

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092275** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(22) Дата подачи заявки
2019.03.22

(51) Int. Cl. *A61K 9/16* (2006.01)
A61K 38/33 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

(54) СОСТАВЫ ПЕПТИДОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К РЕЦЕПТОРУ МЕЛАНОКОРТИНА, И СПОСОБЫ ДОСТАВКИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ

(31) 62/647,000

(32) 2018.03.23

(33) US

(86) PCT/US2019/023575

(87) WO 2019/183472 2019.09.26

(71) Заявитель:
ПАЛАТИН ТЕКНОЛОДЖИЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Додд Джон Гарольд, Дордану Стивен
Куаку (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Представлены составы, композиции и способы доставки пептидов, специфичных к рецептору меланокортина, в частности циклических пептидов, селективных и специфичных к рецептору меланокортина-1, в просвет желудочно-кишечного тракта для лечения заболеваний, показаний, состояний и синдромов желудочно-кишечного тракта, опосредованных рецептором меланокортина или чувствительных к нему.



202092275

A1

A1

202092275

**Составы пептидов, специфичных к рецептору меланокортина,
и способы доставки в желудочно-кишечный тракт**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Эта заявка испрашивает приоритет и преимущество подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/647000, озаглавленной «Составы пептидов, специфичных для рецепторов меланокортина, и способы доставки в желудочно-кишечный тракт», поданной 23 марта 2018 г., а также ее описание и формула изобретения включены в данный документ ссылкой.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание ссылкой. Указанная копия ASCII, созданная 18 марта 2019 г., называется 1903-187-Sequence_ST25.txt и имеет размер 40 КБ.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область, к которой относится изобретение (область техники)

Настоящее изобретение относится к применению пептидов, специфичных к рецептору меланокортина, в частности циклических пептидов, селективных и специфичных к рецептору меланокортина-1, и к способам, композициям и составам, содержащим такие пептиды, для специфической доставки в желудочно-кишечный тракт, включая специфическую доставку в ободочную кишку, для лечения опосредованных рецептором меланокортина или чувствительных к нему заболеваний, показаний, состояний и синдромов, включая опосредованные рецептором меланокортина-1 или чувствительные к нему заболевания, показания, состояния и синдромы.

Описание известного уровня техники:

Было идентифицировано семейство типов и подтипов рецептора меланокортина. Типы рецептора включают рецептор меланокортина-1 (MC1r), который, как известно,

экспрессируется в нормальных меланоцитах человека и в клетках меланомы, но о котором также сообщается, что он экспрессируется в разных других клетках, включая клетки, задействованные в иммунных ответах, такие как моноциты, нейтрофилы, лимфоциты, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры (NK-клетки) и эндотелиальные клетки. См., в частности, Kang, L., et al., "A selective small molecule agonist of melanocortin-1 receptor inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine accumulation and leukocyte infiltration in mice," *J. Leuk. Biol.* 80:897-904 (2006) и цитируемые там литературные источники. Известно множество подтипов и вариантов MC1r человека, включая те, которые раскрыты в патентах США №№ 6693184 и 7115393. Кроме MC1r другие типы рецептора меланокортина включают рецептор меланокортина-2 (MC2r) к АСТН (адренкортикотропин), экспрессируемый в клетках надпочечника, рецепторы меланокортина-3 (MC3r) и меланокортина-4 (MC4r), экспрессируемые прежде всего в клетках гипоталамуса, среднего мозга и ствола мозга, а также в периферических тканях, и рецептор меланокортина-5 (MC5r), экспрессируемый в разнообразных периферических тканях.

Известны высокоселективные и специфичные пептиды-агонисты MC1r, включая циклические пептиды, раскрытые в патентах США №№ 9447148, 8877890 и 8492517, и линейные пептиды, раскрытые в патентах США №№ 9580466 и 8933194.

Известен ряд воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), включая язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона. Оба заболевания являются хроническими и рецидивирующими/ремиттирующими ВЗК желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Области ЖКТ, которые наиболее часто поражаются болезнью Крона - это тонкий кишечник и толстый кишечник, также называемый ободочной кишкой, включая прямую кишку, однако известно, что болезнь Крона может поражать весь ЖКТ от ротовой полости до заднего прохода. ЯК обычно поражает толстый кишечник, включая ободочную кишку. Общие симптомы заболеваний включают диарею, боль в животе, ректальное кровотечение и похудение. Кроме того, болезнь Крона может включать кишечные абсцессы, свищи, аномальный проход, ведущий из одной части кишечника в другую, по которому могут проходить жидкости или выделения, а также непроходимость кишечника.

Известно, что MC1r активируется в некоторых экспериментальных животных моделях колитов и экспрессируется на поверхности клеток эпителия кишечника. Maaser С. и др. Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. *Gut.* 2006;55(10):1415–1422. Однако до сих пор использование MC1r-специфичных соединений

для лечения ЯК, болезни Крона или ВЗК ограничивалось системными путями введения, например, раскрытыми в международной публикации № WO 2016/066702, PCT/EP2015/075019.

Несмотря на значительный научный и фармацевтический интерес к пептидам, специфичным к рецепторам меланокортина, по-прежнему существует потребность в высокоселективных и специфичных пептидах-агонистах MC1r для применения в фармацевтике, а также в составах и способах доставки пептидов-агонистов MC1r к целевому участку, например, в просвет ободочной кишки. Настоящее изобретение было разработано с целью разрешения данной проблемы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к фармацевтическому составу для высвобождения в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), содержащему пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные в матричной частице, такой как матричная микрочастица, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения. В таком составе полимер замедленного высвобождения может быть полимером с pH-зависимым высвобождением. Пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть подмешаны в матричную частицу, тем самым образуя смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли. Смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли может быть размещена в водорастворимой капсуле, которая может быть желатиновой капсулой, причем эта капсула может дополнительно содержать по меньшей мере одно покрытие, выбранное из изолирующего покрытия и энтеросолюбильного покрытия. В альтернативном случае, из смеси матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли можно сформовать таблетку, а таблетка может дополнительно содержать по меньшей мере одно покрытие, выбранное из изолирующего покрытия и энтеросолюбильного покрытия.

По меньшей мере один полимер замедленного высвобождения может включать полимер с pH-зависимым высвобождением, необязательно содержащий pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры, такие как сополимеры, выбранные из группы, состоящей из Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D. Соплимеры Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут присутствовать в массовом соотношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы,

включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

Пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль в составе может быть MC1r-специфичным пептидом или его фармацевтически приемлемой солью. Эффективная концентрация EC_{50} MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC1r может быть менее примерно одного нМ, а также его эффективная концентрация EC_{50} в отношении MC4r может по меньшей мере в сто раз превышать эффективную концентрацию EC_{50} в отношении MC1r. В одном аспекте эффективная концентрация EC_{50} MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r имеет значение не ниже примерно 500 нМ. В другом аспекте MC1r-специфичный пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть функционально неактивными в отношении MC2r, MC3r и MC5r.

В одном аспекте полимер замедленного высвобождения высвобождает по меньшей мере часть MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке и предпочтительно высвобождает терапевтически эффективное количество MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке.

В другом аспекте пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль. В составе, включающем Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль, матричная частица, которая может быть матричной микрочастицей, может включать в себя смесь полимеров замедленного высвобождения, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75. Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут быть микрочастицами с максимальным размером частиц не более 1000 мкм в диаметре, предпочтительно с диаметром не более примерно 600 мкм, и с минимальным размером частиц не менее примерно 250 мкм в диаметре. Процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения может составлять не более

примерно 2% в пересчете на вес, или в альтернативном случае - не более примерно 1% в пересчете на вес, или в альтернативном случае - не более примерно 10% в пересчете на вес. Состав может дополнительно включать по меньшей мере одно формообразующее, выбранное из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, разрыхлителя, смазывающего вещества и связующего.

В другом аспекте состав, содержащий пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные в матричной частице, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения, при введении пациенту-человеку осуществляет максимальное высвобождение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке. В этом аспекте по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения может быть полимером с pH-зависимым высвобождением, включая смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

В другом аспекте изобретения в составе, содержащем пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные внутри матричной частицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения, пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль функционально активны в отношении MC1r и по меньшей мере одного дополнительного рецептора меланокортина, выбранного из группы, состоящей из MC3r, MC4r и MC5r.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтическому составу, высвобождающему в нижних отделах ЖКТ, полученному способом, включающим стадии:

- a. предоставление раствора смеси Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75;
- b. добавление Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли к раствору смеси;
- c. сушку раствора смеси, содержащего Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль; и

d. преобразование высушенной смеси в микрочастицы, где размер получаемых частиц характеризуется диаметром, который составляет не более примерно 1000 мкм, и предпочтительно, где размер получаемых частиц характеризуется диаметром в пределах от примерно 250 мкм до примерно 600 мкм.

В одном аспекте вышеупомянутого способа Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль добавляют к раствору смеси Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D в количестве не более чем примерно 2% в пересчете на массу. В указанном способе сушка может представлять собой вакуумную сушку. В указанном способе преобразование может представлять собой измельчение высушенной смеси и просеивание через сито.

В другом аспекте изобретения предложен состав с модифицированным высвобождением, содержащий

МС1г-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемую соль в качестве единственного активного фармацевтического ингредиента, и

по меньшей мере один полимер, контролирующий высвобождение, выбранный из группы, состоящей из pH-зависимых полимеров и pH-независимых полимеров;

где при пероральном введении пациенту-человеку МС1г-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль доставляется практически в неизменном виде в просвет ободочной кишки пациента-человека.

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, подходящая для перорального введения, для лечения воспалительного заболевания кишечника, причем фармацевтическая композиция содержит:

ядро таблетки, причем ядро таблетки содержит активное соединение, выбранное из МС1г-специфичного циклического пептида или его фармацевтически приемлемой соли в качестве единственного активного фармацевтического ингредиента, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; а также

энтеросолюбильное покрытие.

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, подходящая для перорального введения, для лечения воспалительного заболевания кишечника, причем фармацевтическая композиция содержит:

пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные внутри инкапсулированной матричной микрочастицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения; а также

энтеросолюбильное покрытие, нанесенное на капсулу.

В фармацевтической композиции пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль может представлять собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль, а по меньшей мере один полимер с замедленным высвобождением может включать pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения ВЗК у пациента-человека с ВЗК, включающему введение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли, размещенных в матричной микрочастице, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения. В этом способе полимер замедленного высвобождения может быть полимером с pH-зависимым высвобождением. Пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть подмешаны в матричную микрочастицу, тем самым образуя смесь матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли. Смесь матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли может быть размещена в водорастворимой капсуле, включая желатиновую капсулу, причем эта капсула может дополнительно содержать энтеросолюбильное покрытие, включая полимер с pH-зависимым высвобождением. В альтернативном случае, из смеси матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли можно сформовать таблетку, а таблетка может дополнительно содержать энтеросолюбильное покрытие, включая полимер с pH-зависимым высвобождением.

В способе лечения ВЗК у пациента-человека полимер с pH-зависимым высвобождением может содержать pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры, включая сополимеры, выбранные из группы, состоящей из Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D. Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут присутствовать в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношении, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

В способе лечения ВЗК у пациента пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль в составе может быть MC1r-специфичным пептидом или его фармацевтически приемлемой солью. Эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой

соли в отношении MC1r имеет значение ниже, чем примерно один нМ. Эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r по меньшей мере в сто раз ниже эффективной концентрации EC₅₀ в отношении MC1r. В одном аспекте эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r имеет значение не ниже примерно 500 нМ. В другом аспекте MC1r-специфичный пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть функционально неактивными в отношении MC2r, MC3r и MC5r.

В одном аспекте способа лечения ВЗК у пациента-человека с ВЗК пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль может представлять собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль. В этом аспекте матричная микрочастица может дополнительно представлять собой смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75. Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут представлять собой микрочастицы с максимальным размером частиц не более 1000 мкм в диаметре, или в альтернативном случае - не более 600 мкм в диаметре. Массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере с замедленным высвобождением составляет не более примерно 2% в пересчете на вес, или в альтернативном случае - не более примерно 1% в пересчете на вес, или в альтернативном случае - не более примерно 10% в пересчете на вес.

В еще одном аспекте способа лечения ВЗК у пациента-человека с ВЗК по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения при введении пациенту-человеку с ВЗК осуществляет максимальное высвобождение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке. По меньшей мере один полимер замедленного высвобождения может быть полимером с pH-зависимым высвобождением - это необязательно смесь, содержащая Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

В другом аспекте способа лечения ВЗК у пациента-человека с ВЗК пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль функционально активны в отношении MC1r и по меньшей мере одного дополнительного рецептора меланокортина, выбранного из группы, состоящей из MC3r, MC4r и MC5r.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция на основе пептида, специфичного к рецептору меланокортина, для применения в лечении заболеваний, показаний, состояний и синдромов ЖКТ, опосредованных рецептором меланокортина.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический препарат на основе пептида, специфичного к рецептору меланокортина, в котором пептид представляет собой селективный лиганд MC1r, размещенный в pH-зависимой полимерной матричной микрочастице, для применения в лечении расстройств, заболеваний, показаний, состояний и/или синдромов ВЗК, связанных с MC1r.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический препарат на основе пептида, специфичного к рецептору меланокортина, для применения в лечении, при котором лечение осуществляют путем перорального введения полимерной матрицы, обеспечивающей высвобождение пептида в ЖКТ, в том числе в ободочной кишке.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены составы и способы применения циклических пептидов, специфичных к MC1r, которые можно использовать для направленной доставки в просвет нижних отделов ЖКТ, в том числе в ободочную кишку, с использованием pH-зависимой полимерной матрицы с контролируемым высвобождением.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены составы и способы введения циклических пептидов, специфичных к MC1r, к рецепторам в просвете нижнего отдела ЖКТ, причем пептиды доставляются без какой-либо или без какой-либо существенной системной доставки таких пептидов, в том числе без какой-либо существенной системной доставки таких пептидов в сердечно-сосудистую систему.

Еще один аспект настоящего изобретения предлагает сайт-специфическую доставку циклических пептидов, специфичных к MC1r, к рецепторам в просвете нижнего отдела ЖКТ, в том числе в ободочную кишку, пациента с ВЗК, путем перорального введения пептида, размещенного в pH-зависимой полимерной матричной микрочастице, причем пептид доставляется и высвобождается в просвете нижнего отдела ЖКТ, в том числе

ободочной кишке, без какого-либо или без какого-либо существенного результирующего присутствия пептида в кровотоке пациента.

Другие аспекты и новые признаки, а также дополнительный объем применимости настоящего изобретения будут изложены частично в подробном описании, которое следует ниже, и частично станут очевидными специалистам в данной области техники после изучения нижеследующего, или их можно понять при осуществлении изобретения на практике. Аспекты изобретения могут быть реализованы и достигнуты с помощью средств и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Прилагаемые графические материалы, которые включены в описание и составляют его часть, иллюстрируют один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов изобретения. Графические материалы предназначены исключительно для иллюстрации одного или нескольких предпочтительных вариантов осуществления изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение.

ФИГ. 1А и 1В представляют собой графическое представление эффектов пептида из примера 9.3, вводимого через канюлю для ободочной кишки, и сульфасалазина, вводимого перорально, на оценку воспаления (ФИГ. 1А) и вес ободочной кишки (ФИГ. 1В) у крыс с воспалением кишечника, индуцированным DNBS, где «*» обозначает значение p менее 0,05, IC - внутритолстокишечное введение, а PO - пероральное введение.

ФИГ. 2 представляет собой график продвижения пептида из примера 9.3, размещенного в матричной микрочастице из партии 41, вводимого перорально в капсуле согласно данному изобретению через кишечник крысы, где «ободочная кишка» включает прямую кишку и дистальную часть ободочной кишки, «толстая кишка» включает дистальную кишку, а «тонкий кишечник» включает проксимальную кишку.

ФИГ. 3А и 3В представляют собой графическое представление эффектов пептида из примера 9.3, вводимого перорально в капсуле согласно изобретению, и сульфасалазина, вводимого перорально, на скорректированные по исходному уровню оценки макроскопических повреждений (ФИГ. 3А) и скорректированные по исходному уровню оценки воспаления у крыс с воспалением кишечника, индуцированным DNBS, где «*» указывает значение p менее 0,05, «**» указывает значение p менее 0,01, а «***» указывает значение p менее 0,001.

На ФИГ. 4 представлены графики растворения пептида из примера 9.3 из микрочастиц Eudragit® партий 23, 24 и 27 в фосфатном буфере при pH 6,8.

На ФИГ. 5 представлены графики растворения пептида из примера 9.3 с течением времени из микрочастиц Eudragit® разных партий при pH в пределах от pH 1,2 до pH 7,4.

На ФИГ. 6 представлены графики растворения пептида из примера 9.3 из микрочастиц Eudragit® партий 23, 24, 27 и 31 при pH в пределах от pH 1,2 до pH 7,4 с течением времени при концентрации пептида 1% или 2%.

На ФИГ. 7 представлен график профиля растворения партии 35, содержащей 40% партии 29 (60% Eudragit® L-100-55/40% FS) и 60% партии 31R (Eudragit® S100) с течением времени.

На ФИГ. 8 представлен график растворения пептида из примера 9.3 из партии 40 в буфере, где pH буфера изменяли с течением времени от pH 4,5-5,5 до pH 4,5-7,5.

На ФИГ. 9 представлены графики зависимости кумулятивного высвобождения пептида из примера 9.3 от времени и увеличения pH (pH от 4,5 до 7,5) для партий 29, 34 и 38.

На ФИГ. 10 представлены графики зависимости кумулятивного высвобождения пептида из примера 9.3 от времени и увеличения pH (pH от 4,5 до 7,5) для партий 38 и 41.

На ФИГ. 11 представлены графики зависимости кумулятивного высвобождения пептида из примера 9.3 от времени и увеличения pH (pH от 4,5 до 7,5) в ходе двух прогонов для партии 41.

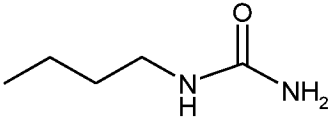
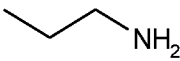
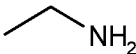
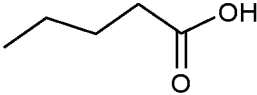
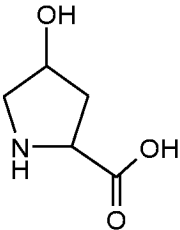
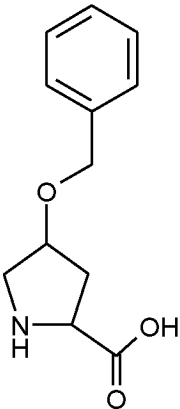
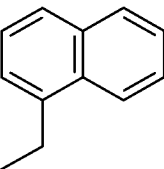
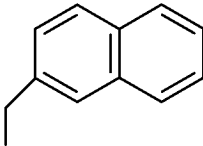
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

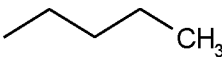
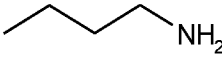
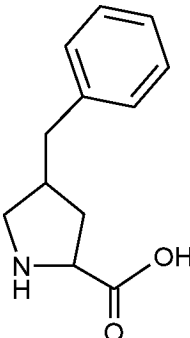
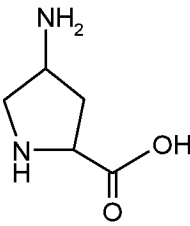
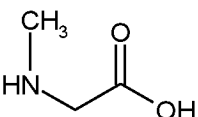
1.0 Определения.

Прежде чем приступить к описанию изобретения, далее приведены определения некоторых терминов.

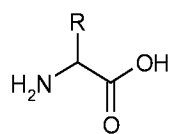
В последовательностях пептидов согласно настоящему изобретению аминокислотные остатки имеют свое обычное значение, как указано в Chapter 2400 of the Manual of Patent Examining Procedure, 9th Ed. Таким образом, «Nle» - норлейцин, «Asp» - аспарагиновая кислота, «His» - гистидин, «Phe» - фенилаланин, «Arg» - аргинин, «Trp» - триптофан, «Lys» - лизин и так далее. Следует понимать, что D-изомеры обозначаются буквой «D-» перед трехбуквенным кодом или названием аминокислоты, например, D-Phe представляет собой D-фенилаланин. Аминокислотные остатки, не охваченные вышеизложенным, включают следующие аминокислоты или боковые цепи аминокислот,

при этом понятно, что такие аминокислотные остатки могут быть L-изомерами или D-изомерами:

<u>Сокращенное название</u>	<u>Общепринятое название</u>	<u>Боковая цепь или структура аминокислот</u>
Cit	цитруллин	
Dab	диаминомасляная кислота	
Dap	диаминопропионовая кислота	
hGlu	гомоглутаминовая кислота	
Hyp	гидроксипролин	
Hyp(Bzl)	O-бензил- гидроксипролин	
Nal 1	3-(1-нафтил)аланин	
Nal 2	3-(2-нафтил)аланин	

<u>Сокращенное название</u>	<u>Общепринятое название</u>	<u>Боковая цепь или структура аминокислот</u>
Nle	норлейцин	
Orn	орнитин	
Pro(4-Bzl)	4-бензил-пролин	
Pro(4-NH ₂)	4-амино-пролин	
Sar	саркозин	

Термин «альфа-аминокислота» включает любую аминокислоту общей структуры



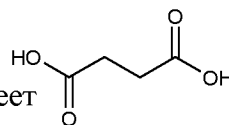
(изображена в неионизированной форме), где R представляет собой любую группу боковой цепи или водород, включая, без ограничения, аминокислотные остатки или группы боковой цепи, описанные в предыдущей таблице и параграфе.

«N-замещенная аминокислота» означает любую аминокислоту, в которой фрагмент боковой цепи аминокислоты ковалентно связан с аминогруппой основной цепи, в том числе, необязательно, где нет других заместителей, кроме H, в α -углеродном положении. Саркозин является примером N-замещенной аминокислоты. В качестве примера саркозин можно назвать N-замещенным производным аминокислоты Ala, в котором фрагмент боковой цепи аминокислоты саркозина и Ala является одним и тем же метилом. Если в пункте формулы или описании в данном документе упоминается «аминокислота», то такой термин включает, но не ограничивается этим, «N-замещенную аминокислоту».

Термин «L- или D-изомер аминокислоты» или «L- или D-изомер аминокислот» означает любой аминокислотный остаток, как определено здесь, включая, в частности, любую альфа-аминокислоту, бета-аминокислоту, гамма-аминокислоту или дельта-аминокислоту, включая, без ограничения, аминокислоту, которая непосредственно кодируется ДНК, посттрансляционно модифицированную аминокислоту, аминокислоту, экспрессируемую биологическими средствами, отличными от непосредственно ДНК, протеиногенную или непротеиногенную аминокислоту или любую другую синтетическую или искусственную аминокислоту.

Аминокислоты, включая L- или D-изомеры аминокислот, соединены вместе «амидной связью» или амидными связями с образованием ковалентной пептидной связи, связывающей карбоксильную группу основной цепи одной аминокислоты с аминогруппой основной цепи другой аминокислоты, тем самым образуя пептидную связь ($-C(=O)-NH-$).

В некоторых случаях группы могут быть заменой аминокислоте, например, при использовании дикарбоновой кислоты вместо аминокислоты. Одна конкретная используемая здесь дикарбоновая кислота представляет собой янтарную кислоту, сокращенно «Suc», которая имеет структурную формулу



Термин «алкан» включает линейные или разветвленные насыщенные углеводороды. Примеры линейных алкановых групп включают метан, этан, пропан и т.п. Примеры разветвленных или замещенных алкановых групп включают метилбутан или диметилбутан, метилпентан, диметилпентан или триметилпентан и т.п. В общем, любая алкильная группа может быть заместителем алкана.

Термин «алкен» включает ненасыщенные углеводороды, которые содержат одну или несколько двойных углерод-углеродных связей. Примеры таких алкеновых групп включают этилен, пропилен и т.п.

Термин «алкенил» включает линейный одновалентный углеводородный радикал с двумя-шестью атомами углерода или разветвленный одновалентный углеводородный радикал с тремя-шестью атомами углерода, содержащий по меньшей мере одну двойную связь; их примеры включают этенил, 2-пропенил и т.п.

«Алкильные» группы, указанные здесь, включают те алкильные радикалы указанной длины, которые представляют собой насыщенные алифатические

углеводородные группы с прямой или разветвленной цепью. Неограничивающие примеры таких алкильных радикалов включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор-бутил, третичный бутил, пентил, изопентил, гексил, изогексил и т.п.

