад фармацевтичної композиції, яка містить памоатну сіль пептиду, діючого як лiганду рецептора GHS. Особливо переважний наступний пептид, який називається далі «Приклад 1»: H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub>, який є лiгандом рецептора GHS, у випадку якого після підшкірного або внутрішньом'язового введення суб'єкту, даний пептид утворює осад при фізіологічному значенні pH, який повільно розчиняється і який вивільняється в рідину тіла і кровотік, приводячи, таким чином, до знижених побічних дій і підвищеної ефективності.

Даний винахід можна резюмувати у вигляді наступних, приведених далі пунктів, а також формулою винаходу.

(1) За одним з аспектів даний винахід направлений на фармацевтичну композицію, яка має вигляд прозорого розчину, гелю або напівтвердої речовини, або суспензії, яка містить пептид, який діє як лiганд рецептора GHS, або його фармацевтичну сіль, в якій даний пептид утворює осад після підшкірного або внутрішньом'язового введення суб'єкту.

(2) Фармацевтична композиція за пунктом 1, в якій вказаний пептид у вказаному прозорому розчині осаджується in vivo, утворюючи in situ депо, яке повільно розчиняється і вивільняється в рідину тіла і кровотік, і в якій вказаний прозорий розчин являє собою виключно водний розчин, або водний розчин, який містить органічний компонент.

(3) Фармацевтична композиція за пунктом 1 або пунктом 2, в якій вказаний пептид являє собою приклад 1, тобто H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub>.

(4) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, в якій вказаний пептид знаходиться у вигляді памоатної солі.

(5) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка містить також органічний компонент, який підвищує розчинність вказаного пептиду у водному розчині, або яка знижує в'язкість гелю або напівтвердої речовини.

(6) Фармацевтична композиція за пунктом 5, в якій вказаний органічний компонент являє собою органічний полімер, спирт, ДМСО, ДМФА або ДМА.

(7) Фармацевтична композиція за пунктом 6, в якій вказаний органічний полімер являє собою ПЕГ.

(8) Фармацевтична композиція за пунктом 7, в якій вказаний ПЕГ має середню молекулярну масу від близько 200 до близько 10000.

(9) Фармацевтична композиція за пунктом 8, в якій вказаний пептид розчиняють у водному розчині ПЕГ200 або ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ і води складає від близько 1:99 до близько 99:1.

(10) Фармацевтична композиція за пунктом 9, в якій вказаний пептид розчиняють у водному розчині ПЕГ200 або ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ і води складає від близько 1:9 до близько 1:1.

(11) Фармацевтична композиція за пунктом 6, в якій вказаний спирт являє собою етанол або ізопропіловий спирт.

(12) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, в якій концентрація маса-до-об'єму вказаного пептиду знаходиться в інтервалі від близько 0,1 мг/мл до близько 600 мг/мл.

(13) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, в якій рН вказаної композиції знаходиться в інтервалі від близько 3,0 до близько 8,0.

(14) Фармацевтична композиція за пунктом 13, в якій вказану памоатну сіль H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub> розчиняють у водному розчині ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і води становить приблизно 1:1, і в якому концентрація маса-до-об'єму даного пептиду становить приблизно 200 мг/мл.

(15) Фармацевтична композиція за пунктом 13, в якій вказану памоатну сіль H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub> розчиняють у водному розчині ПЕГ200, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ200 і води становить приблизно 1:1, і в якому концентрація маса-до-об'єму даного пептиду становить приблизно 200 мг/мл.

(16) Фармацевтична композиція за пунктом 13, в якій вказану памоатну сіль H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub> розчиняють в розчині ПЕГ400/PBS, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і PBS становить приблизно 1:1, і в якому концентрація маса-до-об'єму даного пептиду становить приблизно 300 мг/мл.

(17) Фармацевтична композиція за пунктом 13, в якій вказану памоатну сіль H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub> розчиняють в соляному розчині ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і соляного розчину становить приблизно 1:1, і в якому концентрація маса-до-об'єму даного пептиду становить приблизно 300 мг/мл.

(18) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка містить також консервант.

(19) Фармацевтична композиція за пунктом 18, в якій вказаний консервант вибирають з групи, яка включає м-крезол, фенол, бензиловий спирт і метилпарабен.

(20) Фармацевтична композиція за пунктом 19, в якій вказаний консервант присутній в концентрації, яка складає від близько 0,01 мг/мл до близько 100 мг/мл.

(21) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка також містить ізотонічний агент.

(22) Фармацевтична композиція за пунктом 21, в якій вказаний ізотонічний агент присутній в концентрації, яка складає від близько 0,01 мг/мл до близько 100 мг/мл.

(23) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить стабілізатор.

(24) Фармацевтична композиція за пунктом 23, в якій вказаний стабілізатор вибирають з групи, яка включає імідазол, аргінін і гістидин.

(25) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить поверхнево-активну речовину.

(26) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить хелатуючий агент.

(27) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить буферний розчин.

(28) Фармацевтична композиція за пунктом 27, в якій вказаний буферний розчин вибирають з групи, яка включає Tris, ацетат амонію, ацетат натрію, гліцин, аспарагінову кислоту і Bis-Tris.

(29) Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить двовалентний метал.

(30) Фармацевтична композиція за пунктом 29, в якій вказаний двовалентний метал являє собою цинк.

Незважаючи на те, що переважний варіант здійснення даного винаходу направлений на приклад 1, тобто H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH<sub>2</sub>, який є лігандом рецептора GHS, даний винахід ніяким чином не обмежений прикладом 1. Пептиди даного винаходу включають в себе, наприклад, всі ті пептиди, які діють як ліганди рецептора GHS, як описано у власній попередній міжнародній публікації заявників, опублікованій як WO2004/014415, зміст якої включений в даний опис посиланням у всій її повноті.

Для складання фармацевтичних композицій даного винаходу можна також переважно використовувати наступні сполуки з даних публікацій:

Приклад 2: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 3: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 4: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 5: H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 6: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 7: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 8: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH<sub>2</sub>;

Приклад 9: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH<sub>2</sub>;

- Приклад 10: H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 11: H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 12: H-Inp-D-2Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 13: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-NH<sub>2</sub>;  
 5 Приклад 14: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 15: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 16: H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 17: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 18: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-NH<sub>2</sub>;  
 10 Приклад 19: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 20: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 21: H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 22: H-Inp-D-2Nal-D-Dip-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 23: H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 15 Приклад 24: H-Inp-D-2Nal-D-Bal-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 25: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 26: H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 27: H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 28: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 20 Приклад 29: H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 30: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 31: H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 32: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 33: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH<sub>2</sub>;  
 25 Приклад 34: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 35: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 36: H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 37: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 38: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 30 Приклад 39: H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 40: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 41: H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 42: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 43: H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 35 Приклад 44: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 45: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 46: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 47: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 48: H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 40 Приклад 49: H-Apc-D-1Nal-D-2Nal-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 50: H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 51: H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 52: H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 53: H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 45 Приклад 54: H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 55: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 56: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 57: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 58: H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-NH<sub>2</sub>;  
 50 Приклад 59: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 60: H-Apc-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 61: H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 62: H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 63: H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 55 Приклад 64: H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 65: H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH<sub>2</sub>;  
 Приклад 66: H-Inp-D-2Nal-D-Trp(Ψ)-Pim;  
 Приклад 67: H-Inp-D-1Nal-D-Trp(Ψ)-Pim;  
 Приклад 68: H-Inp-D-Bal-D-Trp(Ψ)-Pim;  
 60 Приклад 69: H-Aib-D-Ser(Bzl)-D-Trp(Ψ)-Pim; and

Приклад 70: H-Inp-D-Trp-D-2Nal(Ψ)-Pim.

Короткий опис креслень

На фіг. 1A і фіг. 1B приведені графіки фармакокінетичених кривих (середніх значень) протягом усього тимчасового інтервалу, отриманих після одноразового підшкірного введення щурам Sprague-Dawley при дозі 2,5 мг/кг маси тіла, препарату, який містить 200 мг/мл (20% мас./об.) памоатної солі прикладу 1, розчиненої в розчиннику, який складається з 50% ПЕГ200 і 50% води (об./об.), у нормальній шкалі і логарифмічній шкалі, відповідно.

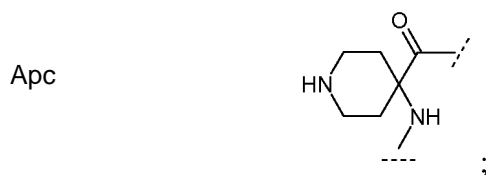
На фіг. 2 приведений графік порівняння різних складів прикладу 1, дозованих шляхом підшкірних ін'єкцій.

10 Докладний опис винаходу

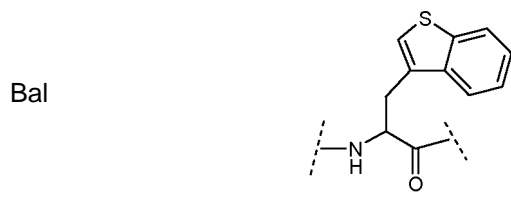
Номенклатура, використана для визначення пептидів в даному винаході, являє собою номенклатуру, яку зазвичай використовують в даній галузі, де аміногрупа в N-кінці присутня зліва, а карбоксильна група в C-кінці присутня праворуч. У випадку, коли амінокислота має ізомерні форми, представлена L-форма амінокислоти, якщо ясно не указано інакше. Якщо вони не визначені інакше, всі технічні і наукові терміни, використані в даному описі, мають ті ж значення, що і зазвичай які розуміються фахівцем стандартної кваліфікації в галузі, якої стосується даний винахід.