Термин «алкин» включает линейный одновалентный углеводородный радикал с двумя-шестью атомами углерода или разветвленный одновалентный углеводородный радикал с тремя-шестью атомами углерода, содержащий по меньшей мере одну тройную связь; их примеры включают ацетилен, пропин, бутин и т.п.

Термин «арил» включает моноциклический или бициклический ароматический углеводородный радикал, содержащий от 6 до 12 атомов в кольце и необязательно замещенный независимо одним или несколькими заместителями, выбранными из алкила, галогеналкила, циклоалкила, алкокси-группы, алкитио-группу, галогена, нитро-группы, ацила, циано-группы, аминогруппы, монозамещенной аминогруппы, двузамещенной аминогруппы, гидроксигруппы, карбокси-группы или алкоксикарбонила. Примеры арильной группы включают фенил, бифенил, нафтил, 1-нафтил и 2-нафтил, их производные и т.п.

Термин «аралкил» включает радикал $-R^aR^b$, где R^a представляет собой группу алкилена (двухвалентного алкила), а R^b представляет собой арильную группу, как определено выше. Примеры аралкильных групп включают бензил, фенилэтил, 3- (3-хлорфенил)-2-метилпентил и т.п.

Термин «алифатический» включает соединения с углеводородными цепями, такие как, например, алканы, алкены, алкины и их производные.

Термин «ацил» включает группу $R(C=O)-$, где R - органическая группа, такая как алкил, арил, гетероарил, карбоциклил или гетероциклил. Неограничивающим примером является ацетильная группа $CH_3-C(=O)-$, обозначаемая здесь как «Ac». В данном документе R может включать (C_1 - C_{17}) линейный или разветвленный алкил, циклоалкил, алкилциклоалкил, арил или алкиларил.

Пептид или алифатический фрагмент «ацилирован», если алкильная или замещенная алкильная группа, как определено выше, связана через одну или несколько карбонильных $\{-(C=O)-\}$ групп. Пептид чаще всего ацилирован по N-концу.

Термин «гетероарил» включает моно- и бициклические ароматические кольца, содержащие от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы. 5- или 6-членный гетероарил представляет собой моноциклические гетероароматические кольца; их примеры включают тиазол, оксазол, тиофен, фуран, пиррол, имидазол, изоксазол,

пиразол, триазол, тиadiaзол, тетразол, оксадиазол, пиридин, пиридазин, пиримидин, пиазин и т.п. Бициклические гетероароматические кольца включают, но не ограничиваются ими, бензотиadiaзол, индол, бензотиофен, бензофуран, бензимидазол, бензизоксазол, бензотиазол, хиолин, бензотриазол, бензоксазол, изохиолин, пурин, фуropyридин и тиенопиридин.

Используемый здесь термин «амид» включает соединения, которые имеют трехвалентный азот, присоединенный к карбонильной группе, т.е. $-C(=O)-NH_2$ (т.е. первичный амид), $-C(=O)-NHR_c$ и $-C(=O)-NR_cR_d$, где каждый R_c и R_d независимо представляет собой органическую группу. При упоминании замещенной амидной группы имеется ввиду, что по меньшей мере одна из указанных органических групп (R_c и R_d) является замещенной. Примеры амидов включают метиламид, этиламид, пропиламид и т.п.

«Имид» включает соединения, содержащие имидную группу $(-C(=O)-NH-C(=O)-)$.

«Амин» включает соединения, которые содержат аминогруппу $(-NH_2)$, $-NHR_a$ и $-NR_aR_b$, где каждая из R_a и R_b независимо представляет собой органическую группу. При упоминании замещенной аминогруппы имеется ввиду, что по меньшей мере одна из указанных органических групп (R_a и R_b) является замещенной.

«Нитрил» включает соединения, которые являются производными карбоновой кислоты и содержат группу $(-CN)$, связанную с органической группой.

Термин «галоген» включает атомы галогена фтора, хлора, брома и йода, а также группы, включающие один или несколько атомов галогена, такие как $-CF_3$ и т.п.

Термин «композиция», как в фармацевтической композиции, охватывает продукт, содержащий активный ингредиент(ы) и инертный ингредиент(ы), который(е) составляют носитель, а также любой продукт, который прямо или косвенно является результатом комбинации, комплексообразования или агрегации любых двух или более ингредиентов, или диссоциации одного или нескольких ингредиентов, или других типов реакций или взаимодействий одного или нескольких ингредиентов. Соответственно, фармацевтические композиции включают любую композицию, полученную путем смешивания активного ингредиента и одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей.

Под «агонистом» рецептора меланокортина подразумевается эндогенное вещество, лекарственное вещество или соединение, включая некоторые из описанных здесь пептидных соединений, которые могут взаимодействовать с рецептором меланокортина и инициировать фармакологический ответ, включая, но не ограничиваясь этим, активацию

рецептора, включая инициирование передачи сигнала, такую как активация аденилциклазы, характерную для рецептора меланокортина. Агонист рецептора меланокортина может быть агонистом одного или нескольких из MC1r, MC2r, MC3r, MC4r и MC5r. Для настоящего изобретения предпочтительным является агонист рецептора меланокортина, который представляет собой агонист MC1r.

Под « α -MSH» подразумевается пептид Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ (SEQ ID NO:2) и его аналоги и гомологи, включая без ограничения NDP- α -MSH.

Под «NDP- α -MSH» подразумевается пептид Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ (SEQ ID NO:3) и его аналоги и гомологи.

Под «EC₅₀» подразумевается молярная концентрация агониста, включая частичный агонист, которая вызывает 50% максимально возможного ответа на этот агонист. В качестве примера, исследуемое соединение, которое при концентрации 72 нМ вызывает 50% максимально возможного ответа для этого соединения согласно анализу цАМФ в системе экспрессии клеток MC1r, имеет EC₅₀, равную 72 нМ. Если не указано иное, молярная концентрация, связанная с определением EC₅₀, выражается в наномолях на литр (нМ).

Под «Ki (нМ)» подразумевается константа диссоциации равновесного ингибитора, представляющая молярную концентрацию конкурирующего соединения, которое связывается с половиной сайтов связывания рецептора в равновесном состоянии в отсутствие конкурентов. Как правило, значение Ki обратно пропорционально сродству соединения к рецептору, поэтому низкое значение Ki указывает на сильное сродство. Ki можно определить, используя уравнение Ченга-Прусоффа (Cheng Y., Prusoff W. H., *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108, 1973):

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[Лиганд]}{K_D}}$$

где «лиганд» - это концентрация конкурента, а K_D - обратная величина сродства к рецептору у конкурента, которая обеспечивает 50%-ную занятость рецептора конкурентом. Если не указано иное, молярная концентрация, связанная с определением Ki, выражается в нМ. Ki может быть определен для конкретных рецепторов (например, MC1r, MC3r, MC4r или MC5r), определенных видов (например, человека или мыши) и конкретных лигандов (например, α -MSH или NDP- α -MSH).

Под «ингибированием» подразумевается процент ослабления или уменьшения связывания рецептора в анализе конкурентного ингибирования по сравнению с известным стандартом. Таким образом, под «ингибированием при 1 мкМ (NDP- α -MSH)» подразумевается процент ослабления связывания NDP- α -MSH вследствие добавления определенного количества исследуемого соединения, например, 1 мкМ исследуемого соединения, например, в условиях анализа, описанных ниже. В качестве примера, исследуемое соединение, которое не ингибирует связывание NDP- α -MSH, обладает 0% ингибированием, а исследуемое соединение, которое полностью ингибирует связывание NDP- α -MSH, обладает 100% ингибированием. Обычно, как описано ниже, для тестирования конкурентного ингибирования используется анализ с поддающейся обнаружению меткой, такой как NDP- α -MSH, меченный I^{125} , или флуоресцентный анализ с хелатным лантаноидом, таким как Eu-NDP- α -MSH. Однако известны другие методы тестирования конкурентного ингибирования, включая использование различных систем меток или тэгов, и в общем в этом изобретении для тестирования конкурентного ингибирования можно использовать любой метод, известный в данной области техники. Таким образом, можно видеть, что «ингибирование» является одной из мер, позволяющих определить, ослабляет ли исследуемое соединение связывание α -MSH с рецепторами меланокортина.

Под «сродством связывания» подразумевается способность соединения или лекарственного средства связываться со своей биологической мишенью, которая данным документе характеризуется параметром K_i (нМ).

Под « E_{max} » подразумевается максимальная функциональная активность соединения в определенной клеточной системе, экспрессирующей рецептор меланокортина, такая как максимальная стимуляция аденилатциклазы. Максимальная стимуляция, достигаемая NDP- α -MSH, обозначена как E_{max} , равная 100%, а соединение, способное стимулировать половину максимальной активности NDP- α -MSH, обозначено как соединение с E_{max} , равной 50%. Соединение настоящего изобретения, которое в условиях анализа, описанных здесь, характеризуется E_{max} , равной 70% или больше, может быть классифицировано как агонист, соединение с E_{max} в интервале от 10% до 70% может быть классифицировано как частичный агонист, а соединение с E_{max} ниже 10% может быть классифицировано как неактивное.

В общем, «функциональная активность» является мерой передачи сигналов рецептора или мерой изменения передачи сигналов, связанных с рецептором, например, с

рецептором меланокортина, при активации рецептора соединением. Рецепторы меланокортина инициируют передачу сигнала путем активации гетеротримерных G-белков. В одном аспекте рецепторы меланокортина передают сигнал через $G\alpha_s$, который катализирует продуцирование цАМФ аденилатциклазой. Таким образом, определение стимуляции аденилатциклазы, такое как определение максимальной стимуляции аденилатциклазы, является одним из показателей функциональной активности и является основным приведенным здесь показателем. Однако следует понимать, что при практическом осуществлении этого изобретения можно использовать альтернативные показатели функциональной активности, и они специально предусмотрены и включены в объем этого изобретения. Таким образом, в одном примере внутриклеточный свободный кальций может быть измерен с использованием специфических флуоресцентных молекул, связывающихся с кальцием, таких как Fura2, о которых сообщается в Mountjoy K.G. et al., Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiol Genomics* 5:11-19, 2001, или в Newman et al., Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *J Surg Res*:132:201-207, 2006, в обеих публикациях раскрыты и способы их использования. Fluo-4 представляет собой альтернативный кальций-связывающий краситель, который также широко используется (Nohr et al., The orphan G protein-coupled receptor GPR139 is activated by the peptides: Adrenocorticotrophic hormone (ACTH), α -, and β -melanocyte stimulating hormone (α -MSH, and β -MSH), and the conserved core motif HFRW. *Neurochem Int* 102: 105–113, 2017). Выше события высвобождения Ca^{2+} в том же пути, активацию можно также измерить путем измерения продуцирования инозитолтрифосфата или диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата, например, с помощью коммерчески доступных анализов HTRF (Liu et al., Comparison on functional assays for Gq-coupled GPCRs by measuring inositol monophosphate-1 and intracellular calcium in 1536-well plate format. *Curr Chem Genomics* 1: 70–77, 2008). Еще одним показателем функциональной активности является интернализация рецептора, возникающая в результате активации регуляторных путей, например методами, описанными в Nickolls S.A. et al., Functional selectivity of melanocortin 4 receptor peptide and nonpeptide agonists: evidence for ligand specific conformational states. *J Pharm Exper Therapeutics* 313:1281-1288, 2005. Еще одним показателем функциональной активности является обмен и скорость обмена нуклеотидов, связанных с активацией рецептора G-белка, например, обмен GDP (гуанозиндифосфат) на GTP (гуанозинтрифосфата) на α - субъединице G-белка, что можно измерять несколькими

методами, включая радиоанализ с использованием гуанозин-5'-(γ -[35 S]тио)-трифосфата, как раскрыто в Manning D.R., Measures of efficacy using G proteins as endpoints: differential engagement of G proteins through single receptors. *Mol Pharmacol* 62:451-452, 2002. Относительно новая платформа для анализа была разработана для измерения активности/вовлечения 14 разновидностей $G\alpha$, принадлежащих к подсемействам G_i , G_q , G_s , $G_{i2/i3}$, в отношении рецептора, в анализе используются биосенсоры на основе BRET (биолюминесцентного резонансного переноса энергии) для измерения разъединения субъединиц $G\alpha$ и $G\gamma$ при связывании лиганда (Zhao et al., Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol* 5:67, 2014, van der Westhuizen et al., Quantification of ligand bias for clinically relevant β_2 -adrenergic receptor ligands: Implications for drug taxonomy. *Molecular Pharm* 85:492–509, 2014). Для измерения активации G-связанных белков были разработаны различные анализы на основе генов, такие как описаны в Chen W. et al., A colorimetric assay from measuring activation of G_s - and G_q -coupled signaling pathways. *Anal Biochem* 226:349-354, 1995; Kent T.C. et al., Development of a generic dual-reporter gene assay for screening G-protein-coupled receptors. *Biomol Screening*, 5:437-446, 2005; или Kotarsky K. et al., Improved receptor gene assays used to identify ligands acting on orphan seven-transmembrane receptors. *Pharmacology & Toxicology* 93:249-258, 2003. Колориметрический анализ, о котором сообщается у Chen et al., был адаптирован для использования при измерении активации рецептора меланокортина, как описано в Hruby V.J. et al., Cyclic lactam α -melanocortin analogues of Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰] α -melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 shows high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *J Med Chem* 38:3454-3461, 1995. В общем, функциональную активность можно измерить любым методом, включая методы определения активации и/или передачи сигнала G-сопряженного рецептора, а также включая методы, которые могут быть разработаны или описаны в дальнейшем. Каждая из вышеупомянутых статей и раскрытые в них методы включены в данный документ ссылкой, как если бы они изложены полностью.

Пептид является «функционально неактивным», если значение EC₅₀ для такого пептида, если его можно установить, превышает примерно 1000 нМ.

Аббревиатура «мкм» является символом единицы измерения в системе СИ, известной как микрометр или микрометр, а также обычно называемой микроном.

Термин «частица», используемый здесь, включает, без каких-либо ограничений по природе и размеру, любые частицы, микрочастицы, сферы, шарики, гранулы, пеллеты,

частицы или любые структурные единицы, которые могут быть включены в пероральную лекарственную форму, и включает «микрочастицу», которая в контексте настоящего описания включает частицу диаметром менее примерно 1000 мкм.

Термины «лечить» и «лечение» в данном контексте подразумевают действие, которое происходит, когда пациент страдает от указанного заболевания или нарушения, и которое снижает тяжесть заболевания или нарушения.

В данном контексте термин «фармакологически эффективное количество» (включая «терапевтически эффективное количество») означает количество пептида, вводимого согласно изобретению, которое достаточно, чтобы вызвать желаемый терапевтический или биологический эффект.

Используемый здесь термин «профилактически эффективный» или «предотвращающий» означает количество соединения, включая пептид данного изобретения, которое будет предотвращать или подавлять заболевание или смягчать болезнь млекопитающего с болезненным состоянием, которое врач или другой клиницист пытается предотвратить, подавить или смягчить его последствия до того, как пациент начнет страдать от указанного заболевания или расстройства.

2.0 Составы и использование.

2.1 В предпочтительном варианте осуществления пептид, специфичный к рецептору меланокортина, предпочтительно MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, составлен в форму с pH-зависимым высвобождением, в которой пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль размещены внутри матричной частицы или микрочастицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения. Пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть подмешаны в матрицу микрочастицы, тем самым образуя смесь матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли. Смесь матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли может быть размещена в водорастворимой капсуле, которая может быть желатиновой капсулой. В альтернативном случае, из смеси матричной микрочастицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли можно сформовать таблетку, а таблетка может дополнительно содержать по меньшей мере одно покрытие, выбранное из изолирующего покрытия и энтеросолюбильного покрытия. По меньшей мере один полимер замедленного высвобождения может включать полимер с pH-зависимым высвобождением,

необязательно содержащий pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры, такие как сополимеры, выбранные из группы, состоящей из Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D. Соплимеры Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут присутствовать в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

В другом варианте осуществления пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль. В составе, включающем Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль, матричная частица или микрочастица может включать в себя смесь полимеров с pH-зависимым замедленным высвобождением, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75. Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут представлять собой частицы, такие как микрочастицы, с максимальным размером частиц не более 1000 мкм в диаметре, предпочтительно не более примерно 600 мкм в диаметре, и еще более предпочтительно - не менее примерно 250 мкм в диаметре. В одном аспекте максимальный размер частиц может включать в себя размер не менее чем примерно 1500 мкм в диаметре, 1400 мкм в диаметре, 1300 мкм в диаметре, 1200 мкм в диаметре, 1100 мкм в диаметре, 1000 мкм в диаметре, 900 мкм в диаметре, 800 мкм в диаметре, 700 мкм в диаметре, 600 мкм в диаметре или 500 мкм в диаметре. В другом аспекте минимальная частица может быть не менее чем примерно 2,5 мкм в диаметре, 5 мкм в диаметре, 10 мкм в диаметре, 15 мкм в диаметре, 20 мкм в диаметре, 25 мкм в диаметре, 50 мкм в диаметре, 75 мкм в диаметре, 100 мкм в диаметре, 125 мкм в диаметре, 150 мкм в диаметре, 175 мкм в диаметре, 200 мкм в диаметре, 225 мкм в диаметре, 250 мкм в диаметре, 300 мкм в диаметре, 350 мкм в диаметре или 400 мкм в диаметре. В еще одном аспекте минимальный и максимальный диаметры выбирают из вышеуказанных групп, и разница между минимальным диаметром частицы и максимальным диаметром частицы составляет не более чем примерно 100 мкм, 125 мкм, 150 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм или 600 мкм. Отчасти максимальный диаметр частиц, минимальный диаметр частиц и разницу между

минимальным и максимальным диаметрами частиц можно оптимизировать для достижения максимальной доставки пептида, специфичного к рецептору меланокортина, в область ЖКХ, подлежащую лечению.

В некоторых вариантах осуществления пептид, специфичный к рецептору меланокортина, предпочтительно - MC1r-специфичный циклический пептид, или его фармацевтически приемлемую соль составляют в форму с pH-зависимым высвобождением. Альтернативно, такие пептиды составляют в форме, которая высвобождает пептиды в определенной области ЖКТ, такой как двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, подвздошная кишка, терминальный отдел подвздошной кишки, восходящая ободочная кишка, поперечная ободочная кишка, нисходящая ободочная кишка, сигмовидная кишка или прямая кишка. В одном аспекте композиция может содержать инертный носитель, на который нанесен MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, и энтеросолюбильное покрытие, которое высвобождает пептид при определенном pH (таком как pH 5 или pH 7). В одном аспекте предпочтительный pH для высвобождения в двенадцатиперстной кишке или тощей кишке составляет pH 4,5-5,5 или pH 5,5-6,5. В другом аспекте предпочтительный pH для высвобождения в подвздошной кишке, терминальной подвздошной кишке или ободочной кишке составляет pH 5,5-6,5 или pH 6,5-7,5. Если используется инертный носитель, то он может включать, но не ограничивается ими, маннит, лактозу, микрокристаллическую целлюлозу или крахмал.

Для некоторых вариантов осуществления и показаний ВЗК, таких как ЯК, желательно использовать пероральный композит, который начинает высвобождение активного лекарственного средства, такого как MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, при pH, равном примерно 5,5, но не высвобождает более чем 20% активного лекарственного средства при pH 5,5 и высвобождает не менее чем 80% активного лекарственного средства при pH выше примерно 6,0 или альтернативно - примерно 6,5, в течение периода более двух часов, но менее семи часов, предпочтительно в течение периода от примерно четырех до примерно семи часов.

В другом варианте осуществления MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль составляют в матричной частице или микрочастице, такой как смесь полимеров замедленного высвобождения или смесь полимеров с pH-зависимым высвобождением, размещенных внутри капсулы, причем капсула может

дополнительно включать изолирующее покрытие или энтеросолюбильное покрытие, или и то, и другое. Полимер с pH-зависимым высвобождением может включать смесь полимеров, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75. Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D могут быть микрочастицами с максимальным размером частиц не более 1000 мкм в диаметре, предпочтительно с диаметром не более примерно 600 мкм, и еще более предпочтительно с диаметром не менее примерно 25 мкм, или с диаметром не менее примерно 250 мкм.

В другом варианте осуществления MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль приготовлены в форме частиц или таблеток, которые включают ядро таблетки, изолирующее покрытие и энтеросолюбильное покрытие, где ядро таблетки включает один или несколько фармацевтически приемлемых формообразующих и MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемую соль. В качестве примера, а не ограничения, состав ядра таблетки может включать сахарный спирт, такой как арабит, эритрит, глицерин, изомальт, лактит, мальтит, маннит, сорбит или ксилит, или микрокристаллическую целлюлозу с любым требуемым средним размером частиц, таким как примерно 50 мкм, примерно 100 мкм, примерно 250 мкм, или любым требуемым средним размером частиц, предпочтительно менее примерно 1000 мкм. Таблетка или другой состав могут дополнительно включать фармацевтически приемлемые формообразующие, такие как повидон, лаурилсульфат натрия, натрия гликолят крахмала, цитратная соль, такая как цитрат натрия, или стеарат магния. Такие формообразующие включают агенты, которые могут служить поверхностно-активным веществом, разрыхлителем, смазкой или связующим. Таким образом, можно использовать обычные фармацевтические связующие, такие как повидон, разбавители, вещества, способствующие скольжению, наполнители, такие как микрокристаллическая целлюлоза, смазывающие вещества, такие как стеарат магния, разрыхлители, такие как натрийкроскармеллоза, консерванты, красители и т.п.

2.2 Композиции, составы и способы, раскрытые в данном документе, могут использоваться как для медицинских применений, так и для применений в животноводстве или ветеринарии. Обычно эти способы применимы к людям, но могут также применяться и к другим млекопитающим. Термин «пациент» обозначает млекопитающего индивидуума и используется в этом значении в описании и в формуле

изобретения. Основные применения настоящего изобретения касаются пациентов-людей, но настоящее изобретение можно применять и к лабораторным, сельскохозяйственным, содержащимся в зоопарке, диким, домашним, спортивным или другим животным. Клинические показания и особые полезные свойства включают следующее:

Пептиды, композиции, составы и способы настоящего изобретения направлены на лечение ВЗК, включая, но не ограничиваясь ими, ЯК и болезнь Крона, у субъекта. В другом аспекте воспалительное заболевание включает форму ВЗК, такую как болезнь Крона, ЯК, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, воспаление в отключенной кишке, синдром Бехчета, инфекционный колит и неуточненный колит.

Экспрессия различных цитокинов увеличивается во время воспалительного процесса, включая воспалительный процесс, вторичный или сопровождающий определенные формы ВЗК. ФНО- α - это плеiotропный цитокин, вырабатываемый в основном макрофагами, а также другими типами клеток. Другие цитокины, уровень которых увеличиваются во время воспалительного процесса, включают ИЛ-1 и ИЛ-6. Хотя цитокины, такие как ФНО- α , во многих случаях обладают благоприятным действием, их значительно повышенные уровни или повышенные уровни в течение значительного периода времени могут оказывать патологическое воздействие.

В одном варианте осуществления изобретение направлено на способы применения одного или нескольких пептидов настоящего изобретения для снижения продуцирования и экспрессии провоспалительных цитокинов, включая снижение продуцирования и экспрессии провоспалительных цитокинов, вторичных по отношению к ВЗК. Снижение продуцирования и экспрессии провоспалительных цитокинов, включая, без ограничения, один или несколько из ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6, предпочтительно происходит в течение короткого периода времени после высвобождения пептида из композиции в очаге заболевания, такого как ВЗК.

В родственном варианте осуществления изобретение направлено на способы применения одного или нескольких пептидов настоящего изобретения для повышения продуцирования и экспрессии противовоспалительных цитокинов. Повышение продуцирования и экспрессии противовоспалительных цитокинов, включая, без ограничения, ИЛ-10, происходит предпочтительно в течение короткого периода времени после высвобождения пептида из композиции в очаге заболевания, такого как ВЗК.