У даному описі використані наступні скорочення:

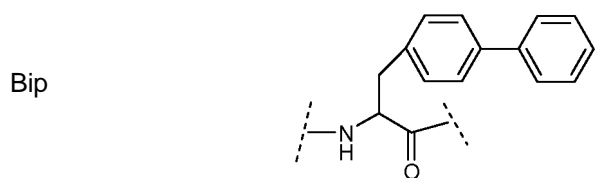
амінопіперидинілкарбонова кислота, тобто



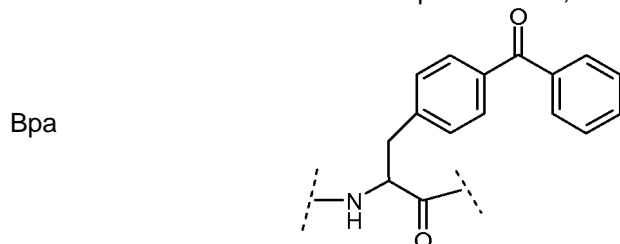
; 3-бензотієнілаланін, тобто



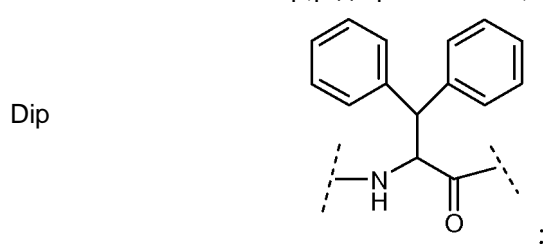
; 4,4'-дифенілаланін, тобто

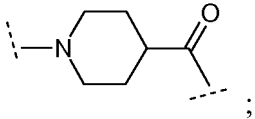
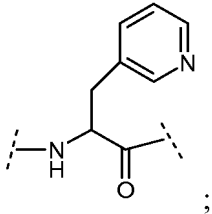
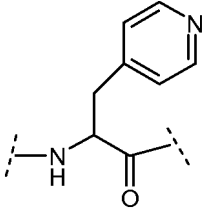
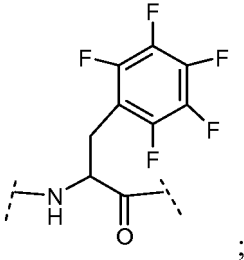
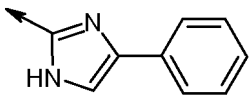
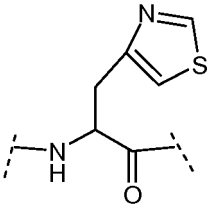
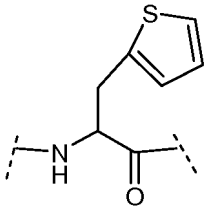


; 4-бензоїлфенілаланін, тобто



; β,β-дифенілаланін, тобто



Inp	ізоніпекотинова кислота, тобто 
Lys або K 1Nal 2Nal Orn	лізин β-(1-нафтил)аланін, β-(2-нафтил)аланін, орнітин β-(3-піридил)аланін, тобто
3Pal	 β-(4-піридил)аланін, тобто
4Pal	 пентафторфенілаланін, тобто
Pff	
Phe або F	фенілаланін 2'-(4-феніл)імідазоліл, тобто
Pim	
Ser або S	серин β-(4-тіазоліл)аланін, тобто
Taz	 β-(2-тієніл)аланін, тобто
2Thi	

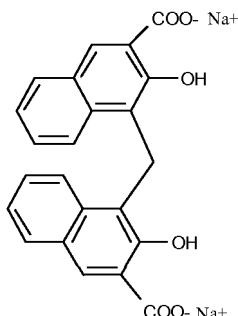


Thr або T                      треонін  
Trp або W                      триптофан

Деякі інші скорочення, використані в даному описі, визначені таким чином:

BSA:                              бичачий сироватковий альбумін  
ДМФА:                          диметилформамід  
ВЕРХ:                            високоефективна рідинна хроматографія  
                                      динатрієва сіль памової кислоти, яка має структуру

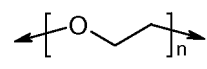
Памоат натрію:



PX-МС:                          рідинна хромато-мас-спектрометрія  
LOQ:                            межа визначення  
MRM:                           багаторазовий моніторинг реакції

ПЕГ:

полі(етиленгліколь), який має структуру



в якій n є цілим числом від 1 до 2000

ПЕГ200:

полі(етиленгліколь) із середньою молекулярною масою приблизно 200 Да

ПЕГ400:

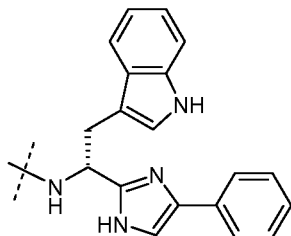
полі(етиленгліколь) із середньою молекулярною масою приблизно 400 Да

Tris-HCl:

гідрохлорид тріс(гідроксиметил)амінометану

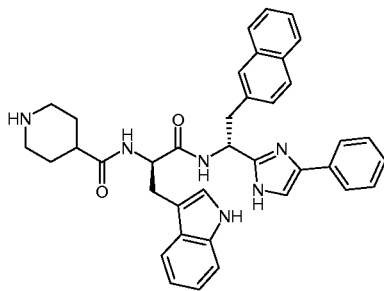
5 Якщо це не очевидне іншим чином, скорочення (наприклад, Ala) амінокислот в даному описі означають структуру  $\text{-NH-C(R)(R')-CO-}$ , в якій кожний з R і R' незалежно являє собою водень, або бічний ланцюг амінокислоти (наприклад,  $\text{R=CH}_3$ , а  $\text{R' = H}$  у випадку Ala), або R і R' можна об'єднати з отриманням циклічної системи.

10 Якщо в С-кінці сполуки даного винаходу присутня неамінокислотна імідазольна група (наприклад, визначений вище Pim), зрозуміло, що дана імідазольна група зв'язана з сусідньою амінокислотою за допомогою псевдо-пептидного зв'язку, де зв'язок утворюється між 2 положеннями імідазольного циклу і альфа-вуглецем амінокислоти. Наприклад, у випадку, коли сусідня амінокислота являє собою D-триптофан (D-Trp), а імідазольна група являє собою Pim, С-термінальний кінець даного пептиду виглядав би таким чином:



15

Для ясності, в написаній формулі для подібної сполуки наявність даного зв'язку вказується однією буквою грецького алфавіту «Ψ» в дужках. Наприклад, написана формула  $\text{H-Inp-D-Trp-S-2NaI(Ψ)-Pim}$  означає структуру:



## Синтез

Пептиди даного винаходу можна отримати при використанні методик, описаних в WO2004/014415 на сторінках 34-42, зміст якого включений в даний опис посиланням у всій повноті. Окрім того, приклади методик біохімічних синтезів, які включають в себе введення нуклеїнової кислоти в клітину і експресію нуклеїнових кислот, приведені у Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-1998, and Sambrook et al., in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Методики хімічного синтезу поліпептидів також добре відомі в даній галузі (Дивись, наприклад, Vincent in Peptide and Protein Drug Delivery, New York, N.Y., Dekker, 1990). Наприклад, пептиди даного винаходу можна отримати стандартним твердофазним пептидним синтезом. (Дивись, наприклад, Stewart, J.M., et al., Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2d ed. 1984)). Фізичні дані для ілюстративних пептидів приведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Прикл. №	Послідовність	Мол. маса (вирах.)	Мол. маса (МС-ЕС)	Чистота (%)
1	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	790,99	790,4	97
2	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	787,96	787,4	96
3	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	787,96	787,4	99
4	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH <sub>2</sub>	753,94	753,4	98
5	H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	813,01	812,4	99
6	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH <sub>2</sub>	831,03	830,4	98
7	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH <sub>2</sub>	876,92	876,3	98
8	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	793,00	792,4	98
9	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	793,99	793,4	97
10	H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	813,01	812,4	98
11	H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	841,02	840,4	95
12	H-Inp-D-2Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	852,04	851,3	99
13	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-NH <sub>2</sub>	659,79	659,3	99
14	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-NH <sub>2</sub>	659,79	659,3	98
15	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-NH <sub>2</sub>	659,79	659,3	98
16	H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	684,84	684,3	99
17	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH <sub>2</sub>	702,85	702,3	99
18	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-NH <sub>2</sub>	748,75	748,2	99
19	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	664,83	664,2	99
20	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	665,82	665,3	98
21	H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	684,84	684,3	98
22	H-Inp-D-2Nal-D-Dip-Phe-NH <sub>2</sub>	695,86	695,3	99
23	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	664,83	664,3	97
24	H-Inp-D-2Nal-D-Bal-Phe-NH <sub>2</sub>	675,85	675,2	99
25	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	787,96	787,5	97
26	H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	799,03	798,4	99
27	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	793,00	792,4	99
28	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	793,00	792,4	99
29	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	784,96	784,4	98
30	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	784,96	784,4	98
31	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	801,99	801,4	98
32	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	808,02	807,4	99

Продовження таблиці 1

Прикл. №	Послідовність	Мол. маса (вирах.)	Мол. маса (МС-ЕС)	Чистота (%)
33	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	664,83	664,2	98
34	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	673,81	673,3	99
35	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	793,99	793,5	99
36	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	800,02	799,4	99
37	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	809,00	808,5	99
38	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	815,03	814,4	99
39	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	814,04	813,4	98
40	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	790,99	790,5	97
41	H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	797,01	796,4	97
42	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	806,00	805,5	97
43	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	812,03	811,4	98
44	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	801,99	801,5	98
45	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	808,02	807,5	99
46	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	799,97	799,5	98
47	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	806,00	805,5	98
48	H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	811,00	810,5	95
49	H-Apc-D-1Nal-D-2Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	811,00	810,5	96
50	H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	813,01	812,5	99
51	H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	817,02	816,5	96
52	H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	817,02	816,5	94
53	H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	819,04	818,5	99
54	H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	819,04	818,5	98
55	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	679,84	679,2	98
56	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	679,84	679,3	99
57	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	680,83	680,3	99
58	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	685,87	685,2	97
59	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	686,86	686,2	99
60	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	679,84	679,2	95
61	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	680,83	680,2	97
62	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	791,97	791,5	98
63	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	798,00	797,4	99
64	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	806,99	806,5	99
65	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	813,02	812,4	98
66	H-Inp-D-2Nal-D-Trp(Ψ)-Pim	610,77	611,4	99
67	H-Inp-D-1Nal-D-Trp(Ψ)-Pim	610,77	611,3	99
68	H-Inp-D-Bal-D-Trp(Ψ)-Pim	616,79	617,3	99
69	H-Aib-D-Ser(Bzl)-D-Trp(Ψ)-Pim	564,69	565,3	99
70	H-Inp-D-Trp-D-2Nal(Ψ)-Pim	610,77	611,4	99

Отримання памоатної солі прикладу 1

- 5 Ацетатну сіль прикладу 1 (200 мг, 0,22 ммоль) розчиняли в 10 мл води. Памоат натрію (190 мг, 0,44 ммоль) розчиняли в 10 мл води. Два розчини об'єднували, і добре перемішували. Осади збирали центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хвилин, три рази промивали водою і сушили ліофілізацією.