В целом, фактическое количество МС1г-специфичного циклического пептида или его фармацевтически приемлемой соли, вводимое пациенту, будет изменяться в довольно

широких пределах в зависимости от способа введения, используемого состава и желаемого ответа. Лечебная дозировка представляет собой введение любым из вышеуказанных приемов или любыми другими путями, известными в данной области, в количестве, достаточном для достижения желаемого терапевтического эффекта. Таким образом, терапевтически эффективное количество включает количество пептида или фармацевтической композиции настоящего изобретения, которое достаточно для терапевтического облегчения ВЗК у пациента, или для предотвращения или отсрочки начала или рецидива ВЗК, включая ЯК и болезнь Крона, или для того, чтобы быть профилактически эффективным или предотвращающим для предотвращения или ограничения рецидивов обострений ВЗК, включая ЯК и болезнь Крона.

В целом, МС1г-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, используемые при осуществлении изобретения, являются высокоактивными. Например, циклический пептид можно вводить в просвет желудочно-кишечного тракта, например, в просвет ободочной или толстой кишки, предпочтительно в месте, ближайшем к очагу ВЗК или другого заболевания, в количестве примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 50, 100, 500, 1000 или 5000 мкг/кг веса тела, в зависимости от конкретного выбранного пептида, состава для доставки, желаемого терапевтического ответа и других факторов, известных специалистам в данной области.

3.0 Комбинированная терапия при определенных показаниях.

Пептиды, композиции и способы настоящего изобретения можно использовать для лечения ВЗК, ЯК или болезни Крона или любого заболевания, показания, состояния или синдрома ЖКТ, опосредованного МС1г или связанного с его ответом, путем введения в сочетании с одним или несколькими другими фармацевтически активными соединениями. Такое совместное введение может осуществляться с помощью стандартной лекарственной формы, которая включает помимо пептида настоящего изобретения еще одно другое фармацевтически активное соединение, причем такая стандартная лекарственная форма включает таблетку или капсулу. Альтернативно, совместное введение можно осуществлять путем введения двух разных лекарственных форм, при этом одна лекарственная форма содержит пептид настоящего изобретения, а другая лекарственная форма включает другое фармацевтически активное соединение. В этом случае лекарственные формы могут быть одинаковыми или разными. Термин «совместное введение» означает, что каждое из по меньшей мере двух соединений в комбинированной терапии вводится в течение периода времени, в котором соответствующие периоды их

биологической активности или действия перекрываются. Таким образом, термин включает последовательное, а также одновременное введение соединений, где одно соединение представляет собой один или несколько пептидов настоящего изобретения. Если одновременно вводят более одного соединения, пути введения двух или более соединений не обязательно должны быть одинаковыми. Не имея намерения ограничить типы комбинированной терапии, нижеследующее иллюстрирует некоторые комбинированные терапии, которые можно использовать.

Для лечения заболеваний, связанных с воспалением, показаний, состояний и синдромов ЖКТ, пептиды настоящего изобретения можно использовать в комбинированной терапии, в том числе путем совместного введения с одним или несколькими противовоспалительными агентами. Один класс противовоспалительных средств - глюкокортикоиды, включает, но не ограничивается ими, кортизон, включая кортизона ацетат, гидрокортизон, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон, триамцинолон, беклометазон, преднизон, флуоидокортизона ацетат, дезоксикортикостерона ацетат и альдостерон. Другой класс противовоспалительных средств - аминосалицилаты, включает, но не ограничивается ими, 5-аминосалициловую кислоту, такую как месаламин, бальсалазид и олсалазин.

Другие противовоспалительные средства, которые можно использовать в комбинированной терапии, в том числе путем совместного введения, включают аспирин, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) (такие как ибупрофен и напроксен), ингибиторы ФНО- α (такие как тенитап и рапамицин или их производные), или антагонисты ФНО- α (например, инфликсимаб, OR1384), ингибиторы циклооксигеназы (т.е. ингибиторы ЦОГ-1 и/или ЦОГ-2), агонисты/антагонисты CTLA4-Ig, антагонисты лиганда CD40, ингибиторы IMPDH, такие как микофенолат, антагонисты интегрина, антагонисты интегрина альфа-4, бета-7, ингибиторы клеточной адгезии, антагонисты интерферона гамма, ICAM-1, ингибиторы синтеза простагландина, будесонид, клофазимин, ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы p38, ингибиторы протеинтирозинкиназы (ПТК), ингибиторы ИКК, другие терапевтические средства для лечения синдрома раздраженного кишечника (например, такие, которые описаны в патенте США № 6184231), или другие ингибиторы NF- κ B, такие как кортикостероиды, калфостин, CSAID, 4-замещенные имидазо[1,2-a]хиноксалины, как раскрыто в патенте США № 4200750; Интерлейкин-10, салицилаты, оксид азота и другие иммунодепрессанты; и ингибиторы ядерной транслокации, такие как дезоксиспергуалин.

Иммунодепрессанты, которые можно вводить совместно, включают азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин и метотрексат. Совместное введение можно также использовать с ингибиторами фактора некроза опухоли (ФНО)-альфа, такими как инфликсимаб, адалимумаб и голимумаб. Другие биологические терапии, пригодные для использования, включают натализумаб, ведолизумаб и устекинумаб. Совместное введение также можно использовать с ингибиторами протонного насоса (такими как омепразол, пантопразол, эзомепразол, лансопразол, рабепразол, декслансопразол, рабепразол натрия, омепразол магния, пантопразол натрия, напроксен/эзомепразол, эзомепразол магния, эзомепразол натрия или омепразол/бикарбонат ион) или с антибиотиками для контроля избыточного бактериального роста в тонком кишечнике (такими как рифаксимин или неомицин).

4.0 Способы составления многочастичных лекарственных форм для доставки.

В одном аспекте пептиды, используемые в настоящем изобретении, включая MС1г-специфичные пептиды, составлены для пероральной доставки интактного пептида в просвет ЖКТ, предпочтительно в просвет нижних отделов ЖКТ, и более предпочтительно до и непосредственно перед любым очагом заболевания, например ВЗК, в ЖКТ. Доставка лекарств в нижние отделы ЖКТ, минуя желудок и верхние отделы ЖКТ, такие как тонкий кишечник, требуется для многих молекул лекарственных средств, особенно белковых лекарственных средств, содержащих белки или пептиды. Ротовая полость и желудок содержат различные ферменты, которые могут разрушить аминокислотные цепи. Тонкий кишечник вырабатывает множество пептидаз, которые могут укорачивать аминокислотные цепи, включая пептиды, до единиц малого размера, включая дипептиды и отдельные аминокислотные остатки, которые могут всасываться и перевариваться. Таким образом, для доставки интактных пептидов в просвет нижних отделов ЖКТ, включая ободочную кишку, необходимо использовать способ и состав, которые проходят через желудок и верхние отделы ЖКТ без пептидной деградации. Этот подход также можно использовать, если пептид нестабилен в кислой среде желудка из-за рН или ферментативной активности.

Существует несколько подходов, которые можно концептуально использовать для достижения нацеливания на нижние отделы ЖКТ, включая использование пролекарств, покрытие рН-чувствительными полимерами, разработку лекарственных форм с замедленным высвобождением или использование биоразлагаемых полимеров, таких как

азополимеры и полисахариды, которые разлагаются исключительно бактериями ободочной кишки. У каждой системы есть свои достоинства и недостатки.

Недостатком однократных лекарственных форм для доставки в ободочную кишку может быть преждевременная дезинтеграция состава из-за высокой меж- и интра-индивидуальной вариабельности и плохой воспроизводимости, что может привести к потере местного терапевтического действия в ободочной кишке. Преимуществом многочастичных систем доставки заключаются в улучшенной биодоступности, снижении риска местного раздражения и предсказуемом опорожнении желудка.

Таким образом, в одном аспекте изобретение обеспечивает лекарственные формы в виде частиц, содержащие пептид, специфичный к рецептору меланокортина, такой как MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, причем такая форма в виде частиц защищает пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль во время нахождения в кислой среде желудка и предотвращает или ограничивает деградацию протеазы в тонком кишечнике или верхнем отделе ЖКТ, но высвобождает интактный пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль в нижних отделах ЖКТ, таких как толстый кишечник или ободочная кишка. Таким образом, пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль связывается с одним или несколькими рецепторами MC, предпочтительно с MC1r, которые находятся на или в просвете нижних отделов ЖКТ, включая толстую кишку или ободочную кишку, или в непосредственной близости от просвета нижних отделов ЖКТ, включая толстую кишку или ободочную кишку, и действует как агонист, тем самым оказывая терапевтический эффект.

Этот подход может быть применен с использованием микрочастиц с замедленным высвобождением (энтеросолюбильных) с использованием pH-чувствительных сополимеров метилметакрилата и метакрила. Одной из форм pH-чувствительных сополимеров метилметакрилата/метакрила, пригодных для использования, являются полимеры Eudragit®, производимые Evonik Industries, при этом подразумевается, что в данном изобретении допускается использование других и отличающихся pH-чувствительных сополимеров метилметакрилата/метакрила и других и отличающихся pH-чувствительных полимеров или сополимеров.

Массовая доля пептида, специфичного к рецептору меланокортина, может составлять от примерно 0,1% до примерно 30% от веса pH-чувствительных частиц с

замедленным высвобождением. Предпочтительно, массовая доля пептида, специфичного к рецептору меланокортина, составляет от примерно 1% до примерно 10%, или от примерно 2% до примерно 5% от веса pH-чувствительных частиц с замедленным высвобождением.

Частицы или микрочастицы можно вносить в капсулы, такие как твердые желатиновые капсулы, или их можно составлять в виде таблеток, шариков, гранул, порошков, каплет, лепешек, саше, облаток, пакетов, жевательных резинок, орошателей и суспензий или т.п. В одном аспекте, если частицы, содержащие пептид, специфичный к рецептору меланокортина, предпочтительно - MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемую соль, и pH-чувствительные сополимеры метилметакрилата/метакрила, составлены в твердую форму, такую как капсула или таблетка, капсула или таблетка могут быть покрыты изолирующим покрытием или энтеросолюбильным покрытием, или и тем, и другим. В общем, любые твердые формы доставки лекарственного средства, включая таблетки, шарики, гранулы, каплеты и т.п., могут быть покрыты изолирующим покрытием или энтеросолюбильным покрытием, или и тем, и другим. Энтеросолюбильные покрытия могут содержать чувствительные к pH сополимеры метилметакрилата и метакрила.

В одном аспекте изобретение относится к составу, лекарственной форме и способу, в которых менее 10% активного лекарственного средства, такого как пептид, специфичный к рецептору меланокортина, MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль, высвобождается при кислотном pH от примерно 1 до примерно 3 в течение двух часов, менее чем дополнительные 10% активного лекарственного средства высвобождается при кислотном pH от примерно 4,5 до 5,5 за период в один час, и не менее 80% активного лекарственного средства высвобождается при pH выше примерно 6 за период от четырех до семи часов.

Особенно полезными в изобретении являются pH-зависимые полиметакрилаты, такие как Eudragit® L100-55, Eudragit® L100, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D. Эти полиметакрилаты включают:

Eudragit® L100-55: Твердое вещество. Продукт содержит 0,7% лаурилсульфата натрия, Евр. Фармакопея / NF и 2,3% полисорбата 80, Евр. Фармакопея / NF на твердое вещество. Eudragit® L100-55 содержит анионный сополимер на основе метакриловой кислоты и этилакрилата. Отношение свободных карбоксильных групп к сложноэфирным группам составляет примерно 1:1. Мономеры случайным образом распределены по цепи

сополимера. Согласно методу эксклюзионной хроматографии средневзвешенная молярная масса (Mw) Eudragit® L100-55 составляет примерно 320000 г/моль.

Eudragit® L100: Твердое вещество. Продукт содержит 0,3% лаурилсульфата натрия Евр. Фармакопея / NF на твердое вещество. Eudragit® L100 - это анионный сополимер на основе метакриловой кислоты и метилметакрилата. Отношение свободных карбоксильных групп к сложноэфирным группам составляет примерно 1:1 в Eudragit® L100. Согласно методу эксклюзионной хроматографии средневзвешенная молярная масса (Mw) Eudragit® L100 составляет примерно 125000 г/моль.

Eudragit® S100: Твердое вещество. Продукт содержит 0,3% лаурилсульфата натрия Евр. Фармакопея / NF на твердое вещество. Eudragit® S100 - это анионный сополимер на основе метакриловой кислоты и метилметакрилата. Отношение свободных карбоксильных групп к сложноэфирным группам составляет примерно 1:2 в Eudragit® S100. Согласно методу эксклюзионной хроматографии средневзвешенная молярная масса (Mw) Eudragit® S100 составляет примерно 125000 г/моль.

Eudragit® FS30D: Поставляется в виде водной дисперсии с содержанием сухого вещества 30%. Вода проходит испытания в соответствии со спецификациями «Вода очищенная ангро», Евр. Фармакопея, и в соответствии со спецификациями по проводимости «очищенной воды», Фармакопея США. Дисперсия содержит 0,3% лаурилсульфата натрия, Евр. Фармакопея / NF и 1,2 % полисорбата 80, Евр. Фармакопея / NF на твердое вещество, в качестве эмульгаторов. Eudragit® FS30D - это водная дисперсия анионного сополимера на основе метилакрилата, метилметакрилата и метакриловой кислоты. Отношение свободных карбоксильных групп к сложноэфирным группам составляет примерно 1:10. Мономеры случайным образом распределены по цепи сополимера. Согласно методу эксклюзионной хроматографии средневзвешенная молярная масса (Mw) Eudragit® FS30D составляет примерно 280000 г/моль.

1 г Eudragit® L100, Eudragit® L100-55 или Eudragit® S100 растворяется в 7 г метанола, этанола, в водном изопропиловом спирте и ацетоне (содержащем примерно 3% воды), а также в 1 н. гидроксиде натрия с образованием растворов от прозрачного до мутного. Эти конкретные препараты Eudragit® практически не растворимы в этилацетате, метиленхлориде, петролейном эфире и воде. Eudragit® L100-55 растворяется при pH выше 5,5; Eudragit® L100 растворяется при pH выше 6,0; Eudragit® S100 растворяется при pH выше 7,0 и Eudragit® FS30D растворяется при pH выше 7,0.

Для капсулирования лекарств используют различные методики. В одном аспекте можно использовать образование микрочастиц посредством твердой дисперсии с последующей микронизацией, что просто и обеспечивает высокую эффективность инкапсуляции и высокий выход.

Для изготовления лекарственного продукта пептид, специфичный к рецептору меланокортина - MС1г-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль - можно диспергировать в подходящем растворителе, таком как ацетон, метанол или вода, или в комбинациях некоторых из них или всех вышеперечисленных растворителей. Сополимер или сополимеры Eudragit® можно растворять в метаноле или ацетоне. Дисперсию лекарственного средства, содержащую пептид, добавляют к раствору сополимера при перемешивании. Затем полученную смесь сушат в вакууме, измельчают и просеивают через подходящее сито. В одном аспекте используют сита с размером ячеек 30 меш над ситом размером 60 меш, при этом размер получаемых частиц, собранных на сите с размером ячеек 60 меш, составляет от 250 до 600 мкм в диаметре. В другом аспекте частицы, собранные на сите размером 60 меш, суспендируют или промывают 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты с рН 1,2 для удаления поверхностных молекул лекарственного средства пептида MС1г и затем сушат. Полученные микрочастицы можно инкапсулировать или таблетировать. Наполненные капсулы или таблетки также могут иметь энтеросолюбильное покрытие для дальнейшего уменьшения количества лекарственного средства, высвобождаемого в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, что позволяет большему количеству лекарственного средства достичь ободочной кишки.

Альтернативно, можно использовать метанол, метанол-воду (например, смесь 2:1) и воду в качестве растворителя/дисперсионной среды для пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемых солей. Альтернативно, в качестве растворителя/дисперсионной среды можно использовать ацетон или ацетон-воду. В одном аспекте, если используется вода, ее количество не должно превышать примерно 3% от количества ацетона, используемого для растворения сополимера(ов).

Составы, используемые в изобретении, в одном варианте могут включать полимеры Eudragit®, такие как, например, L100-55, которые растворимы и высвобождают связанный пептид при более низком рН, в сочетании с полимерами, которые растворимы и высвобождают связанный пептид при более высоком рН, такими как Eudragit® S100 или FS30D, или и тот и другой. Эта смесь обеспечивает высвобождение в более широком

интервале pH. Высвобождение в более широком интервале pH превосходит составы предшествующего уровня техники для высвобождения в ободочной кишке при одном определенном pH, потому что это позволяет частичное высвобождение выше в ЖКТ, где может протекать заболевание у некоторых пациентов, а также потому, что оно обеспечивает высвобождение в отделе ЖКТ у пациентов с более низким pH в ЖКТ, чем у нормальных субъектов, при этом более низкое значение pH связано с течением ВЗК. При желании, как в случае более низкого pH в ЖКТ при некоторых течениях ВЗК, различные полимеры Eudragit® (например, Eudragit® L100-55) можно частично нейтрализовать и/или можно вносить другие добавки, такие как альгиновая, сорбиновая или янтарная кислота или их соли, чтобы увеличить высвобождение лекарства при более низком pH, таком как 4,5-5,5. Использование профиля высвобождения в широком интервале pH в сочетании с пептидом, специфичным к рецептору меланокортина, который связывается с рецепторами, присутствующими на поверхности просвета ЖКТ или внутри нее, вместо терапевтического эффекта за счет системной абсорбции, обеспечивает терапевтическое средство, подходящее для лечения более широкого круга пациентов. Таким образом, поскольку системная абсорбция пептида, специфичного к рецептору меланокортина, незначительна или отсутствует, а терапевтическая польза от какой-либо возможной системной абсорбции незначительна или отсутствует, препарат предпочтительно предназначен для обеспечения благоприятного воздействия в том отделе ЖКТ, где есть или может находиться очаг заболевания, и для обеспечения достаточной дозировки в таком отделе, тем самым вызвать ремиссию или излечение ВЗК. Особенно важно отметить, что поскольку системная абсорбция пептида, специфичного к рецептору меланокортина, незначительна или отсутствует, то незначительны или отсутствуют и системная токсичность или системные нежелательные явления, которые ограничивают количество пептида, специфичного к рецептору меланокортина, которое может быть доставлено в просвет ЖКТ.

В некоторых вариантах осуществления используются комбинации различных pH-чувствительных сополимеров метилметакрилата/метакрила, составленные в виде (энтеросолюбильных) частиц или микрочастиц с замедленным высвобождением. В некоторых вариантах осуществления частицы или микрочастицы содержат Eudragit® L100-55 и Eudragit® S100 в массовом отношении L100-55 к S-100 примерно 1:1, или примерно 2:3, или примерно 1:2, или примерно 3:2, или примерно 2:1. В других вариантах осуществления частицы или микрочастицы содержат Eudragit® L100-55, Eudragit® L100 и

Eudragit® S100 в массовом отношении L100-55 к L100 к S-100, равном примерно 1:1:1, или примерно 4:3:3, или примерно 3:4:3, или примерно 1:1:1, или примерно 1:2:1, или примерно 1:2:2, или примерно 2:1:1, или примерно 2:2:1 или примерно 2:1:2. В других вариантах осуществления частицы или микрочастицы содержат Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, равном примерно 6:6:1, или примерно 23,35:23:3,75, или примерно 5:5:1, или примерно 4:4:1, или примерно 6:5:1, или примерно 5:6:1, или примерно 3:3:1, или примерно 6:5:2, или примерно 5:6:2. Особенно предпочтительно массовое отношение L100-55 к S100 к FS30D, равное примерно 6:6:1 или примерно 23,25:23:3,75.

Количество пептида, специфичного к рецептору меланокортина, в пересчете на вес рН-чувствительных полимеров замедленного высвобождения может составлять от примерно 0,1% до примерно 30%. Предпочтительно, массовая доля пептида, специфичного к рецептору меланокортина, составляет от примерно 1% до примерно 10%, или от примерно 2% до примерно 5% от веса рН-чувствительных полимеров замедленного высвобождения.

В общем случае, твердые формы пептида, специфичного к рецептору меланокортина, размещенные внутри полимерной матрицы с рН-зависимым высвобождением, можно готовить способами, описанными в данном документе, или с помощью методик, которые включают, но не ограничиваются этим, нагревание, охлаждение, сублимационную сушку, распылительную сушку, лиофилизацию, быстрое испарение растворителя, перекристаллизацию из растворителя, индуцированное микроволновым излучением осаждение, индуцированное ультразвуком осаждение и т.п. Размер частиц получаемых твердых форм, который может варьироваться, например, от минимальных размеров примерно 25 мкм или больше до максимальных размеров примерно 1000 мкм в диаметре или меньше, можно контролировать, например, с помощью методик для уменьшения размера частиц, включая измельчение, размол, микронизацию или обработку ультразвуком, с просеиванием через подходящие сита или без них, или другие способы, известные в данной области техники, для выбора желаемых пределов размера частиц от установленного минимума до установленного максимума. В одном аспекте размер получаемых частиц характеризуется диаметром менее примерно 1000 мкм или диаметром менее примерно 600 мкм, и диаметром более примерно 25 мкм или диаметром более примерно 250 мкм.

5.0 Энтеросолюбильные покрытия.

В одном аспекте пептид, специфичный для рецептора меланокортина, MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль составлены для пероральной доставки, например, в форме капсулы или таблетки. Пептид можно составлять таким образом, чтобы пептид был в форме капсулы или таблетки, заключенной в защитное от кишечной среды средство, предпочтительно так, чтобы пептид не высвобождался до тех пор, пока таблетка или капсула не прошла через желудок, и, необязательно, затем прошла весь или часть тонкого кишечника. В контексте этой заявки будет понятно, что термин энтеросолюбильное покрытие или материал относится к покрытию или материалу, который будет проходить через желудок практически неповрежденным, но будет быстро распадаться в кишечнике, предпочтительно, но не ограничиваясь этим, в толстой кишке с высвобождением активного пептидного лекарственного вещества. Один раствор энтеросолюбильного покрытия, пригодного для использования, включает фталат ацетата целлюлозы и, необязательно, другие ингредиенты, такие как гидроксид аммония, триацетин, этиловый спирт, метиленовый синий и очищенную воду. Фталат ацетата целлюлозы представляет собой полимер, который можно использовать для энтеросолюбильного покрытия отдельных лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы, и он не растворяется в воде при pH от ниже чем примерно 5,5 до примерно 6,0. Энтеросолюбильные покрытия, включая фталат ацетата целлюлозы, обеспечивают защиту от кислой среды желудка, но начинают растворяться в среде двенадцатиперстной кишки (pH примерно 6-6,5) и полностью растворяются к тому времени, когда лекарственная форма достигает подвздошной кишки (pH примерно 7-8). Кроме фталата ацетата целлюлозы известны другие материалы для энтеросолюбильного покрытия, которые можно использовать в настоящем изобретении, включая, без ограничения, сукцинат гидроксипропилметилэтилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат поливинилацетата и сополимер метакриловой кислоты и метилметакрилата. Используемое энтеросолюбильное покрытие способствует растворению лекарственной формы, прежде всего, вне желудка, и может быть выбрано таким образом, чтобы энтеросолюбильное покрытие растворялось при pH не ниже примерно 6,0, более предпочтительно - при pH от примерно 6,0 до примерно 8,0. В одном предпочтительном аспекте энтеросолюбильное покрытие растворяется и разрушается вблизи подвздошной кишки.

В некоторых вариантах осуществления пептид, специфичный к рецептору меланокортина, MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически

приемлемую соль составляют в капсулу или таблетку, заполненную частицами и имеющую внешнее покрытие, причем такое покрытие необязательно содержит или состоит из полимера, который стабилен при низких pH, таких как $\text{pH} \leq 6,0$, но который растворяется при pH выше примерно 6,0. Внешнее покрытие может дополнительно содержать или состоять из полимера, который стабилен в кислых условиях, в том числе в желудке, но может растворяться при более высоком pH, таком как pH в просвете ободочной кишки. Также предпочтительно и предполагается, что скорость растворения покрытия может изменяться в зависимости от желаемых параметров высвобождения.