Дослідження in vitro

- 10 Сполуки даного винаходу можуть і були протестовані на предмет активності як ліганди рецептора GHS, згідно з наступними методиками. Фахівцevi в даній галузі було б зрозуміло, що методики, аналогічні методикам, описаним тут, можна використовувати для аналізу зв'язувальної здатності сполук даного винаходу з молекулами меланокортинового рецептора.

Аналізи на зв'язування радіолігандів

- 15 Клітинні мембрани, використані для аналізу на зв'язування рецепторів in vitro, отримували з трансгенних клітин CHO-K1, які стабільно експресують людський рекомбінантний рецептор GHS. Клітини CHO-K1, які стабільно експресують людський рекомбінантний рецептор GHS, гомогенізували в 20 мл крижаного 50 mM Tris-HCl в Polytron Brinkman (Westbury, NY, США)

- (налаштування 6, 15 секунд). Гомогенати двічі промивали центрифугуванням (39000 g/10 хв), а кінцеві гранули повторно суспендували в 50 мМ Tris-HCl, які містять 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> і 0,1% BSA. Для аналізу аліквоти (0,4 мл) інкубували з 0,05 нМ (<sup>125</sup>I)греліну (~2000 Кі/моль, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, США), в присутності або у відсутність 0,05 мл немічених тестованих сполук порівняння даного винаходу. Після 60 хв інкубування (4 °C) пов'язаний (<sup>125</sup>I)грелін відділяли від вільного шляхом швидкого фільтрування через фільтри GF/C (Brandel, Gaithersburg, MD, США), які заздалегідь вимочували в суміші 0,5% поліетиленімін/0,1% BSA. Потім фільтри три рази промивали аліквотами по 5 мл крижаного 50 мМ Tris-HCl і 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, і робили підрахунок захопленої на фільтрах зв'язаної радіоактивності методом гама-спектроскопії (Wallac LKB, Gaithersburg, MD, США). Питоме зв'язування визначали як загальний зв'язаний (<sup>125</sup>I)грелін мінус (<sup>125</sup>I)грелін, зв'язаний в присутності 1000 нМ греліну (Bachem, Torrence, CA, США). Дані по питомому зв'язуванню для ілюстративних пептидів приведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Прик. №	Послідовність	hGHS Кі (нМ)
1	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	0,42
2	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	1,05
3	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	7,35
4	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH <sub>2</sub>	243,00
5	H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,35
6	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH <sub>2</sub>	1,55
7	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH <sub>2</sub>	25,43
8	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	0,45
9	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	0,80
10	H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	46,78
11	H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	93,75
12	H-Inp-D-2Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	419,00
13	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-NH <sub>2</sub>	11,35
14	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-4Pal-NH <sub>2</sub>	113,50
15	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-3Pal-NH <sub>2</sub>	16,10
16	H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	20,00
17	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH <sub>2</sub>	4,46
18	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Pff-NH <sub>2</sub>	36,31
19	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	4,11
20	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	6,17
21	H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	104,83
22	H-Inp-D-2Nal-D-Dip-Phe-NH <sub>2</sub>	104,80
23	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	2,30
24	H-Inp-D-2Nal-D-Bal-Phe-NH <sub>2</sub>	27,40
25	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-3Pal-Lys-NH <sub>2</sub>	1,58
26	H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	0,42
27	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,33
28	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	0,31
29	H-Inp-D-2Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	0,64
30	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	0,36
31	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,42
32	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	0,29
33	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	0,87
34	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	0,70
35	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	1,11
36	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	0,52
37	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	0,45
38	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH <sub>2</sub>	0,50
39	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Lys-NH <sub>2</sub>	0,36
40	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	0,53
41	H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	0,40

Продовження таблиці 2

Прик. №	Послідовність	hGHS Ki (нМ)
42	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	0,46
43	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH <sub>2</sub>	0,51
44	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,42
45	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,32
46	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	0,46
47	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	0,71
48	H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	1,99
49	H-Apc-D-1Nal-D-2Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	1,71
50	H-Apc-D-1Nal-D-1Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,32
51	H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	3,48
52	H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Apc-NH <sub>2</sub>	1,49
53	H-Apc-D-Bal-D-1Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,46
54	H-Apc-D-Bal-D-2Nal-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,68
55	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	0,73
56	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	0,89
57	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	1,41
58	H-Apc-D-Bal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	0,98
59	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	1,62
60	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-2Thi-NH <sub>2</sub>	0,95
61	H-Apc-D-2Nal-D-Trp-Taz-NH <sub>2</sub>	2,11
62	H-Inp-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	1,19
63	H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	0,83
64	H-Apc-D-1Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	0,98
65	H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH <sub>2</sub>	1,13
66	H-Inp-D-2Nal-D-Trp(Ψ)-Pim	116,68
67	H-Inp-D-1Nal-D-Trp(Ψ)-Pim	50,55
68	H-Inp-D-Bal-D-Trp(Ψ)-Pim	48,73
69	H-Aib-D-Ser(Bzl)-D-Trp(Ψ)-Pim	753,33
70	H-Inp-D-Trp-D-2Nal(Ψ)-Pim	182,00

## Дослідження розчинності

5 Памоатну сіль прикладу 1 (50 мг) зважували в пробірці для мікроцентрифуги, і додавали після цього 125 мкл ПЕГ200 і 125 мкл води. Суміш піддавали дії ультразвукового випромінювання для полегшення розчинення. Отримували прозорий розчин.

Розчинність памоатної солі прикладу 1 визначали, змішуючи пептид у воді або PBS, з подальшим визначенням концентрації в надосадовій рідині методом ВЕРХ, і результати представлені в таблиці 3.

10

Таблиця 3

Розчинність	Вода, pH 7,0	PBS, pH 7,4
Памоатна сіль прикладу 1	0,06 мг/мл	0,07 мг/мл
Памоатна сіль прикладу 1 з Zn	0,14 мг/мл	0,08 мг/мл

## Фармакокінетичні дослідження препаратів прикладу 1

«Препарат 1» прикладу 1 отримували, розчиняючи памоатну сіль прикладу 1 в розчині 50% ПЕГ200 і 50% води (об./об.), при концентрації 200 мг/мл (20% мас./об.).

15 «Препарат 2» прикладу 1 отримували, розчиняючи ацетатну сіль прикладу 1 в суміші соляний розчин/2% інактивована нагріванням мишача сироватка/5% ДМА/2% tween-80.

## Дозування

20 У випадку препарату 1 щурам Sprague-Dawley вводили дозу шляхом підшкірної ін'єкції при фіксованій кількості або 5 мкл/щур або 1,0 мг/щур, або змінній кількості приблизно 2,5 мг/кг маси тіла.

У випадку препарату 2 щурам Sprague-Dawley вводили дозу шляхом підшкірної ін'єкції при змінній кількості 2,1 мг/кг маси тіла.

## Отримання зразків

У випадку препаратів 1 і 2, 50 мкл плазми підкислювали 2,5 мкл мурашиної кислоти, і осаджували 150 мкл ацетонітрилу. Надосадову рідину збирали центрифугуванням. 50 мкл даного препарату вводили для аналізу методом РХ-МС/МС.

## 5 Аналіз методом РХ-МС/МС

У випадку препаратів 1 і 2 аналіз методом РХ-МС/МС здійснювали з використанням мас-спектрометричної системи API4000, оснащеної зондом Turbo IonSpray. Використали MRM режим детектування молекулярних іонів з іонною парою 396,5/112,3. Розділення методом ВЕРХ проводили на 3 мк колонці Luna C8(2) 2×30 мм, який експлуатується від 0% В до 80% В протягом 10 хвилин при швидкості потоку 0,3 мл/хвилину. Буферний розчин А являє собою 1%-вий розчин мурашиної кислоти у воді, а буферний розчин В являє собою 1%-вий розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі. LOQ становив 5 нг/мл.

## Результати і короткий опис

15 Концентрацію в плазмі прикладу 1 при дозі препарату 1, розраховували за її стандартним калібрувальним графіком, і результати приведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Час	Концентрація в плазмі(нг/мл) прикладу 1, при дозуванні з препаратом 1	Концентрація в плазмі(нг/мл) прикладу 1, при дозуванні з препаратом 2
5 хвилин	47,0	520
10 хвилин	62,4	N/A
15 хвилин	85,4	860
30 хвилин	162,5	990
1 година	312,5	820
2 години	485,0	560
3 години	N/A	480
4 години	509,5	330
6 годин	N/A	130
8 годин	396,0	0
12 годин	334,0	0
16 годин	132,7	0
20 годин	121,0	0
24 години	84,0	0

Графіки залежності фармакокінетичних профілів препарату 1 від проходження усього тимчасового інтервалу представлені в нормальній шкалі на фіг. 1А, і в логарифмічній шкалі на фіг. 1В.

20 Деякі фармакокінетичні параметри прикладу 1, при дозуванні з препаратом 1, приведені в таблиці 5.

Таблиця 5

	Приклад 1, при дозуванні з препаратом 1	Приклад 1, при дозуванні з препаратом 2
T <sub>макс</sub> (годин)	4	0,5
C <sub>макс</sub> (нг/мл)	543	990
AUC (нг-год/мл)	7493	3239
CL (мл/година)	333	725
T <sub>1/2</sub> (годин)	6,7	1,8

25 Дані результати свідчать про те, що описані тут препарати прикладу 1, згідно з даним винаходом забезпечують прийнятні препарати тривалого вивільнення з поліпшеними фармакокінетичними параметрами і більш плоскими профілями вивільнення, що може привести до ослаблених побічних ефектів і підвищеної ефективності. Наприклад, показано, що препарат 1 має профіль вивільнення, який перевищує 24 години після одноразової підшкірної ін'єкції, при значно низькій C<sub>макс</sub> і значно високому T<sub>макс</sub>.