Внешнее покрытие может, в качестве примера, но не ограничения, состоять из полимера или включать полимер, чувствительный к определенным интервалам pH, и который растворим в таких интервалах pH, включая полимеры, такие как поли(мет)акрилат. В одном аспекте внешнее покрытие состоит из или включает один или несколько полимеров или сополимеров, несущих анионную группу или группу, которая может быть преобразована в анионную группу. В другом аспекте внешнее покрытие состоит из или включает еще один сополимер (мет)акрилата, несущий катионную группу или группу, которая может быть преобразована в катионную группу, вместе с одним или несколькими полимерами или сополимерами, несущими анионную группу или группу, которую можно преобразовать в анионную группу. Некоторые такие полимеры, сополимеры и (мет)акрилатные сополимеры описаны в патенте США 9237760, включенном в данный документ ссылкой так, как если бы он был изложен полностью. Таким образом, энтеросолюбильное покрытие может быть акрилатным полимером, таким как Eudragit® S100 или Eudragit® L100. Eudragit® S100 растворяется при pH примерно 7,0, в то время как Eudragit® L100 растворяется при pH примерно 6,0. Любое из вышеуказанных энтеросолюбильных покрытий можно использовать с вышеуказанными составами, включая, без ограничений, составы, которые содержат состав из множества частиц Eudragit®.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, включая капсулу или таблетку, может дополнительно содержать изолирующее покрытие. Это покрытие может препятствовать проникновению влаги в таблетку. Таким образом, изолирующее покрытие может включать полимер или другой материал, который обеспечивает фармацевтически приемлемый барьер для влаги. Такие герметизирующие покрытия могут включать поливиниловый спирт и различные комбинации полимеров и пластификаторов, необязательно с желаемым пигментом.

Другие pH-зависимые полимеры, которые можно использовать в качестве энтеросолюбивых покрытий, включают, но не ограничиваются ими, энтеросолюбивые производные целлюлозы, такие как фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат ацетата целлюлозы; натуральные смолы, такие как шеллак и зеин; производные энтеросолюбивого ацетата, такие как поливинилацетатфталат, ацетатфталат целлюлозы, ацетат ацетальдегиддиметилцеллюлозы; и различные полимеры на основе полиметакрилата в дополнение к описанным выше. pH-зависимое энтеросолюбивое покрытие может также включать комбинации двух или более pH-зависимых полимеров, включая любой из вышеперечисленных.

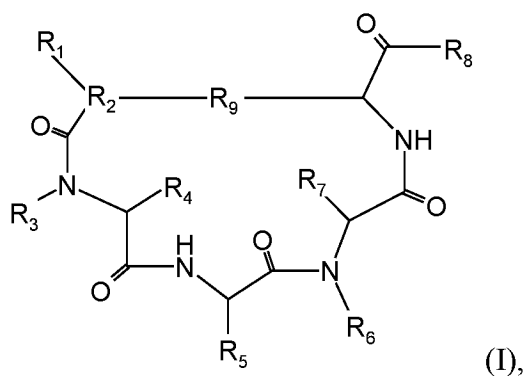
6.0 Пептиды, используемые в настоящем изобретении.

В одном аспекте изобретение относится к циклическому пептиду, который содержит сердцевинную последовательность, полученную из His-Phe-Arg в циклической части, но не содержит Trp в сердцевинной части, и где Trp или его производное или миметик (определяемый как аминокислотный остаток с боковой цепью, включающий по меньшей мере один арил или гетероарил, включая, но не ограничиваясь ими, Nal 1 или Nal 2), представляет собой аминокислотный остаток непосредственно за циклической частью на С-конце. В одном аспекте используется последовательность His-Phe-Arg-Xaa⁶-Trp (SEQ ID NO:1), где Xaa⁶ представляет собой аминокислоту, причем ее боковая цепь образует циклический мостик с любой боковой цепью другой аминокислоты пептида.

Сердцевинная последовательность, полученная из His-Phe-Arg-Xaa⁶-Trp (SEQ ID NO:1) может содержать несколько замен. Положение His может представлять собой His или может представлять собой замещенный или незамещенный Pro или аминокислоту с боковой цепью, содержащую по меньшей мере один первичный амин, вторичный амин, алкил, циклоалкил, циклогетероалкил, арил, гетероарил, спирт, простой эфир, сульфид, сульфон, суфоксид, карбамоил или карбоксил. Замещенный Pro, включает, но не ограничивается ими, аминокислоты, такие как Hyp, Hyp(Bzl), Pro(4R-Bzl) или Pro(4R-NH₂). Положение Phe может представлять собой Phe, но чаще всего это замещенный или незамещенный D-Phe, D-Nal 1, D-Nal 2 или аминокислота с боковой цепью, включая пиридил. Положение Arg может представлять собой Arg, Lys, Orn, Dab или Dar, или замещенный или незамещенный Pro, или Cit, или может представлять собой аминокислоту с боковой цепью, содержащую по меньшей мере один первичный амин, вторичный амин, гуанидин, мочевины, алкил, циклоалкил, циклогетероалкил, арил, гетероарил или простой

эфир. Хаа⁶ может представлять собой аминокислоту с боковой цепью, включая первичный амин, такой как Lys, Orn, Dab, Dar, аминокислоту с карбоксильной группой, такую как Asp, Glu или hGlu, или аминокислоту с дисульфидной группой, такую как Cys или Pen, в зависимости от природы циклического мостика. Положение Trp может представлять собой аминокислоту с боковой цепью, содержащую по меньшей мере один замещенный или незамещенный арил или гетероарил, такую как Trp, Nal 1 или Nal 2.

В одном аспекте в изобретении используется состав, содержащий циклический пептид формулы (I):



включая все его энантиомеры, стереоизомеры или диастереоизомеры, или фармацевтически приемлемую соль любого из вышеперечисленных соединений,

где:

R₁ представляет собой -H, -NH-R₁₀, -NH-R₁₀-R₁₁ или -NH-R₁₁;

R₂ представляет собой -CH- или -N-;

R₃ представляет собой -H, -CH₃ или -CH₂-, и если это -CH₂-, то вместе с R₄ образует

кольцо с общей структурой ;

R₄ представляет собой -H, -(CH₂)_z-, если R₃ представляет собой -CH₂-, и если это -(CH₂)_z-, то вместе с R₃ образует кольцо, где любой H в -(CH₂)_z- необязательно замещен R₁₂, или R₄ представляет собой -(CH₂)_w-R₁₃-(CH₂)_w-R₁₄, где любой H в любом из (CH₂)_w необязательно замещен -(CH₂)_w-CH₃;

R₅ представляет собой -(CH₂)_w-R₁₅;

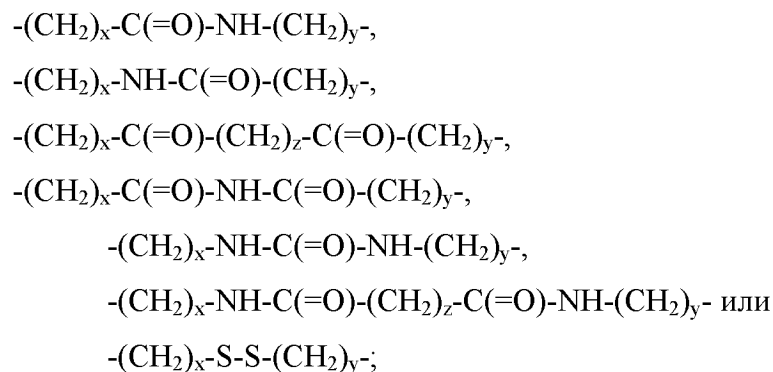
R₆ представляет собой -H, -CH₃ или -CH₂-, и если это -CH₂-, то вместе с R₇ образует

кольцо с общей структурой ;

R_7 представляет собой $-(CH_2)_z-$, если R_6 представляет собой $-CH_2-$, и если это $-(CH_2)_z-$, то вместе с R_6 образует кольцо, или R_7 представляет собой $-(CH_2)_w-R_{16}$;

R_8 представляет собой $-R_{17}-R_{18}$ или $-R_{18}$;

R_9 представляет собой

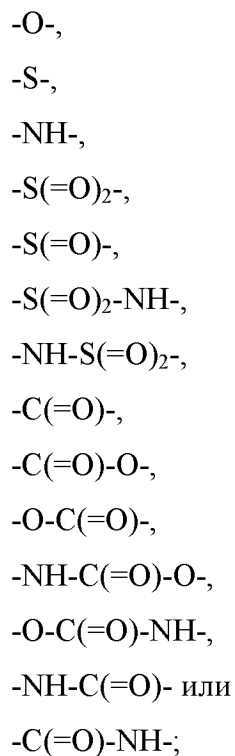


R_{10} представляет собой от одного до трех аминокислотных остатков;

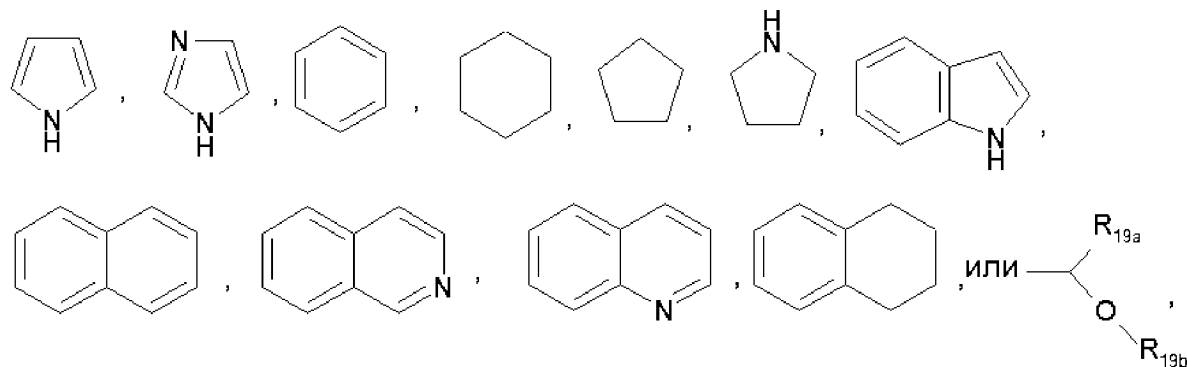
R_{11} представляет собой H или группу (C_1-C_{17}) ацила, где (C_1-C_{17}) включает в себя линейный или разветвленный алкил, циклоалкил, алкилциклоалкил, арил или алкиларил;

R_{12} необязателен и, если он присутствует, то независимо в каждом случае представляет собой $-R_{13}-(CH_2)_w-R_{14}$;

R_{13} необязателен и, если он присутствует, то независимо в каждом случае представляет собой



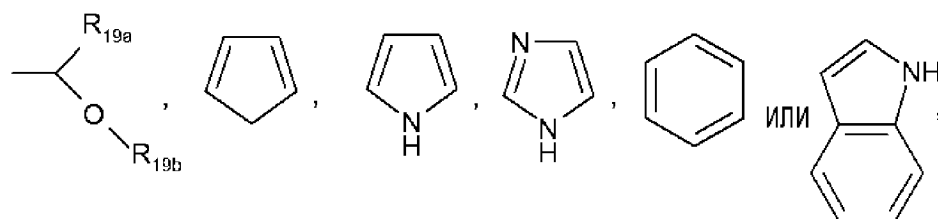
R_{14} независимо в каждом случае представляет собой $-H$, $-CH_3$, $-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-(CH_2)_z-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-CH(=NH)-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-CH(=O)-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-O(R_{19a})$, $-(R_{19a})(R_{19b})$, $-S(=O)_2(R_{19a})$, $-C(=O)-O(R_{19a})$,



где любое кольцо в R_{14} обязательно замещено одним или несколькими заместителями в кольцо, и когда один или несколько заместителей присутствуют, они одинаковы или разные и независимо друг от друга представляют собой гидроксил, галоген, сульфонамид, алкил, $-O$ -алкил, арил, $-O$ -арил, $C(=O)-OH$ или $C(=O)-N(R_{19a})(R_{19b})$;

R_{15} представляет собой фенил, нафтил или пиридил, обязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, (C_1-C_{10}) алкилгалогена, (C_1-C_{10}) алкила, (C_1-C_{10}) алкокси-группы, (C_1-C_{10}) алкилтио-группы, арила, арилокси-группы, нитро-группы, нитрила, сульфонида, аминогруппы, монозамещенной аминогруппы, дизамещенной аминогруппы, гидроксигруппы, карбоксигруппы и алкоксикарбонила;

R_{16} представляет собой $-H$, $-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-(CH_2)_z-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-CH(=NH)-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-NH-CH(=O)-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-O(R_{19a})$, линейную или разветвленную цепь C_1-C_{17} алкила, $-C(=O)-N(R_{19a})(R_{19b})$, $-S(=O)_2(R_{19a})$,



где любое кольцо необязательно замещено одним или несколькими необязательными заместителями в кольце, и если один или несколько заместителей присутствуют, то они одинаковые или разные и независимо друг от друга представляют собой гидроксил, галоген, сульфонамид, алкил, -О-алкил, арил, аралкил, О-аралкил или -О-арил;

R_{17} представляет собой от одного до трех аминокислотных остатков;

R_{18} представляет собой -ОН, -N(R_{19a})(R_{19b}), -N(R_{19a})(CH₂)_w-(C₁-C₇)циклоалкил или -О-(CH₂)_w-(C₁-C₇)циклоалкил;

каждый из R_{19a} и R_{19b} независимо представляет собой Н или линейную или разветвленную цепь (C₁-C₄)алкила;

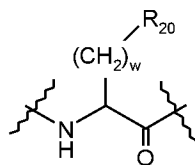
w в каждом случае независимо принимает значения от 0 до 5;

x принимает значения от 1 до 5;

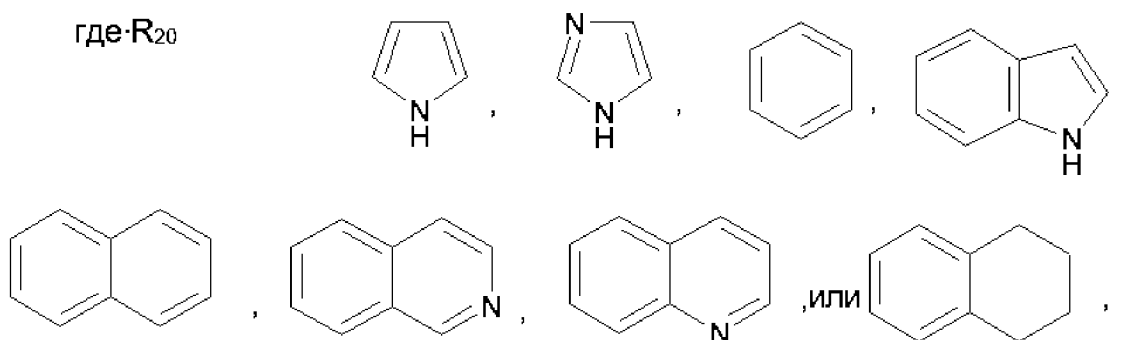
y принимает значения от 1 до 5; и

z в каждом случае независимо принимает значения от 1 до 5.

В циклическом пептиде формулы (I) R_{17} может быть единственным аминокислотным остатком формулы

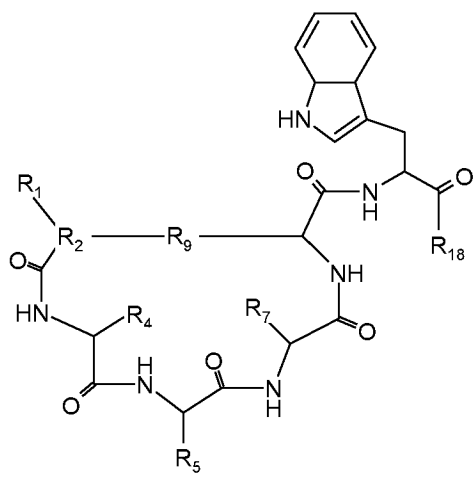


где R_{20}



необязательно замещен одним или несколькими заместителями в кольце, и если один или несколько заместителей присутствуют, они одинаковые или разные и независимо друг от друга представляют собой гидроксил, галоген, сульфонамид, алкил, -О-алкил, арил или -О-арил.

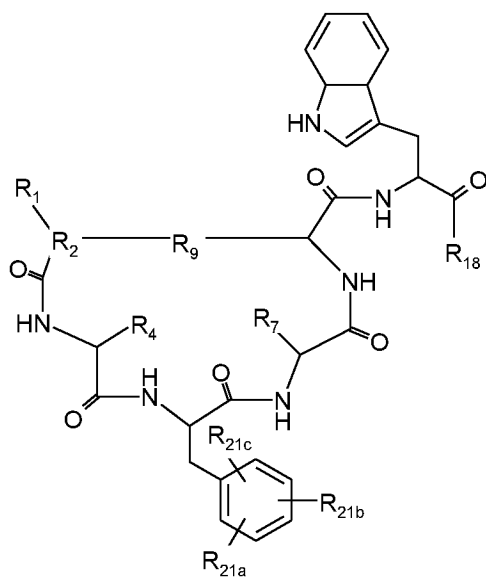
В другом аспекте изобретения используется циклический пептид формулы (II):



(II),

где переменные такие, как указано для формулы (I).

В другом аспекте изобретения используется циклический пептид формулы (III):



(III),

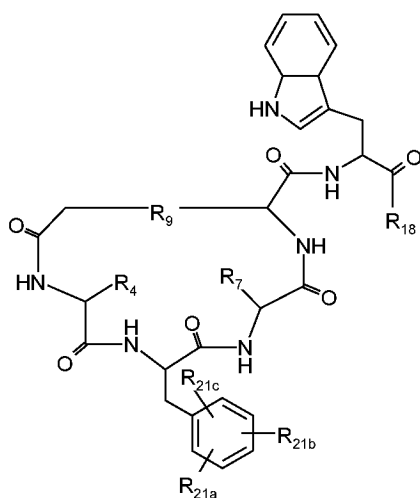
где R_{21a}, R_{21b} и R_{21c} независимо в каждом случае представляют собой водород, галоген, (C₁-C₁₀)алкилгалоген, (C₁-C₁₀)алкил, (C₁-C₁₀)алкокси-группу, (C₁-C₁₀)алкилтио-группу, арил, арилокси-группу, нитро-группу, нитрил, сульфонамид, аминогруппу, монозамещенную аминогруппу, дизамещенную аминогруппу, гидроксигруппу, карбоксигруппу или алкоксикарбонил, а все другие переменные такие, как указано для формулы (I).

В другом аспекте изобретения используется циклический пептид формулы (IV):

The chemical structure shows a 12-membered cyclic urea derivative. The ring consists of a 10-membered chain with two carbonyl groups and two secondary amide groups, connected by a urea linkage (-NH-C(=O)-NH-). The substituents on the ring are as follows:

- R₁₁**: Attached to the nitrogen atom of the urea linkage.
- R₂₂**: Attached to the carbon atom adjacent to the urea nitrogen.
- R₉**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the right side of the ring.
- R₁₈**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the left side of the ring.
- R_{21a}**, **R_{21b}**, and **R_{21c}**: Attached to the phenyl ring of the amide group on the left side of the ring.
- HN**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the right side of the ring.
- HN**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the left side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the right side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the left side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the right side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the left side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the right side of the ring.
- NH**: Attached to the carbon atom adjacent to the carbonyl group on the left side of the ring.

В другом аспекте изобретения используется циклический пептид формулы (VI):

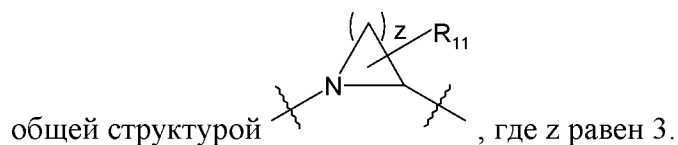


(VI),

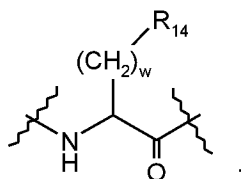
где переменные такие, как указано для циклического пептида формулы (III).

В циклическом пептиде формулы (I) R_9 может представлять собой $-(CH_2)_x-C(=O)-NH-(CH_2)_y-$, где x равен 4 и y равен 3, где x равен 3 и y равен 2, или где x равен 2 и y равен 1. В альтернативном случае, R_9 может представлять собой $-(CH_2)_x-NH-C(=O)-(CH_2)_y-$, где x равен 1 и y равен 2, где x равен 2 и y равен 3, или где x равен 3 и y равен 4.

В циклическом пептиде формулы (I) R_3 вместе с R_4 может образовывать кольцо с

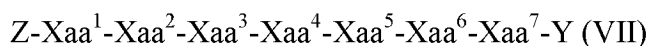


В циклическом пептиде
единственным аминокислотным



формулы (I) R_{17} может быть
остатком формулы

Таким образом, в одном аспекте изобретения можно использовать циклический пептид формулы (VII):



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

Z представляет собой H или N-концевую группу;

Xaa^1 присутствует необязательно и, если присутствует, то имеет от одного до трех L- или D-изомеров аминокислотных остатков;

Хаа² и Хаа⁶ представляют собой L- или D-изомер аминокислот, где их боковые цепи содержат циклический мостик;

Хаа³ представляет собой L- или D-Pro, необязательно замещенный гидроксилом, галогеном, сульфонамидом, алкилом, -О-алкилом, арилом, алкиларилом, алкил-О-арилом, алкил-О-алкиларилом или -О-арилом, или Хаа³ представляет собой L- или D-изомер аминокислоты с боковой цепью, включающей по меньшей мере один первичный амин, вторичный амин, алкил, циклоалкил, циклогетероалкил, арил, гетероарил, простой эфир, сульфид или карбоксил;

Хаа⁴ представляет собой L- или D-изомер аминокислоты с боковой цепью, включающей фенил, нафтил или пиридил, где кольцо необязательно замещено одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, (C₁-C₁₀)алкилгалогена, (C₁-C₁₀)алкила, (C₁-C₁₀)алкокси-группы, (C₁-C₁₀)алкилтио-группы, арила, арилокси-группы, нитро-группы, нитрила, сульфонида, аминогруппы, монозамещенной аминогруппы, дизамещенной аминогруппы, гидроксигруппы, карбокси-группы и алкоксикарбонила;

Хаа⁵ представляет собой L- или D-Pro, или Хаа⁵ представляет собой L- или D-изомер аминокислоты с боковой цепью, включающей по меньшей мере один первичный амин, вторичный амин, гуанидин, мочевины, алкил, циклоалкил, циклогетероалкил, арил, гетероарил или простой эфир;

Хаа⁷ присутствует необязательно и, если присутствует, то представляет собой от одного до трех L- или D-изомеров аминокислотных остатков; и

Y представляет собой C-концевую группу.

В одном аспекте Хаа⁴ может представлять собой D-Phe, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, (C₁-C₁₀)алкилгалогена, (C₁-C₁₀)алкила, (C₁-C₁₀)алкокси-группы, (C₁-C₁₀)алкилтио-группы, арила, арилокси-группы, нитро-группы, нитрила, сульфонида, аминогруппы, монозамещенной аминогруппы, дизамещенной аминогруппы, гидроксигруппы, карбокси-группы и алкоксикарбонила.

В другом аспекте один из Хаа² и Хаа⁶ может представлять собой L- или D-изомер Asp, hGlu или Glu, а другой из Хаа² и Хаа⁶ представляет собой L- или D-изомер Lys, Orn, Dab или Dar. В альтернативном аспекте каждый из Хаа² и Хаа⁶ может представлять собой Cys, D-Cys, Pen или D-Pen.

В другом аспекте Хаа¹ может быть аминокислотой с боковой цепью, содержащей линейный или разветвленный алкил, циклоалкил, циклогетероалкил, арил или гетероарил.

В другом аспекте Хаа⁷ может быть аминокислотой с боковой цепью, содержащей по меньшей мере один арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими кольцевыми заместителями, и если присутствуют один или несколько заместителей, то они одинаковые или разные и независимо друг от друга представляют собой гидроксил, галоген, сульфонамид, алкил, -О-алкил, арил или -О-арил.

В другом аспекте N-концевая группа может представлять собой группу (C₁-C₁₇)ацила, где (C₁-C₁₇) включает в себя линейный или разветвленный алкил, циклоалкил, алкилциклоалкил, арил или алкиларил, линейную или разветвленную (C₁-C₁₇) цепь алкила, арила, гетероарила, алкена, алкенила или аралкила или N-ацилированную линейную или разветвленную (C₁-C₁₇) цепь алкила, арила, гетероарила, алкена, алкенила или аралкила.

В другом аспекте Y может быть гидроксилом, амидом или амидом, замещенным одной или двумя линейными или разветвленными (C₁-C₁₇) цепями алкила, циклоалкила, арила, алкилциклоалкила, аралкила, гетероарила, алкена, алкенила или аралкила.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен циклический пептид формулы (VII), определенный выше, но где

Хаа⁴ представляет собой D-Phe, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, (C₁-C₁₀)алкилгалогена, (C₁-C₁₀)алкила, (C₁-C₁₀)алкокси-группы, (C₁-C₁₀)алкилтио-группы, арила, арилокси-группы, нитро-группы, нитрила, сульфонида, аминогруппы, монозамещенной аминогруппы, дизамещенной аминогруппы, гидроксигруппы, карбокси-группы и алкоксикарбонила;

Хаа⁵ представляет собой L- или D-изомер Arg, Lys, Orn, Dab или Dap; и

Хаа⁷ представляет собой L- или D-изомер Trp, Nal 1 или Nal 2.

В вышеизложенном, в одном аспекте Хаа³ может представлять собой L- или D-изомер His, а в другом аспекте Z может представлять собой группу (C₁-C₁₇)ацила, а Хаа¹ может представлять собой L- или D-изомер Nle.

В вышеизложенном и в формуле (I) замещенный Pro может быть, например, Nur, Nur(Bzl), Pro(4-Bzl) и Pro(4-NH₂).

Пептиды, охватываемые формулами (I) - (VII), содержат один или несколько асимметричных элементов, таких как стереогенные центры, стереогенные оси и т.п.,

поэтому пептиды, охватываемые формулой (I), могут существовать в различных стереоизомерных формах. Как для конкретных, так и для описанных в общем виде пептидов, включая пептиды, охватываемые формулами (I) - (VII), все формы изомеров во всех хиральных или других изомерных центрах, включая энантиомеры и диастереомеры, включены в объем данного изобретения. Каждый пептид данного изобретения включает несколько хиральных центров и может использоваться в виде рацемической смеси или энантиомерно обогащенной смеси в дополнение к применению пептидов данного изобретения в энантиомерно чистых препаратах. Обычно пептиды данного изобретения синтезируют с использованием хирально чистых реагентов, таких как определенные L- или D-аминокислоты, с использованием таких реагентов, условий и методов, которые поддерживают энантиомерную чистоту, но предполагается, что можно получать и рацемические смеси. Такие рацемические смеси необязательно можно разделить с использованием хорошо известных методик, и можно использовать один индивидуальный энантиомер. В случаях и при определенных условиях температуры, растворителей и pH, когда пептиды могут существовать в таутомерных формах, каждая таутомерная форма будет охватываться этим изобретением, независимо от того, существует ли она в равновесии или преимущественно в одной форме. Таким образом, единственный энантиомер пептида формулы (I), который представляет собой оптически активную форму, может быть получен асимметричным синтезом, синтезом из оптически чистых предшественников или разделением рацематов.

Изобретение также предназначено охватывать пролекарства настоящих пептидов, которые при введении подвергаются химическому превращению в результате метаболических процессов, прежде чем они становятся активными фармакологическими пептидами. Как правило, такие пролекарства будут функциональными производными настоящих пептидов, которые легко превращаются *in vivo* в пептид формул (I) - (VII). Пролекарства представляют собой любые ковалентно связанные соединения, которые высвобождают активное исходное пептидное лекарственное средство формул (I) - (VII) *in vivo*. Общепринятые процедуры отбора и получения подходящих производных пролекарств описаны, например, в "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Типичные примеры пролекарств имеют биологически неустойчивые защитные группы на функциональном фрагменте, такие как полученные, например, этерификацией гидроксильных, карбоксильных или аминогрупп. Таким образом, в качестве примера, а не ограничения, пролекарство включает пептиды формулы (I), в которых используется

сложноэфирная форма пролекарства, такая как, например, низшие алкиловые сложные эфиры группы R в формуле (I), например, где R представляет собой –ОН, низшие алкиловые сложные эфиры которых могут включать от 1 до 8 атомов углерода в алкильном радикале, или аралкиловые сложные эфиры, которые имеют 6-12 атомов углерода в аралкильном радикале. В широком смысле, пролекарства включают соединения, которые могут быть окислены, восстановлены, аминированы, дезаминированы, гидроксिलированы, дегидроксिलированы, гидролизваны, дегидролизваны, алкилированы, деалкилированы, ацилированы, деацилированы, фосфорилированы или дефосфорилированы с образованием *in vivo* активного исходного пептидного лекарственного средства формулы (I).

Настоящее изобретение также включает пептиды, которые идентичны пептидам, указанным в формулах (I) - (VI), за исключением того обстоятельства, что один или несколько атомов, изображенных в формулах (I) - (VI), заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения данного изобретения, включают изотопы водорода, углерода, азота и кислорода, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O и ^{17}O , соответственно. Пептиды настоящего изобретения и фармацевтически приемлемые соли или сольваты указанных соединений, которые содержат вышеупомянутые изотопы и/или другие изотопы других атомов, входят в объем настоящего изобретения. Некоторые меченные изотопами соединения настоящего изобретения, например те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , могут быть использованы в различных анализах, таких как анализы распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Замещение более тяжелыми изотопами, такое как замещение одного или нескольких атомов водорода дейтерием (^2H), в некоторых случаях может обеспечить фармакологические преимущества, включая повышенную метаболическую стабильность. Меченные изотопами пептиды формул (I) - (VI), как правило, можно получить путем замены реагентом, меченым изотопами, реагента, не меченого изотопами.

7.0 Способы получения пептидов, используемых в изобретении.

Как правило, пептиды настоящего изобретения можно синтезировать путем твердофазного синтеза и очищать способами, известными в данной области. Для получения пептидов настоящего изобретения можно использовать любую из числа хорошо известных процедур с использованием различных смол и реагентов.

Циклические пептиды настоящего изобретения можно легко синтезировать известными обычными процедурами, основанными на образовании пептидной связи между аминокислотами. Такие общепринятые процедуры включают, например, любую процедуру в растворе, при которой происходит конденсация между свободной альфа-аминогруппой аминокислоты или ее остатком, у которого защищена карбоксильная группа и другие реакционноспособные группы, и свободной первичной карбоксильной группой другой аминокислоты или ее остатком, у которого защищена аминогруппа или другие реакционноспособные группы. В предпочтительной общепринятой процедуре циклические пептиды настоящего изобретения можно синтезировать путем твердофазного синтеза и очищать способами, известными в данной области. Для получения пептидов настоящего изобретения можно использовать любую из числа хорошо известных процедур с использованием различных смол и реагентов.

Процесс синтеза циклических пептидов можно осуществлять с помощью процедуры, при которой каждая аминокислота в желаемой последовательности добавляется по одной, последовательно к другой аминокислоте или ее остатку, или с помощью процедуры, при которой пептидные фрагменты с желаемой аминокислотной последовательностью сначала синтезируют обычным способом, а затем конденсируют с получением желаемого пептида. Затем полученный пептид циклизуют с получением циклического пептида данного изобретения.

Способы твердофазного пептидного синтеза хорошо известны и практикуются в данной области. В таких способах синтез пептидов данного изобретения можно осуществлять путем последовательного включения требуемых аминокислотных остатков по одному в растущую пептидную цепь в соответствии с общими принципами твердофазных способов. Эти методы раскрыты в многочисленных ссылках, в том числе Merrifield, R.B., "Solid phase synthesis (Nobel lecture)," *Angew Chem* 24:799-810 (1985) и Barany et al., The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology, Vol. 2, Gross, E. and Meienhofer, J., Eds. Academic Press 1-284 (1980).

При химическом синтезе пептидов реактивные группы боковых цепей различных аминокислотных остатков защищают подходящими защитными группами, которые предотвращают протекание химической реакции в этом месте до тех пор, пока защитная группа не будет удалена. Также распространена защита альфа-аминогруппы аминокислотного остатка или фрагмента, в то время как этот объект реагирует по карбоксильной группе, с последующим селективным удалением защитной группы альфа-

аминогруппы, чтобы позволить последующей реакции происходить на этом сайте. Для способов твердофазного синтеза и способов синтеза в растворе известны и описаны определенные защитные группы.

Альфа-аминогруппы могут быть защищены подходящей защитной группой, включая защитную группу уретанового типа, такую как бензилоксикарбонил (Z) и замещенный бензилоксикарбонил, такой как п-хлорбензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, п-бифенил-изопропоксикарбонил, 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) и п-метоксибензилоксикарбонил (Moz), и защитные группы алифатического уретанового типа, такие как трет-бутилоксикарбонил (Boc), диизопропилметоксикарбонил, изопропоксикарбонил и аллилоксикарбонил (Alloc). Fmoc является предпочтительным для защиты альфа-аминогруппы.

Гуанидино-группы могут быть защищены подходящей защитной группой, такой как нитро-группа, п-толуолсульфонил (Tos), Z, пентаметилхромансульфонил (Pmc), адамантилоксикарбонил, пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) и Boc. Pbf и Pmc являются предпочтительными защитными группами для Arg.

Описанные здесь пептиды данного изобретения были получены путем твердофазного синтеза, например, с помощью автоматического синтезатора пептидов Symphony Multiplex Peptide Synthesizer (Rainin Instrument Company), с использованием программных модулей, предоставленных производителем, и в соответствии с протоколами в инструкции производителя.

Твердофазный синтез начинают с С-концевого конца пептида путем связывания защищенной альфа-аминокислоты с подходящей смолой. Такой исходный материал получают путем присоединения альфа-амино-защищенной аминокислоты через амидную связь к 9-*Fmoc-аминоксантен-3-илокси-смоле Меррифилда* (смола Sieber Amide) или к 4-(2',4'-диметоксифенил-*Fmoc*-аминометил)феноксисмоле (смола Rink Amide), через простую эфирную связь к п-бензилоксибензиловой спиртовой смоле (смола Ванга), 2-хлортритилхлоридной смоле или оксимной смоле, или другими способами, хорошо известными в данной области. Смолы по мере необходимости проходят через повторяющиеся циклы для последовательного присоединения аминокислот. Защитные группы Fmoc альфа-аминогрупп удаляют в щелочных условиях. Для этой цели можно использовать пиперидин, пиперазин, диэтиламин или морфолин (20-40% об./об.) в N,N-диметилформамиде (ДМФА).

После удаления альфа-аминозащитной группы последующие защищенные аминокислоты постепенно присоединяют в требуемом порядке, получая промежуточный защищенный пептид на смоле. Активирующие реагенты, используемые для связывания аминокислот в твердофазном синтезе пептидов, хорошо известны в данной области. Если требуется, для дальнейшей дериватизации пептида после синтеза пептида ортогональные защитные группы на боковой цепи можно удалять хорошо известными в данной области техники способами.

Обычно при необходимости используют ортогональные защитные группы. Например, пептиды данного изобретения содержат множество аминокислот с аминогруппой в боковой цепи. В одном аспекте с аминокислотами, образующими лактамный мостик по их боковым цепям, используют схему защиты *Allyl-Alloc*, а ортогональные защитные группы, расщепляемые в других реакционных условиях, используют для других аминокислот с аминогруппой в боковой цепи. Так, например, аминокислоты *Fmoc-Lys(Alloc)-OH*, *Fmoc-Orn(Alloc)-OH*, *Fmoc-Dap(Alloc)-OH*, *Fmoc-Dab(Alloc)-OH*, *Fmoc-Asp(OAll)-OH* или *Fmoc-Glu(OAll)-OH* можно использовать в положениях, образующих лактамный мостик при циклизации, в то время как другие аминокислоты с боковыми цепями, содержащими аминогруппы, имеют другую и ортогональную защитную группу, такую как *Fmoc-Arg (Pbf)-OH*, *Fmoc-Lys (Boc)-OH*, *Fmoc-Dab (Boc)-OH* или т.п. Аналогичным образом можно использовать другие защитные группы; в качестве примера, а не ограничения, *Mtt/OPp* (4-метилтретил/2-фенилизопропил) можно использовать для боковых цепей, образующих лактамный мостик при циклизации, с использованием ортогональных защитных групп для других положений, которые не расщепляются в условиях для расщепления *Mtt/OPp*.

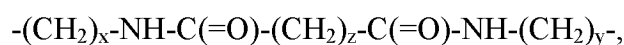
Реакционноспособные группы в пептиде можно выборочно модифицировать либо во время твердофазного синтеза, либо после удаления из смолы. Например, пептиды можно модифицировать, например, ацилировать по N-концу, пока они находятся на смоле, или их можно удалить из смолы с помощью расщепляющего реагента, а затем модифицировать. Точно так же способы модифицирования боковых цепей аминокислот хорошо известны специалистам в области пептидного синтеза. Выбор модификаций реактивных групп в пептиде будет в частности зависеть от требуемых характеристик получаемого пептида.

В пептидах настоящего изобретения в одном варианте осуществления N-концевую группу модифицируют путем введения N-ацетильной группы. В одном аспекте

используется способ, в котором после удаления защитной группы на N-конце связанный со смолой пептид подвергают взаимодействию с уксусным ангидридом в N,N-диметилформамиде (ДМФА) в присутствии органического основания, такого как пиридин. В данной области известны и другие методы ацетилирования по N-концу, включая ацетилирование в растворе, которые можно использовать.

В одном варианте осуществления пептид можно подвергать циклизации перед отщеплением от пептидной смолы. Для циклизации по реакционноспособным фрагментам боковых цепей с требуемых боковых цепей снимают защиту, пептид суспендируют в подходящем растворителе и добавляют агент циклической сшивки. Подходящие растворители включают, например, ДМФА, дихлорметан (DCM) или 1-метил-2-пирролидон (NMP). Подходящие реагенты циклического сочетания включают, например, 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруния тетрафторборат (TBTU), 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруния гексафторфосфат (HBTU), бензотриазол-1-ил-окси-трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), бензотриазол-1-ил-окситрис(пирролидино)фосфония гексафторфосфат (PyBOP), 2-(7-аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруния тетрафторборат (TATU), 2-(2-оксо-1(2H)-пиридил)-1,1,3,3-тетраметилуруния тетрафторборат (TPTU) или N,N'-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазол (DCC/NOBt). Связывание обычно инициируют с использованием подходящего основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), сим-коллин или N-метилморфолин (NMM).

Для пептидов с нелактамным циклическим мостиком, таких как пептиды, содержащие мостик:



где x, y и z каждый независимо принимают значения от 1 до 5, пептиды можно получать твердофазным синтезом с использованием защищенной по боковой цепи диаминовой аминокислоты в положениях, подлежащих циклизации. Особенно предпочтительными в таких положениях являются Asp, Dab или Lys, предпочтительно с аминозащитной группой, такой как Alloc, Mtt, Mmt (метокситритил), Dde (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден))этил, ivDde (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил) или любой другой ортогонально отщепляемой защитной группой. Обычно сначала удаляют одну защитную группу боковой цепи, например, удаляя Mtt с использованием 2% TFA в дихлорметане. После промывки смолы полученный связанный со смолой незащищенный амин ацилируют, например, 0,5 М раствором циклического

ангидрида, такого как янтарный ангидрид или глутаровый ангидрид, в дихлорметане/пиридине 1:1. После дополнительных стадий промывки ортогонально отщепляемая защитная группа второй диаминоаминокислоты отщепляется, например, удаляя Alloc с использованием тетракис(трифенилфосфин)палладия(0) и фенилсилана в дихлорметане. После промывания дихлорметаном и ДМФА связанный со смолой пептид подвергается циклизации с использованием стандартных связывающих реагентов, таких как TBUTU и основание. Альтернативно, со связанной со смолой диамино-аминокислоты, защищенной ivDde, можно снять защиту с помощью раствора 5% гидразина в ДМФА, и после промывки в ДМФА полученный в результате амин, связанный со смолой, можно либо ацилировать циклическим ангидридом, либо подвергать циклизации связанной со смолой карбоновой кислотой.

Затем циклизированные пептиды можно отщеплять от твердой фазы с использованием любого подходящего реагента, такого как этиламин в DCM, или различных комбинаций агентов, таких как трифторуксусная кислота (TFA), триизопропилсилан (TIS), диметоксибензол (DMB), вода и т.п. Полученный неочищенный пептид сушат, а оставшиеся защитные группы в боковых цепях аминокислот, если таковые имеются, расщепляют с использованием любого подходящего реагента, такого как (TFA) в присутствии воды, TIS, 2-меркаптопентана (ME) и/или 1,2-этандитиола (EDT). Конечный продукт осаждают, добавляя холодный эфир, и собирают фильтрованием. Окончательную очистку осуществляют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC), используя подходящую колонку, такую как колонка C₁₈, или можно использовать другие способы разделения или очистки, такие как методы, основанные на размере или заряде пептида. После очистки пептид можно охарактеризовать с помощью любого количества методов, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), аминокислотный анализ, масс-спектрометрия и т.п.

Для пептидов настоящего изобретения, которые имеют замещенное на С-конце производное амида или N-алкильную группу, синтез можно проводить твердофазным образом, начиная с С-концевого конца пептида, путем связывания защищенной альфа-аминокислоты с подходящей смолой. Такие способы получения замещенных производных амида на твердой фазе описаны в данной области. См., например, Barn, D. R., et al., "Synthesis of an array of amides by aluminum chloride assisted cleavage on resin bound esters," *Tetrahedron Letters*, 37:3213-3216 (1996); DeGrado, W. F. and Kaiser E. T., "Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer bound oxime: Preparation of segments comprising

the sequences of a cytotoxic 26-peptide analogue," *J. Org. Chem.*, 47:3258-3261 (1982). Такой исходный материал можно получать путем присоединения альфа-амино-защищенной аминокислоты сложноэфирной связью к п-бензилоксибензиловой спиртовой смоле (смола Ванга) или оксимной смоле хорошо известными способами. Пептидную цепь выращивают с требуемой последовательностью аминокислот, пептид циклизуют и пептид на смоле обрабатывают раствором подходящего амина (такого как метиламин, диметиламин, этиламин и так далее). Пептиды, выращенные на п-бензилоксибензиловой спиртовой смоле (смола Ванга), можно отщеплять от смолы хлоридом алюминия в DCM, а пептиды, выращенные на оксимной смоле, можно отщеплять, используя DCM. Другой способ получения пептида с амидом, замещенным на С-конце, заключается в присоединении алкиламина путем восстановительного аминирования к формильной смоле, такой как смола 4-(4-формил-3-метоксифенокс)бутирил-АМ (смола FMPB АМ), и затем последовательно включать требуемые аминокислотные остатки, используя общие принципы твердофазного синтеза.

Хотя синтез был описан в первую очередь со ссылкой на твердофазную химию Fmoc, следует понимать, что для получения циклических пептидов данного изобретения можно использовать другие химические процессы и методы синтеза, такие как в качестве примера, а не ограничения, способы, в которых используется Boc химия, растворная химия и другие химические и синтетические методы.

8.0 Тесты и анализы, применяемые для оценки пептидов, используемых в настоящем изобретении.

Пептиды, специфичные к рецептору меланокортина, используемые в настоящем изобретении, можно исследовать с помощью различных систем анализа и животных моделей для определения связывания, функционального статуса и эффективности.

8.1 Анализ конкурентного ингибирования с использованием [I^{125}]-NDP- α -MSH.

Анализ конкурентного связывания при ингибировании выполняли с использованием мембранных гомогенатов, полученных из клеток НЕК-293, которые экспрессируют рекомбинантный hMC1r или hMC4r (в каждом случае префикс h относится к человеку), или, альтернативно, мембранных гомогенатов из клеток меланомы мыши B16-F10, содержащих эндогенный мышинный MC1r. В следующих примерах все значения MC1r и MC4r относятся к человеческим рекомбинантным рецепторам, если не указано иное. Анализы выполняли в 96-луночных полипропиленовых круглодонных планшетах (VWR кат. № 12777-030). Мембранные гомогенаты инкубировали с 0,1 нМ [I^{125}]-NDP- α -

MSH (Perkin Elmer) при возрастающих концентрациях исследуемых пептидов настоящего изобретения в буфере, содержащем 25 мМ буфера HEPES (pH 7,5) с 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 0,3 мМ 1,10-фенантролина и 0,2% бычьего сывороточного альбумина. После инкубирования в течение 90 минут при 37°C анализируемую смесь отфильтровывали на планшеты GF/B Unifilter (Perkin-Elmer кат. № 6005177) и промывали ледяным буфером по 3 мл на лунку. Фильтры сушили на воздухе и в каждую лунку добавляли по 35 мкл сцинтилляционной смеси. Планшеты считывали на счетчике Microbeta на связанную радиоактивность. Неспецифическое связывание измеряли по ингибированию связывания [¹²⁵I]-NDP-α-MSH в присутствии 1 мкМ NDP-α-MSH. Максимальное специфическое связывание (100%) определяли как разность значений радиоактивности (имп/мин) на клеточных мембранах в отсутствие и в присутствии 1 мкМ NDP-α-MSH. Каждый анализ проводили в двух повторностях и описывали фактические средние значения, при этом результаты менее 0% представлены как 0%. Значения K_i пептидов настоящего изобретения определяли, используя программное обеспечение Graph-Pad Prism® для построения кривой.

8.2 Анализ активности агонистов.

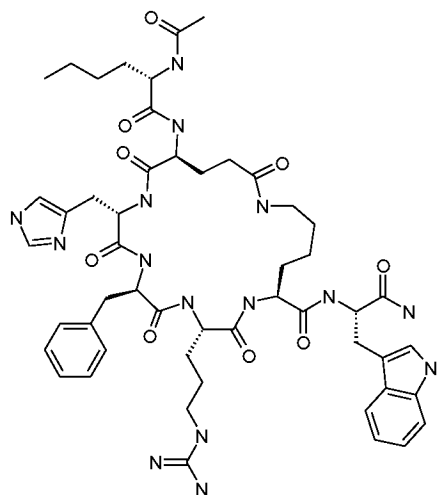
Накопление внутриклеточного цАМФ исследовали как меру способности пептидов настоящего изобретения вызывать функциональный ответ в клеточной линии меланомы человека - HBL, которая экспрессирует hMC1r (см. Kang, L., et al., «A selective small molecule agonist of MC1r inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine accumulation and leukocyte infiltration in mice», *J. Leuk. Biol.* 80:897-904 (2006)) или клетках HEK-293, экспрессирующих hMC4r. Конфлюэнтные клетки HBL, экспрессирующие hMC1r, или клетки HEK-293, экспрессирующие рекомбинантный hMC4r, отделяли от культуральных планшетов путем инкубирования в буфере для диссоциации клеток, не содержащем ферменты. Диспергированные клетки суспендировали в сбалансированном солевом растворе Эрла, содержащем 10 мМ HEPES (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, 1 мМ глутамина, 0,5% альбумина и 0,3 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) - ингибитора фосфодиэстеразы. Клетки высевали в 96-луночные планшеты при плотности 0,4 x 10⁵ клеток на лунку в случае клеток HBL и 0,5 x 10⁵ клеток на лунку в случае клеток HEK-293 и предварительно инкубировали в течение 10 минут. На клетки воздействовали пептидами настоящего изобретения в течение 15 минут при 37°C, растворенными в DMSO (конечная концентрация в DMSO составляла 1%) при концентрациях 0,05 - 5000 нМ в суммарном анализируемом объеме 200 мкл. NDP-α-MSH использовали в качестве контрольного

агониста. Уровни цАМФ определяли с помощью клеточной системы на основе анализа HTRF® цАМФ от Cisbio Bioassays, используя криптит-меченые антитела к цАМФ и d2-меченый цАМФ, планшеты считывали на считывающем устройстве для планшетов Perkin-Elmer Victor при 665 и 620 нМ. Анализ данных проводили с помощью нелинейного регрессионного анализа, используя программное обеспечение Graph-Pad Prism®. Значения максимальной эффективности ($E_{\max}$) определяли для каждого исследуемого пептида настоящего изобретения, сравнивая их со значениями, полученными для эталонного агониста меланокортина NDP- α -MSH.

9.0 Примеры пептидов, используемых в изобретении.

Были синтезированы пептиды со следующими структурами и определяли средние значения их K_i MC1r и MC4r, как указано. Значения K_i были определены с использованием [125 I]-NDP- α -MSH. Все результаты выражены в нМ, за исключением значений $E_{\max}$, которые являются процентными значениями. Пептиды с указанной в заголовке первичной последовательностью синтезировали и очищали, как описано в разделе 7 выше, с получением пептида, имеющего изображенную структуру. После синтеза и очистки пептиды исследовали, как описано в разделе 8 выше, результаты приведены ниже.