30 Окрім того, показано, що препарат памоатної солі

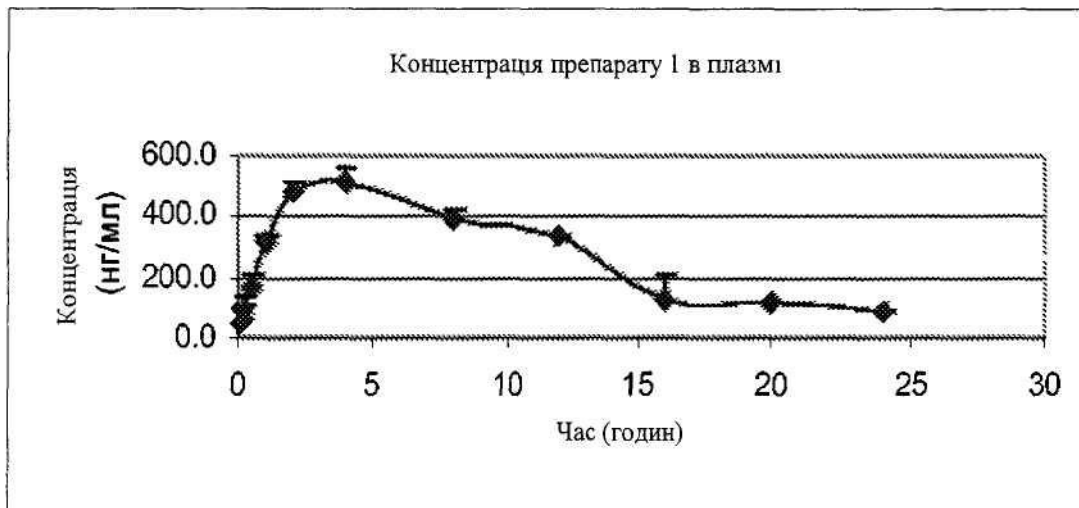
прикладу 1, тобто препарат 1, має значно підвищений  $T_{1/2}$ , в порівнянні з препаратом ацетатної солі прикладу 1, тобто препаратом 2.

Додаткові варіанти здійснення даного винаходу будуть зрозумілі з попереднього опису, і мається на увазі, що вони входять в даний винахід, повністю описаний тут і визначений в наступній формулі винаходу.