9.1 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Lys)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:4)



Анализ

MC-4 K_i (среднее)

MC-1 K_i (среднее)

MC-1 EC_{50} (среднее; цАМФ HBL)

MC-1 $E_{\max}$ (среднее; цАМФ HBL)

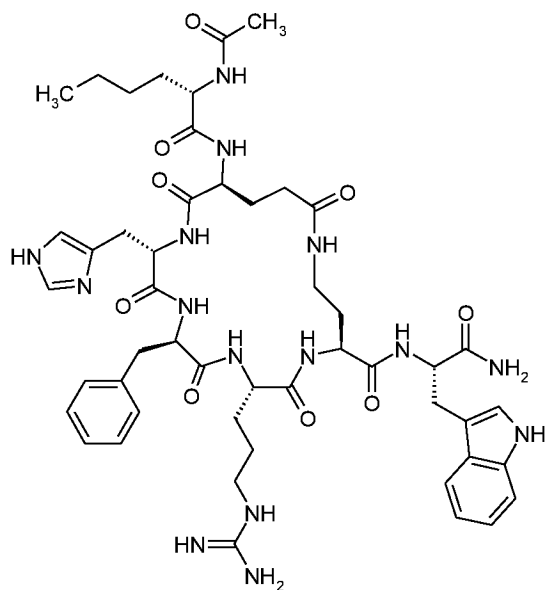
Результат

45

0,01

0,007

97%

9.2 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:5)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

110

МС-1 Ki (среднее)

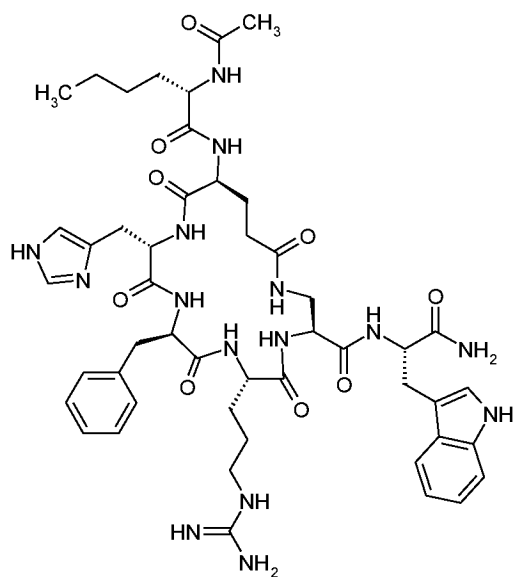
0,012

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,006

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

95%

9.3 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

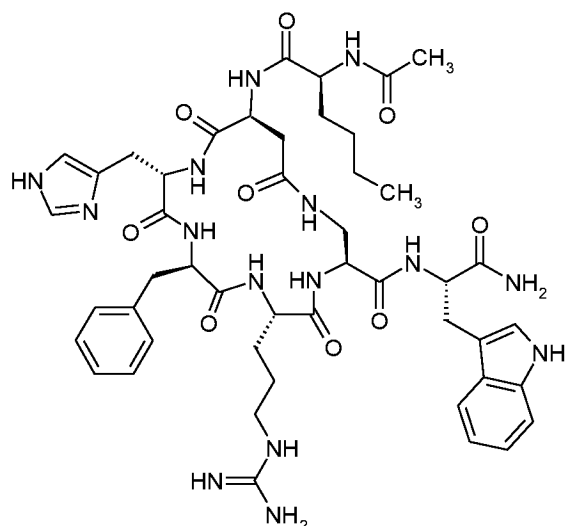
510

МС-1 Ki (среднее)

0,04

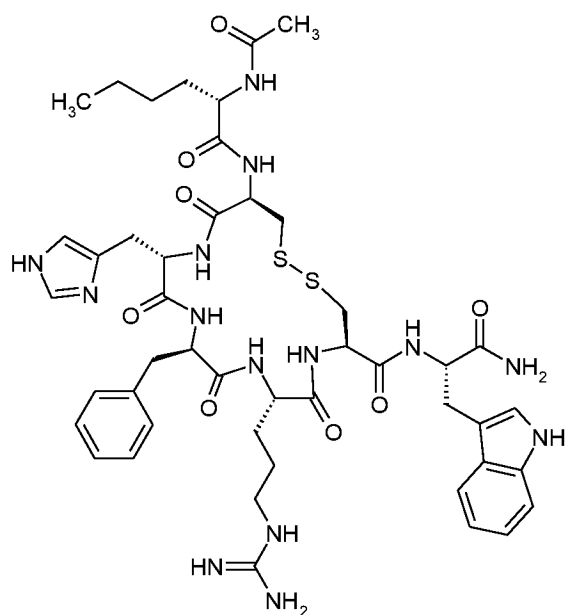
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,008
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	91%

9.4 Ac-Nle-цикло(Asp-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:7)



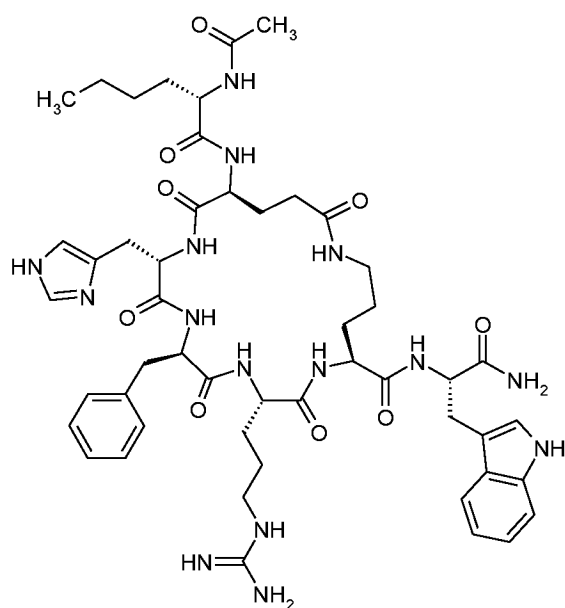
Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	1325
MC-1 Ki (среднее)	2
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,195
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	88%

9.5 Ac-Nle-цикло(Cys-His-D-Phe-Arg-Cys)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:8)



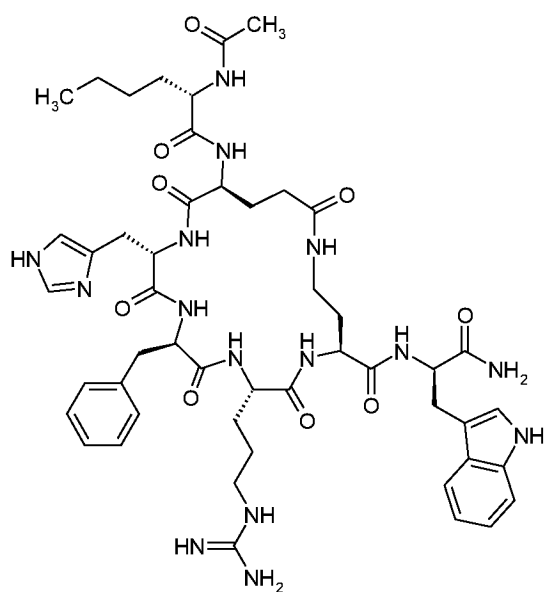
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	540
МС-1 Ki (среднее)	0,35
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,025
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	87%

9.6 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Orn)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:9)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	295
МС-1 Ki (среднее)	0,07
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,014
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	91%

9.7 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-D-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:10)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

33

МС-1 Ki (среднее)

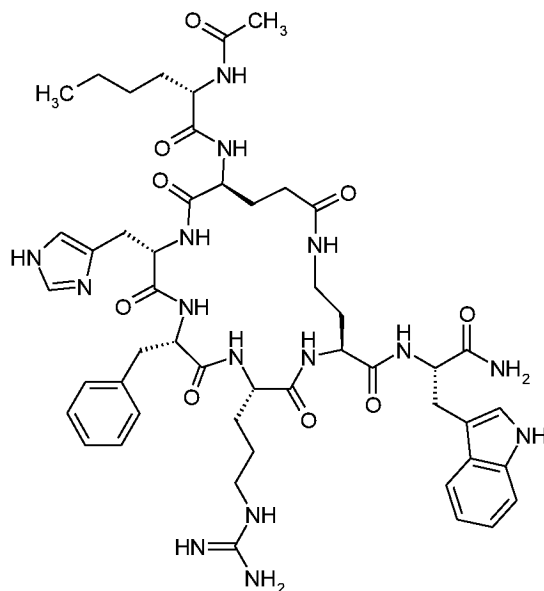
0,55

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,025

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

93%

9.8 Ас-Nle-цикло(Glu-His-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:11)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

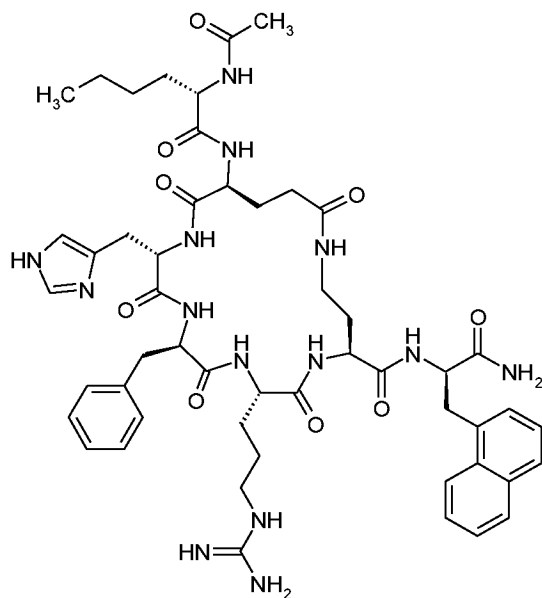
2

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,052

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

88%

9.9 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-D-Nal 1-NH₂ (SEQ ID NO:12)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

2

МС-1 Ki (среднее)

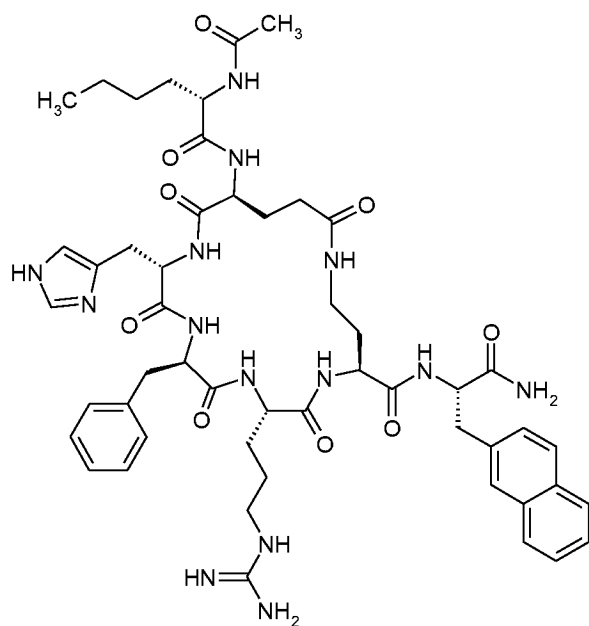
0,1

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,008

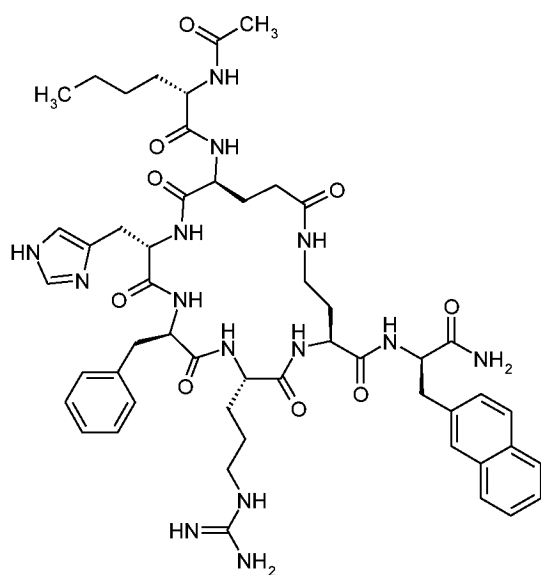
МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

73%

9.10 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Nal 2-NH₂ (SEQ ID NO:13)

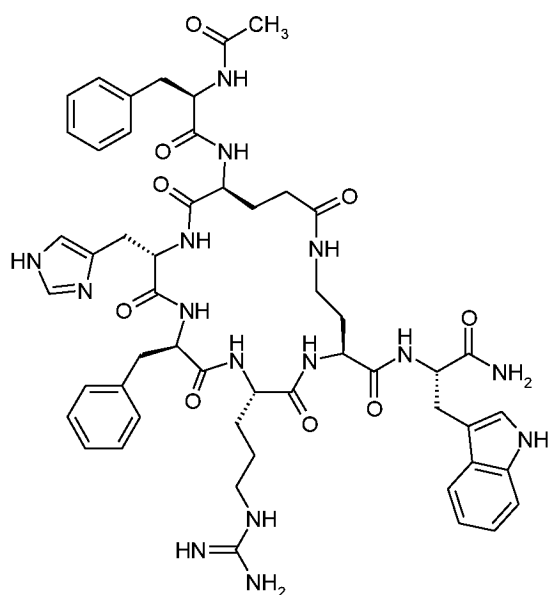
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	3
МС-1 Ki (среднее)	0,01
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,004
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	83%

9.11 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-D-Nal 2-NH₂ (SEQ ID NO:14)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	0,095
МС-1 Ki (среднее)	0,02
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,005
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	69%

9.12 Ac-D-Phe-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:15)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

535

МС-1 Ki (среднее)

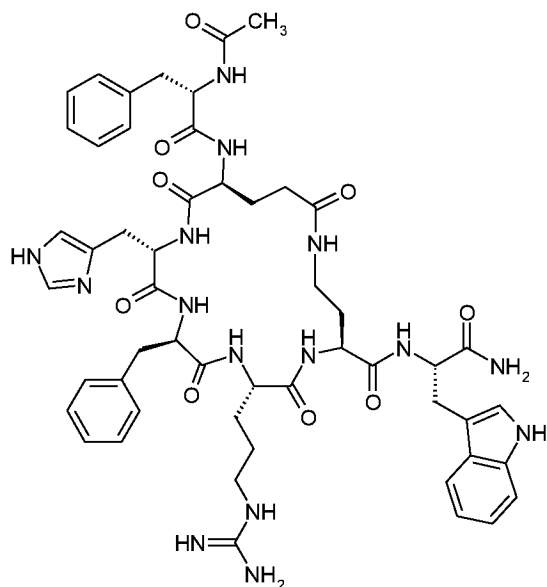
0,35

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,015

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

75%

9.13 *Ac-Phe-цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:16)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

510

МС-1 Ki (среднее)

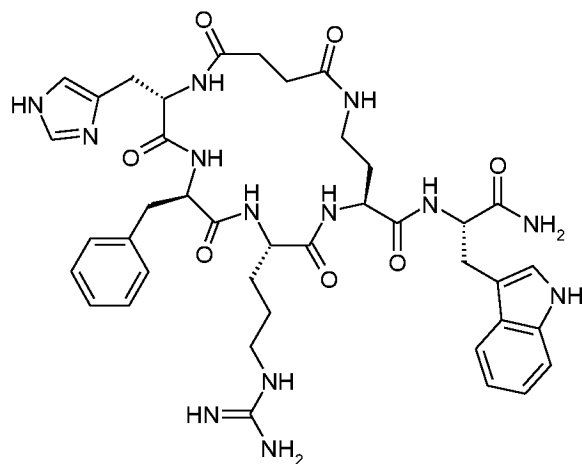
0,195

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,01

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

75%

9.14 *цикло*(Suc-His-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:17)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

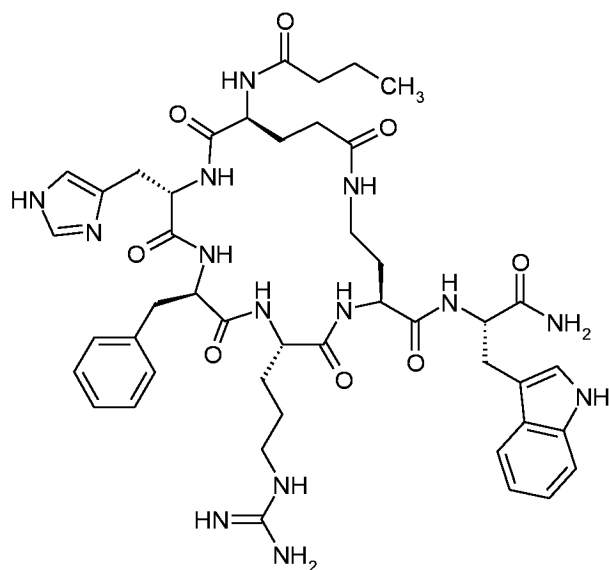
310

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

31

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

80%

9.15 CH₃-(CH₂)₂-C(=O)-*цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:18)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

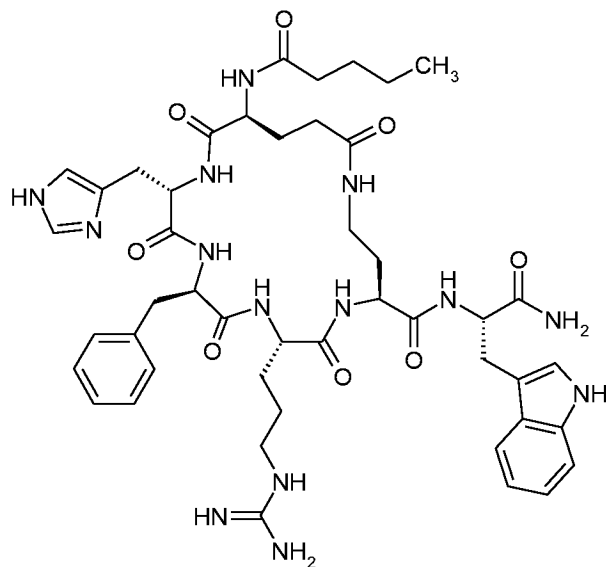
890

МС-1 Ki (среднее)

0,65

MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,012
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	91%

9.16 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})$ -цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:19)

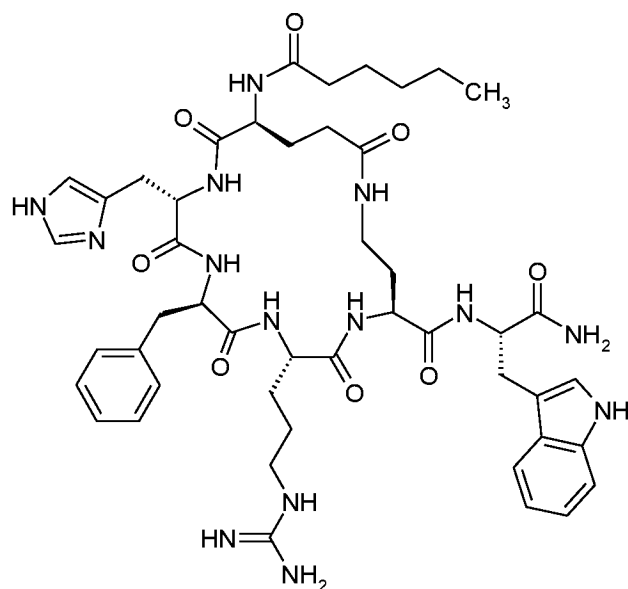


Анализ

Результат

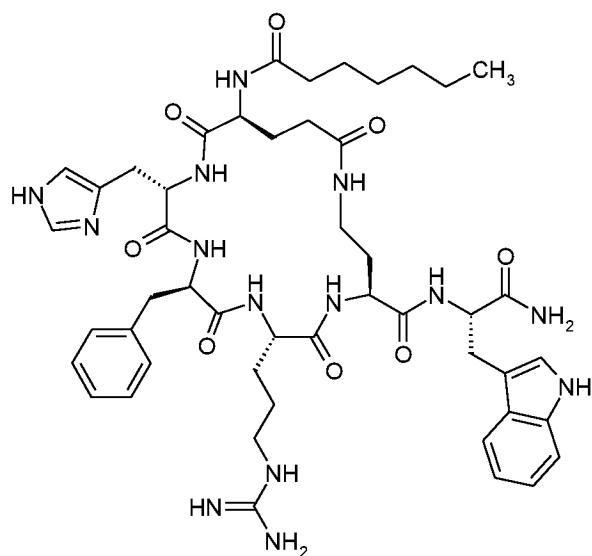
MC-4 Ki (среднее)	365
MC-1 Ki (среднее)	0,12
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,005
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	89%

9.17 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})$ -цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:20)



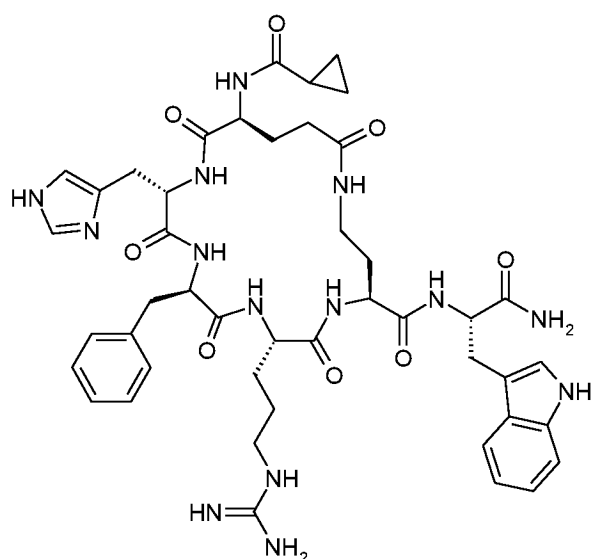
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	110
МС-1 Ki (среднее)	0,025
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,004
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	90%

9.18 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})$ -цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:21)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	100
МС-1 Ki (среднее)	0,015
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,003
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	87%

9.19 цикло-пропаноил-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:22)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

640

МС-1 Ki (среднее)

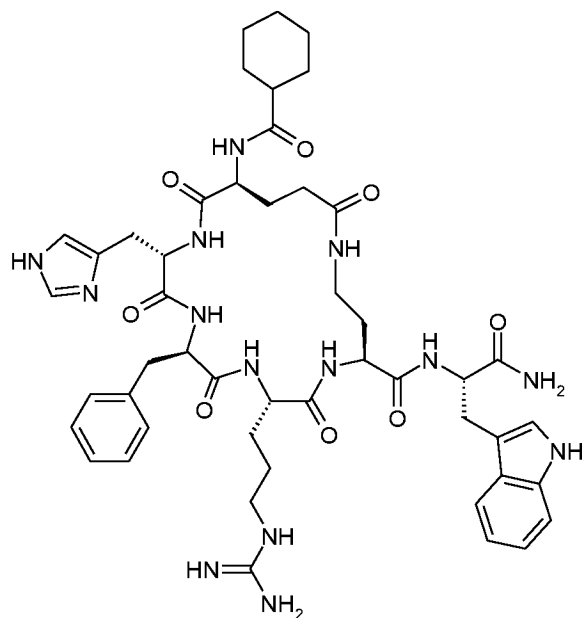
3

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,031

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

83%

9.20 цикло-гексаноил-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:23)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

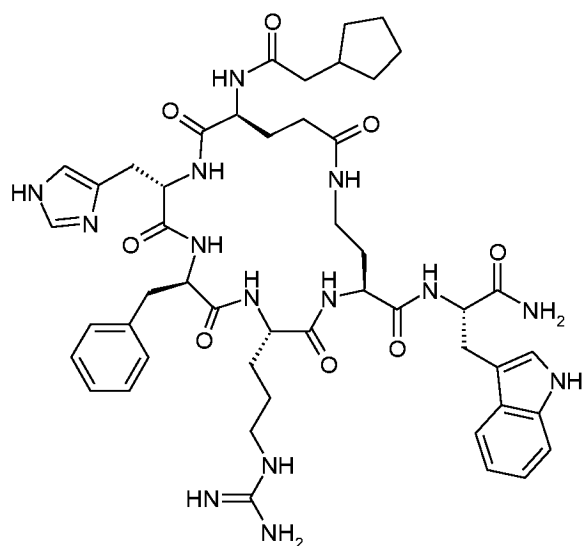
165

МС-1 Ki (среднее)

0,025

МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,004
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	79%

9.21 циклопентил-ацетил-*цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:24)

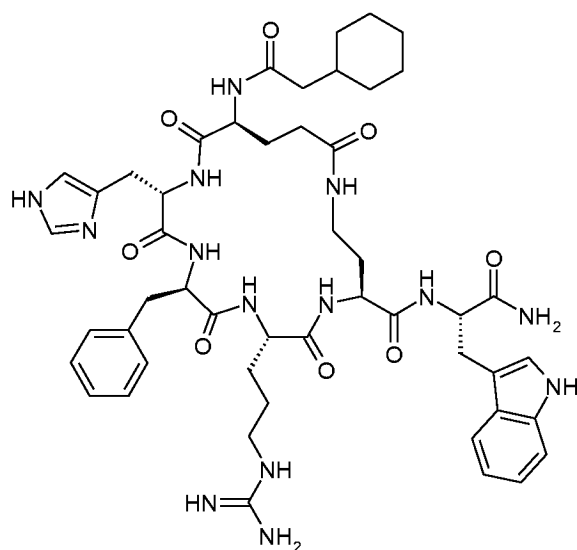


Анализ

Результат

МС-4 Ki (среднее)	93
МС-1 Ki (среднее)	0,01
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,004
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	83%

9.22 циклогексил-ацетил-*цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:25)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

63

МС-1 Ki (среднее)

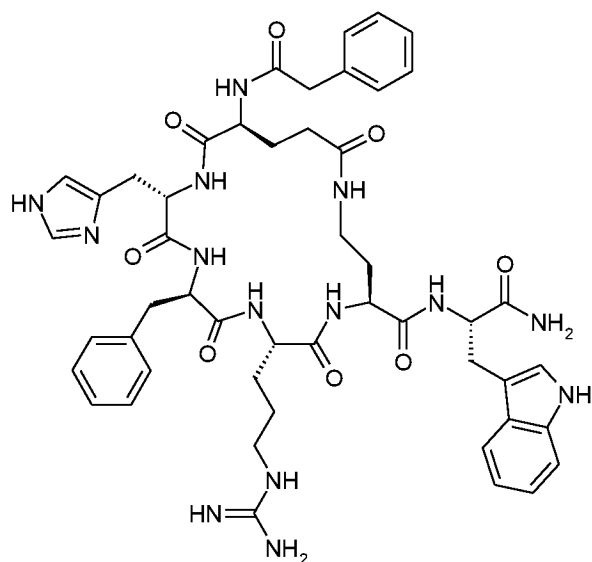
0,01

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,004

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

85%

9.23 фенил-ацетил-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:26)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

205

МС-1 Ki (среднее)

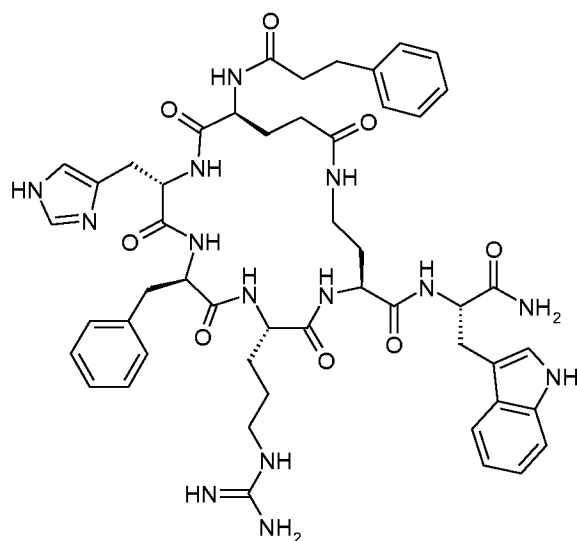
0,04

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,007

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

82%

9.24 фенил-пропаноил-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:27)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

285

МС-1 Ki (среднее)

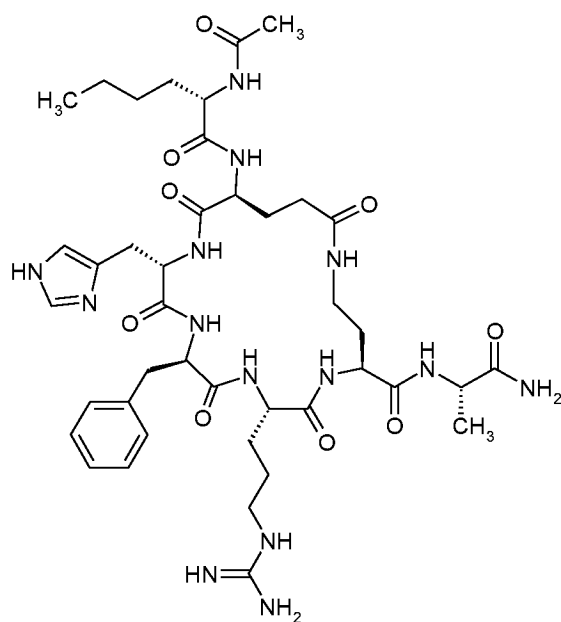
0,03

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,006

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

83%

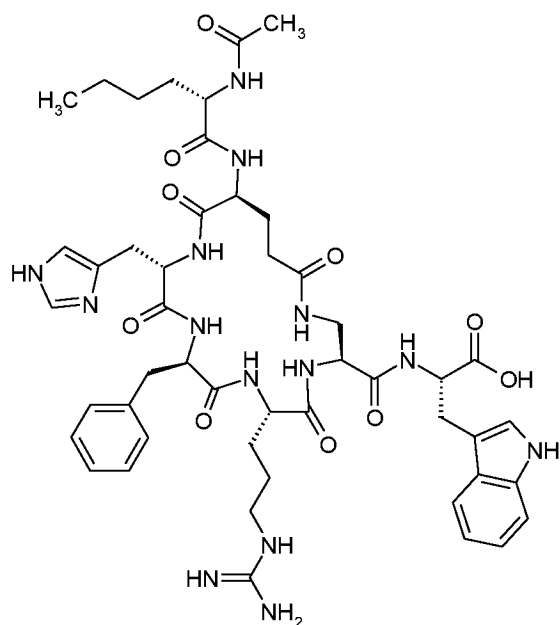
9.25 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:28)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

7475

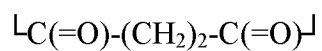
MC-1 Ki (среднее)	2
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,08
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	97%

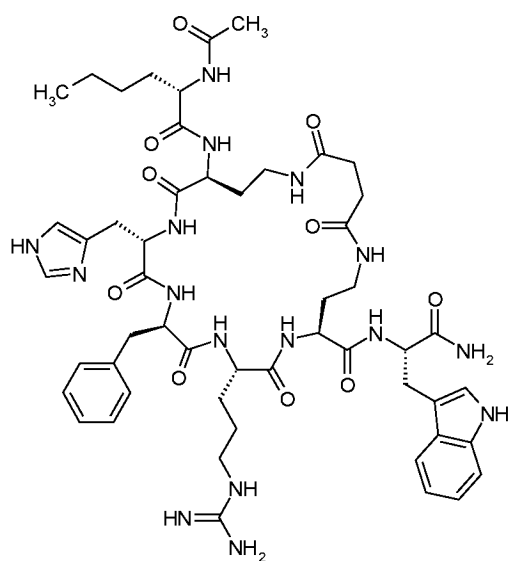
9.26 Ac-Nle-*цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-OH (SEQ ID NO:29)



Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	4700
MC-1 Ki (среднее)	1
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,107
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	81%

9.27 Ac-Nle-*цикло*(Dab-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:30)



**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

380

МС-1 Ki (среднее)

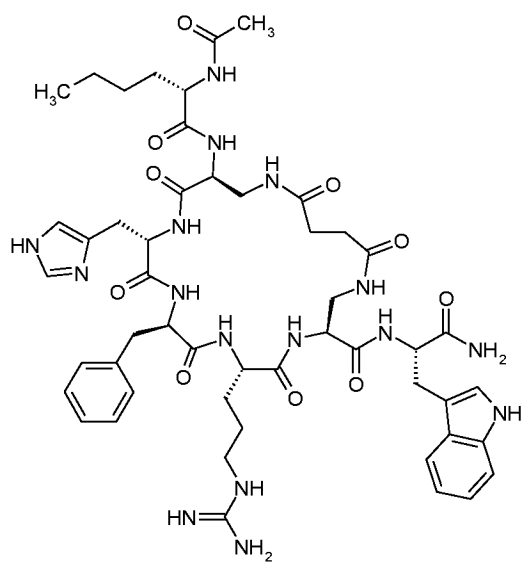
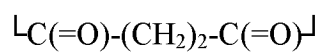
0,015

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,009

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

92%

9.28 Ac-Nle-цикло(Dap-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:31)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

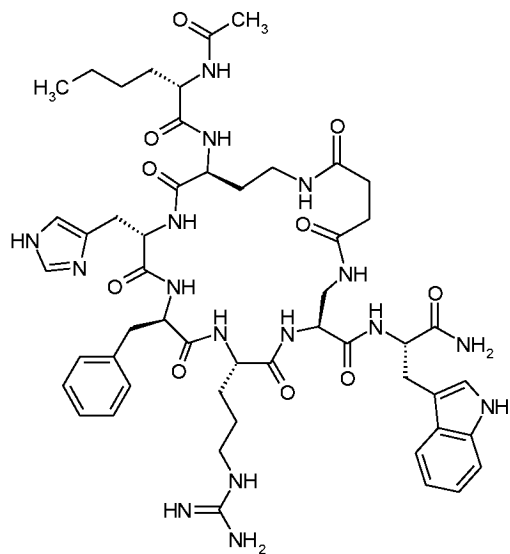
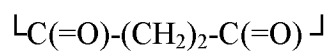
680

МС-1 Ki (среднее)

0,03

MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,007
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	70%

9.29 Ac-Nle-цикло(Dab-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:32)

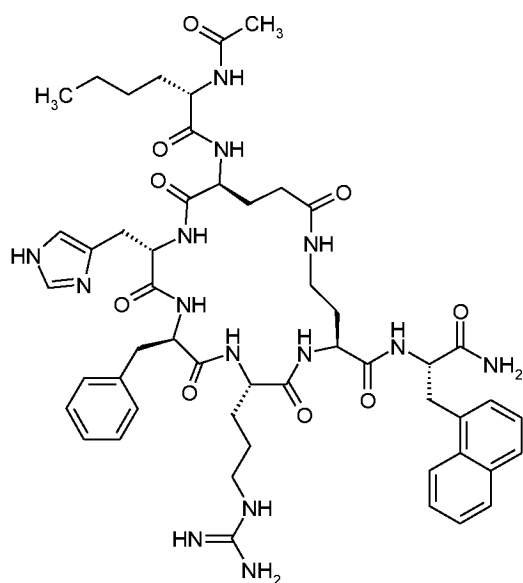


Анализ

Результат

MC-4 Ki (среднее)	325
MC-1 Ki (среднее)	0,025
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,006
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	78%

9.30 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Nal 1-NH₂ (SEQ ID NO:33)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

0,75

МС-1 Ki (среднее)

0,005

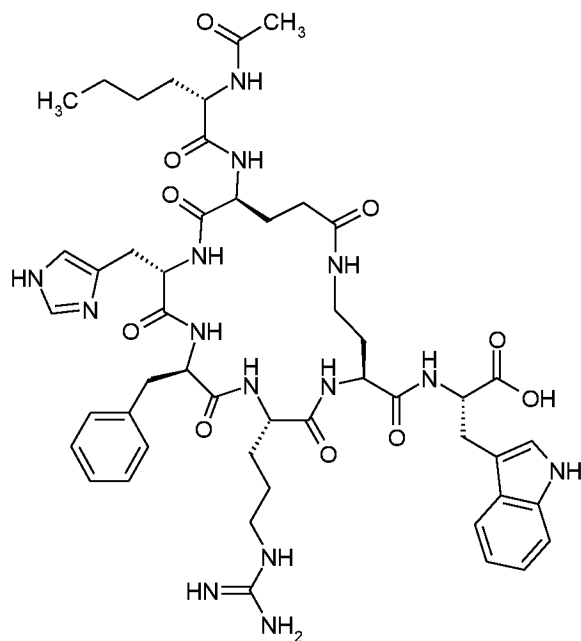
МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,002

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

72%

9.31 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-OH (SEQ ID NO:34)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

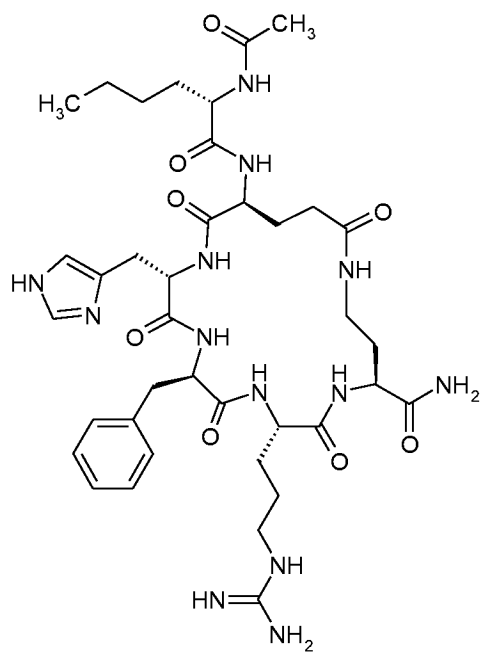
10000

МС-1 Ki (среднее)

2

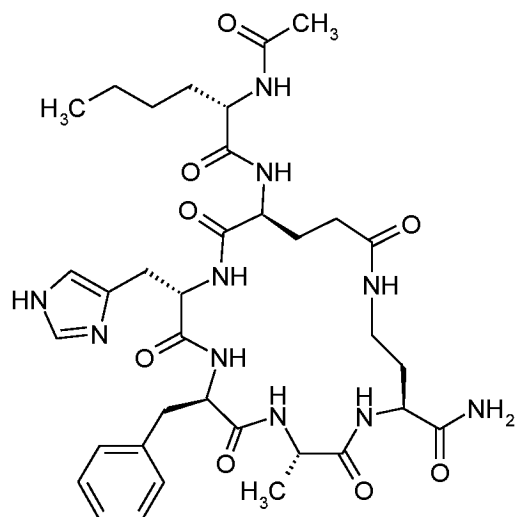
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,095
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	79%

9.32 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:35)



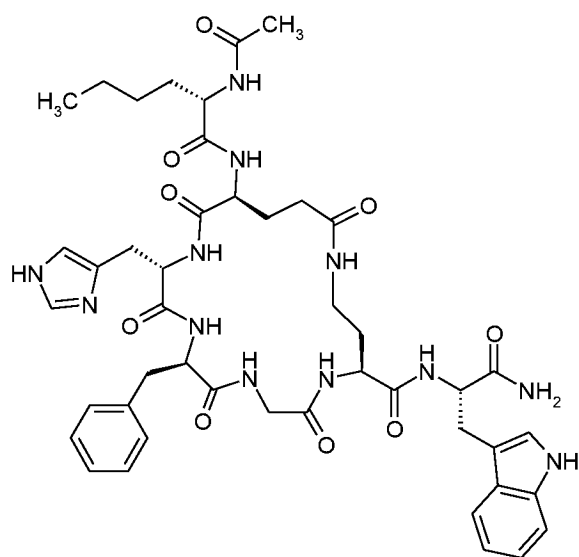
Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	10000
MC-1 Ki (среднее)	7
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,32
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	85%

9.33 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Ala-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:36)



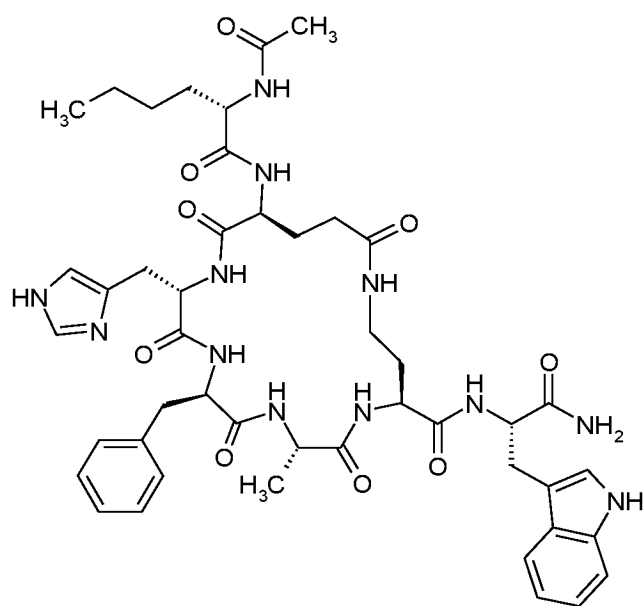
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	10000
МС-1 Ki (среднее)	645
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	44
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	73%

9.34 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Gly-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:37)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	10000
МС-1 Ki (среднее)	9
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	4
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	59%

9.35 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Ala-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:38)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

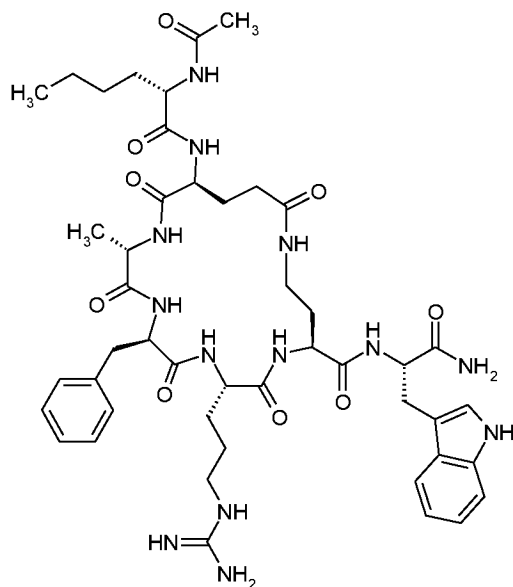
0,8

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,115

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

72%

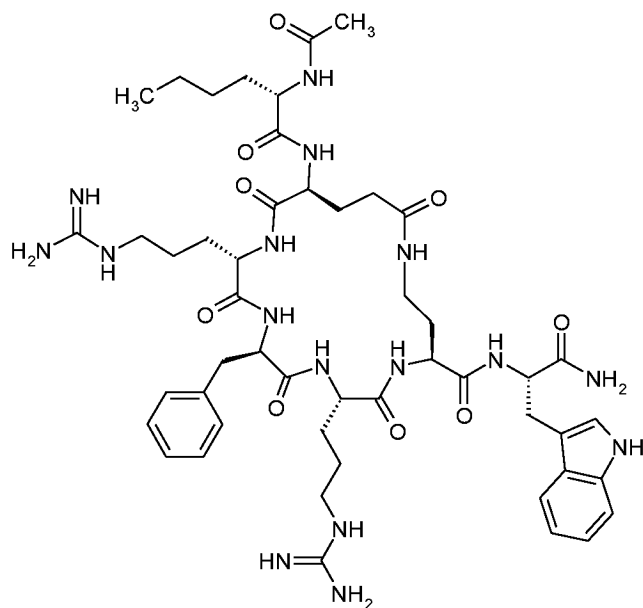
9.36 Ас-Nle-цикло(Glu-Ala-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:39)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

455

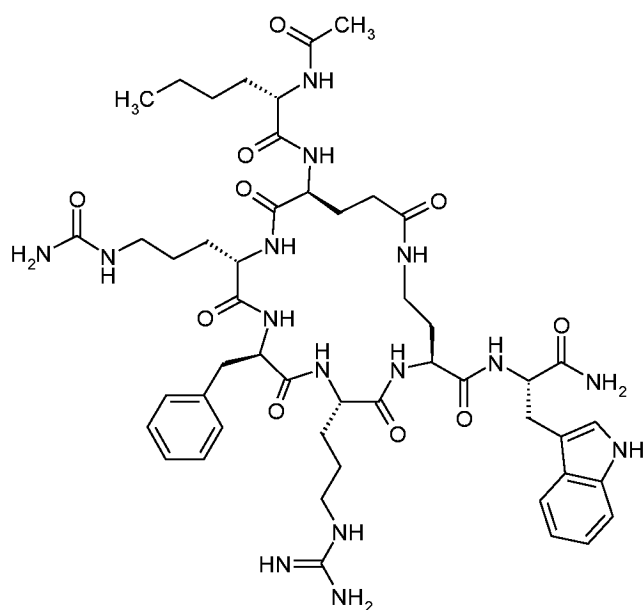
MC-1 Ki (среднее)	4
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,21
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	86%

9.37 Ac-Nle-цикло(Glu-Arg-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:40)



Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	20
MC-1 Ki (среднее)	0,014
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,003
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	100%

9.38 Ac-Nle-цикло(Glu-Cit-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:41)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

98

МС-1 Ki (среднее)

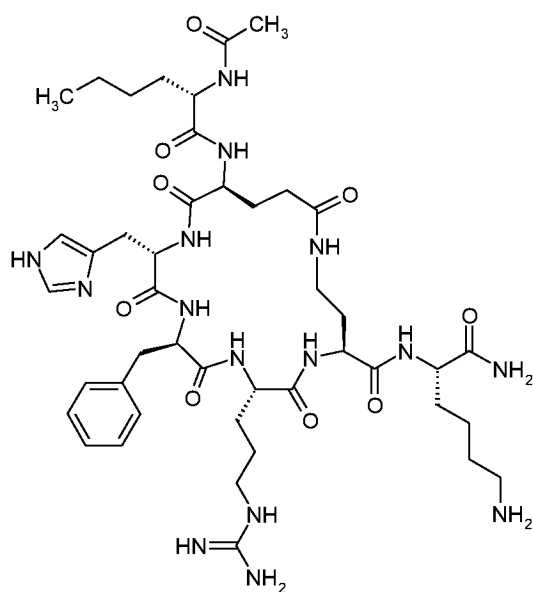
0,45

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,065

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

97%

9.39 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Lys-NH₂ (SEQ ID NO:42)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

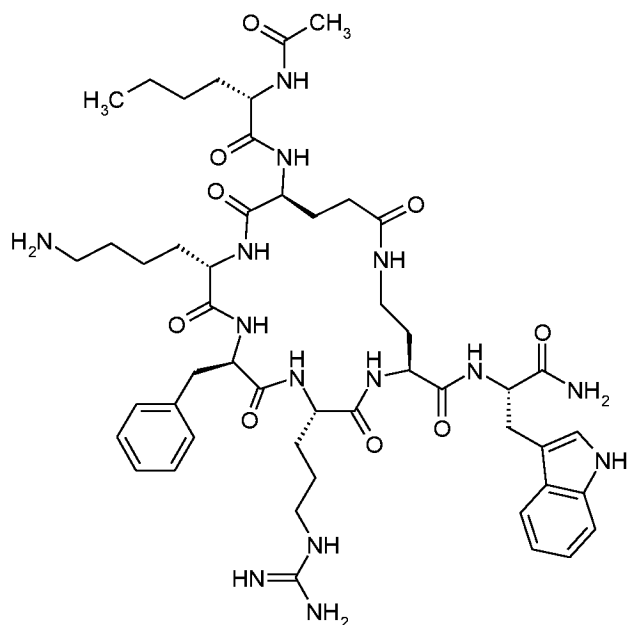
7375

МС-1 Ki (среднее)

2

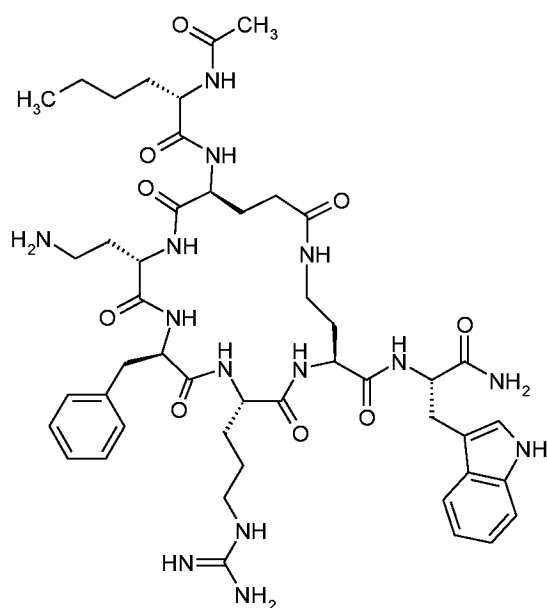
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,175
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	91%

9.40 Ac-Nle-цикло(Glu-Lys-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:43)



Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	95
MC-1 Ki (среднее)	0,04
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,006
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	108%

9.41 Ac-Nle-цикло(Glu-Dab-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:44)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

98

МС-1 Ki (среднее)

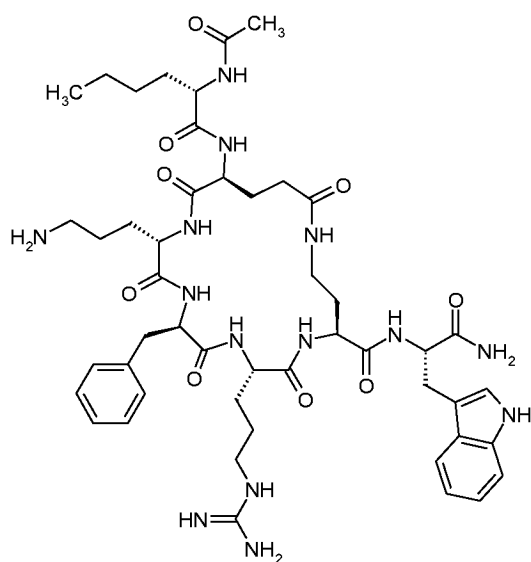
0,05

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,008

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

108%

9.42 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:45)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