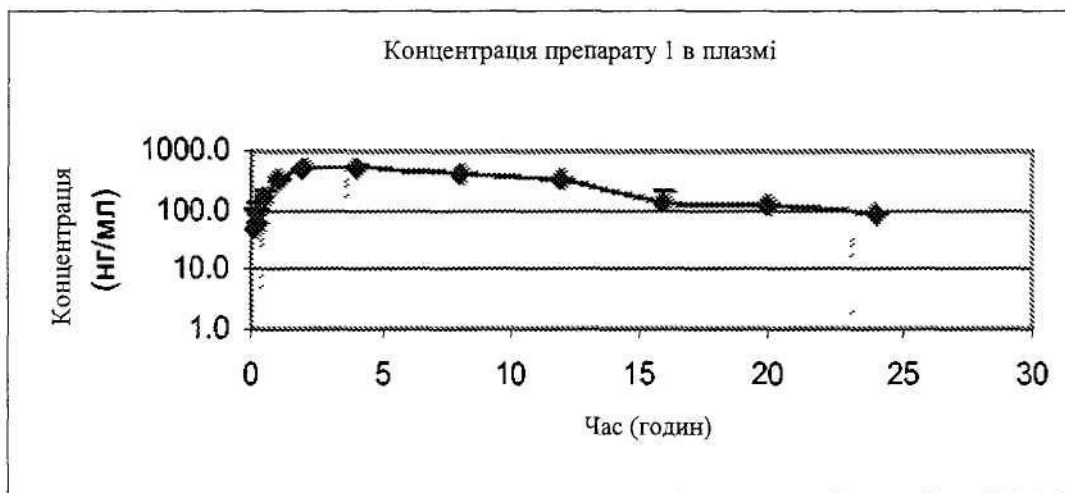
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція прозорого розчину, гелю або напівтвердої речовини, або суспензії, яка містить пептид відповідно до структури  $\text{H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH}_2$ , який діє як ліганд рецептора GHS, або його фармацевтично прийнятну сіль, в якій даний пептид утворює депо *in situ* після підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції суб'єкту, де фармацевтична композиція додатково містить ПЕГ і вказаний пептид знаходиться у вигляді памоатної солі.
2. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій вказаний ПЕГ має середню молекулярну масу від близько 200 до близько 10000.
3. Фармацевтична композиція за п. 2, в якій вказаний пептид розчинений у водному розчині ПЕГ200 або ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ і води складає від близько 1:99 до близько 99:1.
4. Фармацевтична композиція за п. 3, в якій вказаний пептид розчинений у водному розчині ПЕГ200 або ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ і води складає від близько 1:9 до близько 1:1.
5. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій вказаний спирт являє собою етанол або ізопропіловий спирт.
6. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, в якій концентрація маса-до-об'єму вказаного пептиду знаходиться в інтервалі від близько 0,1 мг/мл до близько 2000 мг/мл.
7. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, в якій рН вказаної композиції знаходиться в інтервалі від близько 3,0 до близько 8,0.
8. Фармацевтична композиція за п. 7, в якій вказану памоатну сіль  $\text{H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH}_2$  розчиняють у водному розчині ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і води становить приблизно 1:1 і в якому концентрація маса-до-об'єму пептиду становить приблизно 200 мг/мл.
9. Фармацевтична композиція за п. 7, в якій вказану памоатну сіль  $\text{H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH}_2$  розчиняють у водному розчині ПЕГ200, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ200 і води становить приблизно 1:1 і в якому концентрація маса-до-об'єму пептиду становить приблизно 200 мг/мл.
10. Фармацевтична композиція за п. 7, в якій вказану памоатну сіль  $\text{H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH}_2$  розчиняють в розчині ПЕГ400/PBS, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і PBS становить приблизно 1:1 і в якому концентрація маса-до-об'єму пептиду становить приблизно 300 мг/мл.
11. Фармацевтична композиція за п. 7, в якій вказану памоатну сіль  $\text{H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Arc-NH}_2$  розчиняють в сольовому розчині ПЕГ400, в якому співвідношення об'єм-до-об'єму ПЕГ400 і сольового розчину становить приблизно 1:1 і в якому концентрація маса-до-об'єму пептиду становить приблизно 300 мг/мл.
12. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить консервант.
13. Фармацевтична композиція за п. 12, в якій вказаний консервант вибирають з групи, яка включає м-крезол, фенол, бензиловий спирт і метилпарабен.
14. Фармацевтична композиція за п. 13, в якій вказаний консервант присутній в концентрації, яка складає від приблизно 0,01 мг/мл до приблизно 100 мг/мл.
15. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить ізотонічний агент.
16. Фармацевтична композиція за п. 15, в якій вказаний ізотонічний агент присутній в концентрації, яка складає від приблизно 0,01 мг/мл до приблизно 100 мг/мл.
17. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить стабілізатор.
18. Фармацевтична композиція за п. 17, в якій вказаний стабілізатор вибирають з групи, що включає імідазол, аргінін і гістидин.
19. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить поверхнево-активну речовину.

20. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить хелатуючий агент.
21. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить буферний розчин.
- 5 22. Фармацевтична композиція за п. 21, в якій вказаний буферний розчин вибирають з групи, яка включає Tris, ацетат амонію, ацетат натрію, гліцин, аспарагінову кислоту і Bis-Tris.
23. Фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково містить двовалентний метал.
24. Фармацевтична композиція за п. 23, в якій вказаний двовалентний метал являє собою цинк.

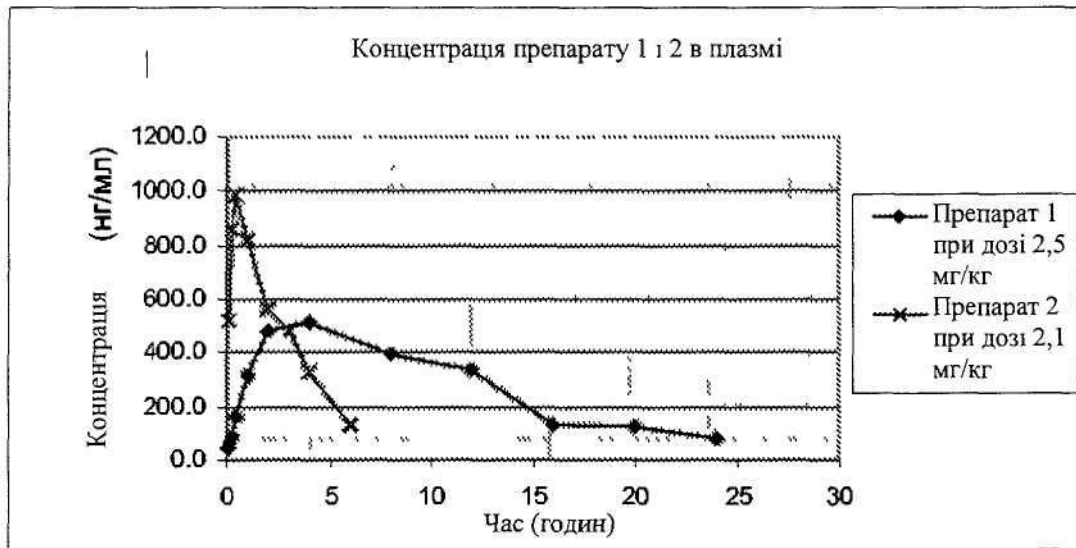


Фіг. 1А



Фіг. 1В





Фіг. 2

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601