45

МС-1 Ki (среднее)

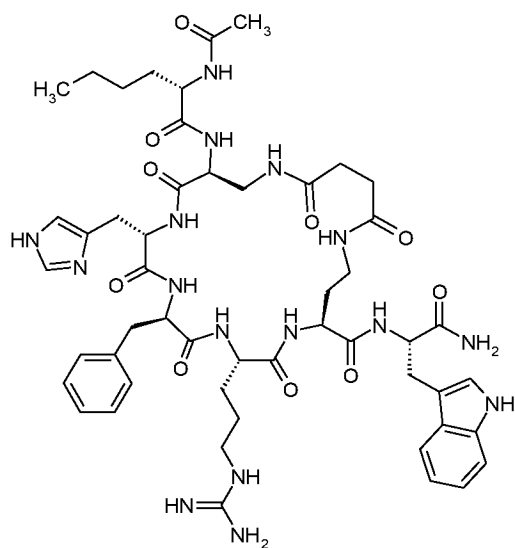
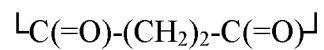
0,015

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,002

MC-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

109%

9.43 Ac-Nle-цикло(Dap-His-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:46)**Анализ****Результат**

MC-4 Ki (среднее)

860

MC-1 Ki (среднее)

0,065

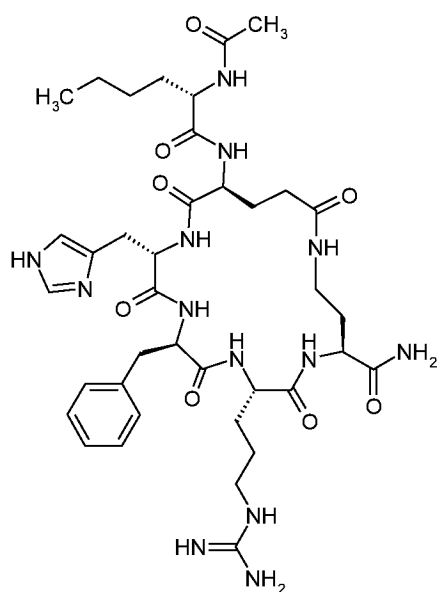
MC-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,016

MC-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

85%

9.44 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:47)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

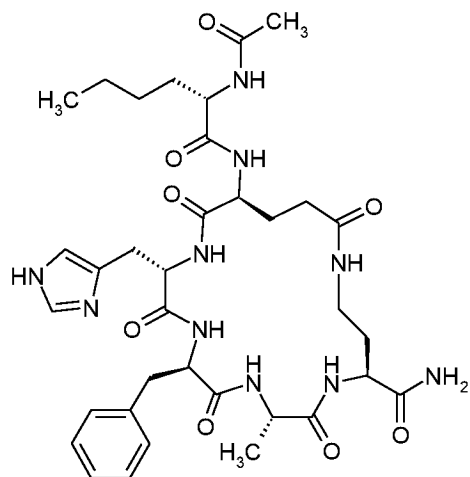
7

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,32

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

85%

9.45 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Ala-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:48)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

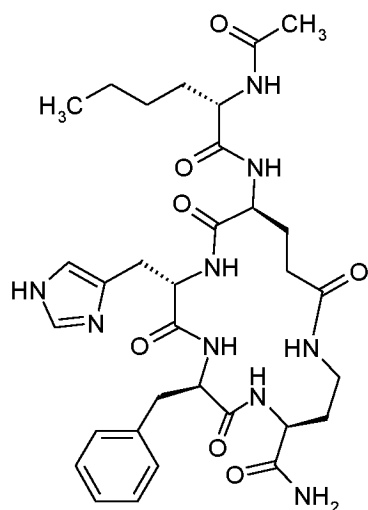
645

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

44

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

73%

9.46 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:49)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

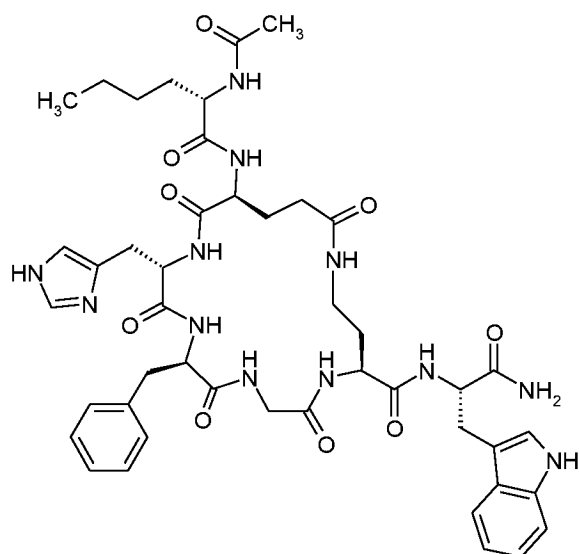
10000

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

н/о

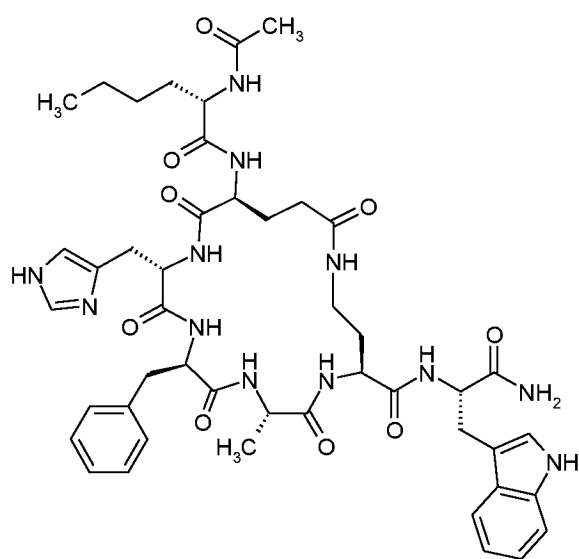
МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

51%

9.47 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Gly-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:50)**Анализ****Результат**

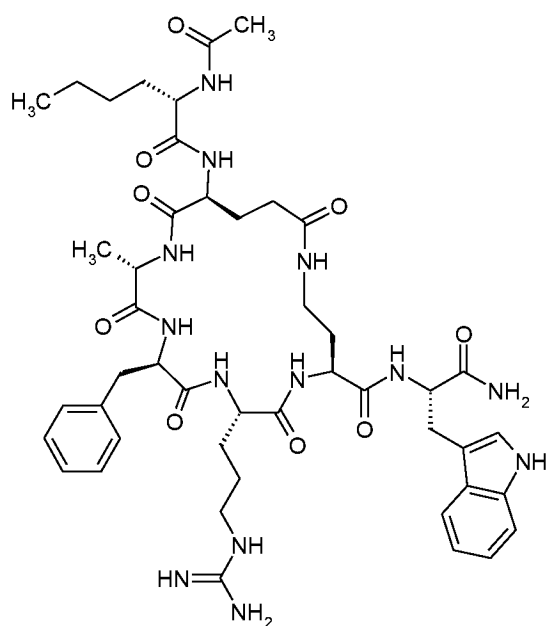
MC-4 Ki (среднее)	10000
MC-1 Ki (среднее)	9
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	4
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	59%

9.48 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Ala-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:51)



Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	10000
MC-1 Ki (среднее)	0,8
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,115
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	72%

9.49 Ac-Nle-цикло(Glu-Ala-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:52)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

455

МС-1 Ki (среднее)

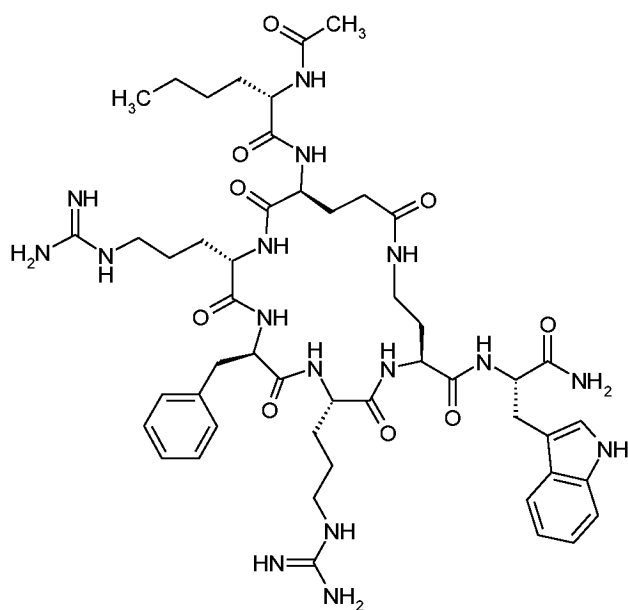
4

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,21

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

86%

9.50 Ac-Nle-цикло(Glu-Arg-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:53)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

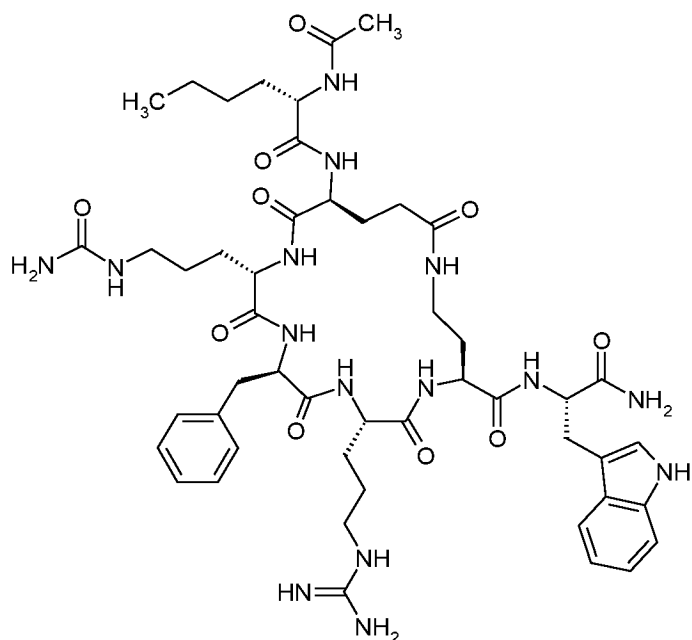
20

МС-1 Ki (среднее)

0,014

MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,003
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	100%

9.51 Ac-Nle-цикло(Glu-Cit-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:54)

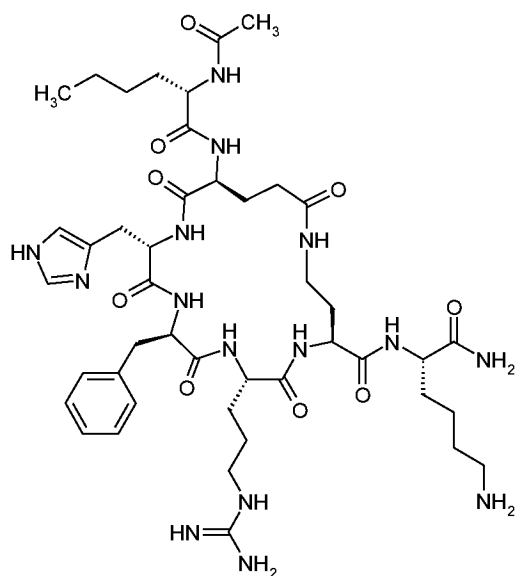


Анализ

Результат

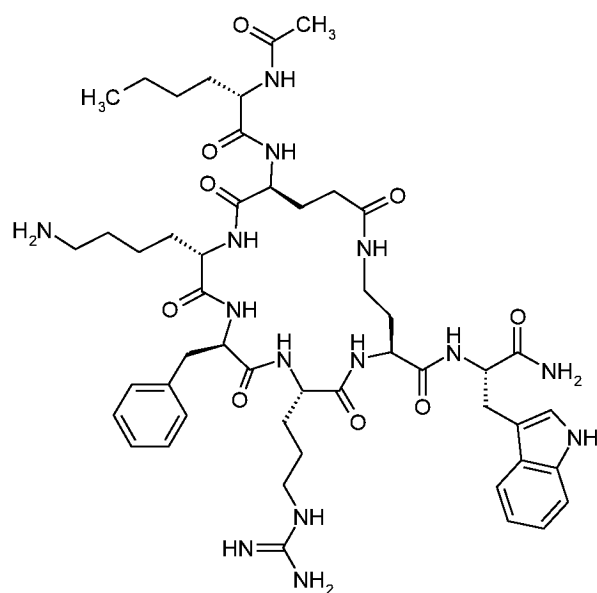
MC-4 Ki (среднее)	98
MC-1 Ki (среднее)	0,45
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,065
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	97%

9.52 Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dab)-Lys-NH₂ (SEQ ID NO:55)



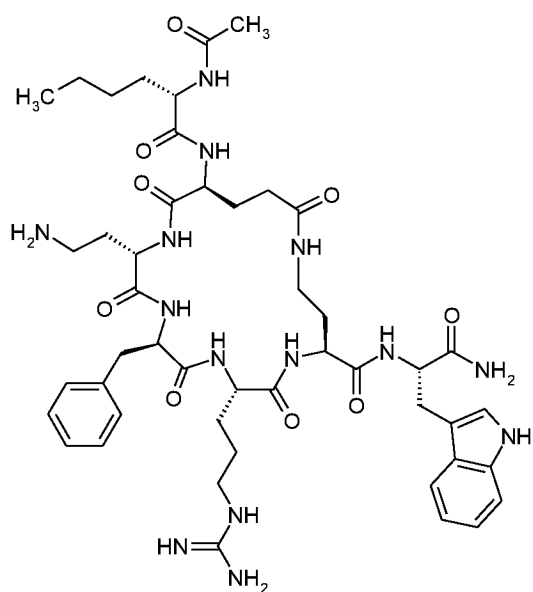
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	7375
МС-1 Ki (среднее)	2
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,175
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	91%

9.53 Ac-Nle-цикло(Glu-Lys-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:56)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	95
МС-1 Ki (среднее)	0,04
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,006
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	108%

9.54 Ac-Nle-цикло(Glu-Dab-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:57)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

98

МС-1 Ki (среднее)

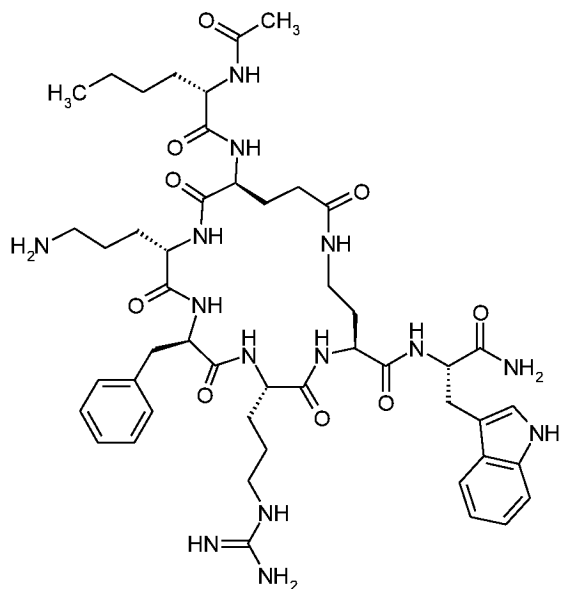
0,05

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,008

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

108%

9.55 Ас-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:58)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

45

МС-1 Ki (среднее)

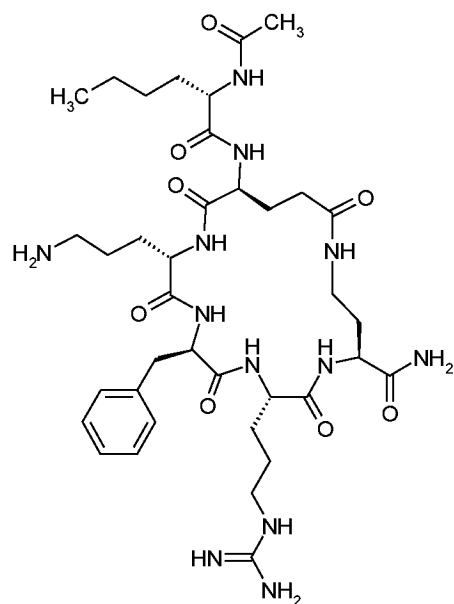
0,015

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,002

MC-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

109%

9.56 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:59)**Анализ****Результат**

MC-4 Ki (среднее)

3625

MC-1 Ki (среднее)

4

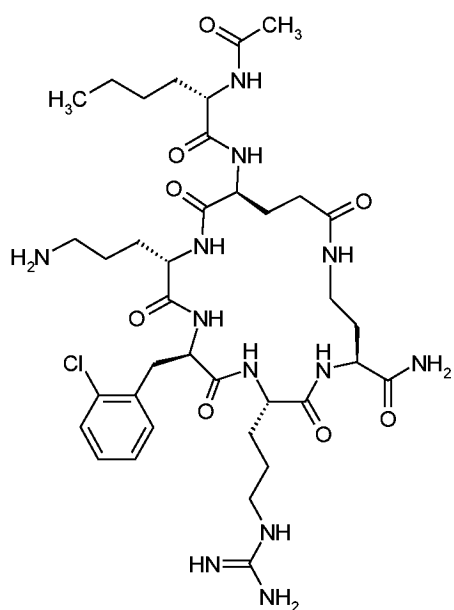
MC-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,5

MC-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

102%

9.57 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(2-Cl)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:60)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

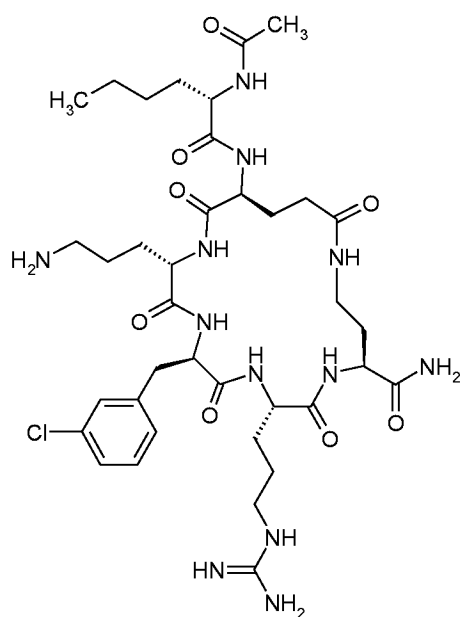
30

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

1

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

88%

9.58 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(3-Cl)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:61)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

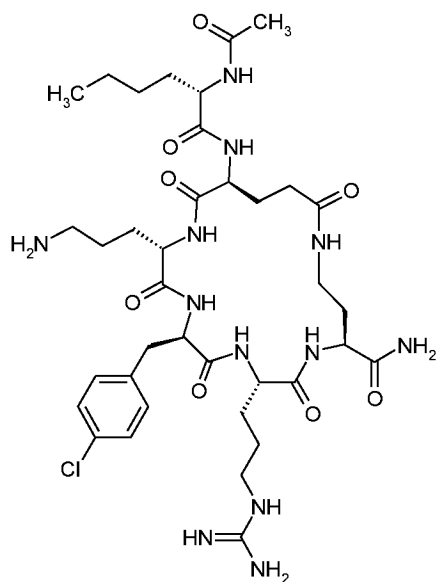
10000

МС-1 Ki (среднее)

35

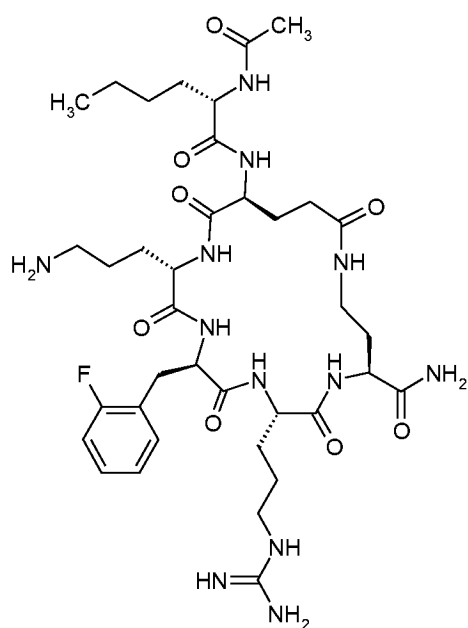
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	2
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	86%

9.59 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(4-Cl)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:62)



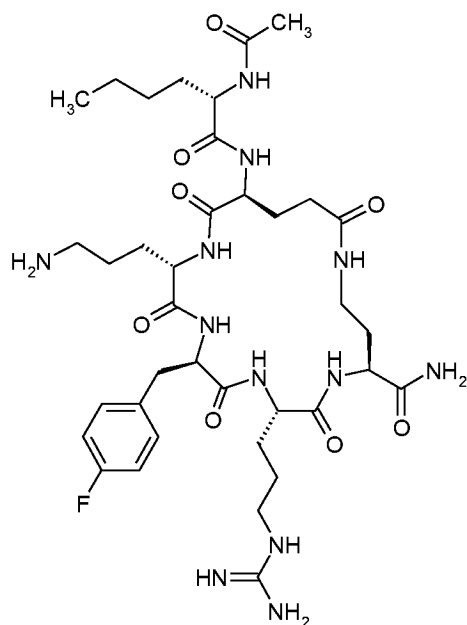
Анализ	Результат
MC-4 Ki (среднее)	1235
MC-1 Ki (среднее)	2
MC-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,1
MC-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	100%

9.60 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(2-F)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:63)



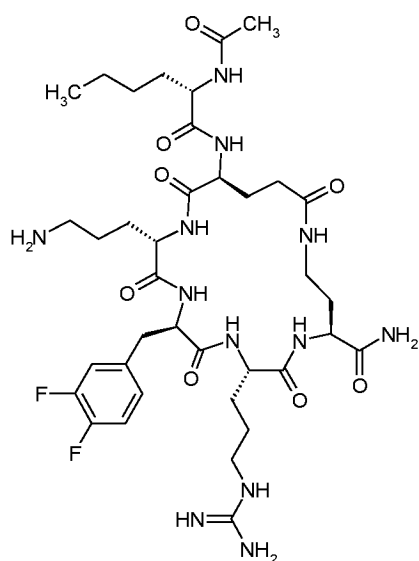
Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	10000
МС-1 Ki (среднее)	18
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,8
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	95%

9.61 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(4-F)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:64)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	10000
МС-1 Ki (среднее)	20
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	1
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	102%

9.62 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(3,4-F)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:65)

**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

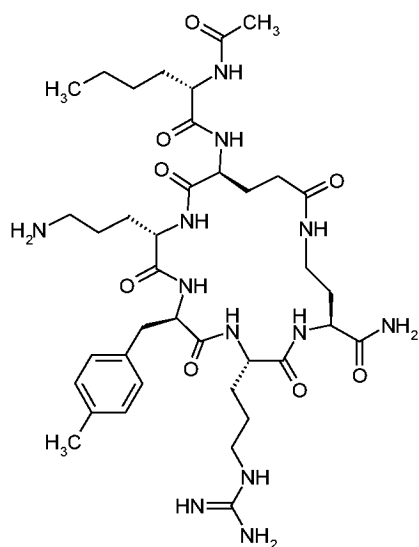
40

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

1

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

97%

9.63 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(4-Me)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:66)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

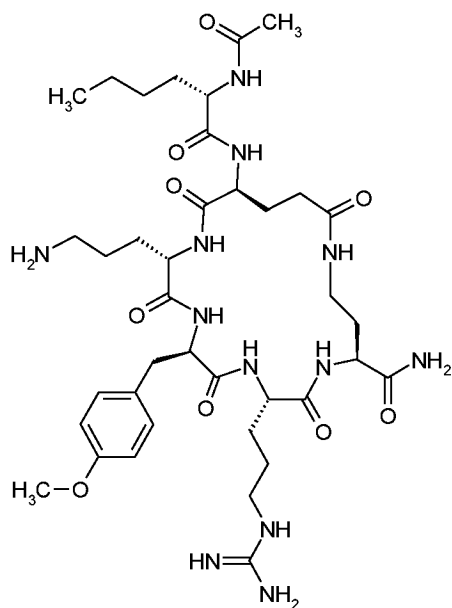
3

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,076

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

96%

9.64 Ac-Nle-цикло(Glu-Orn-D-Phe(4-OMe)-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:67)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)

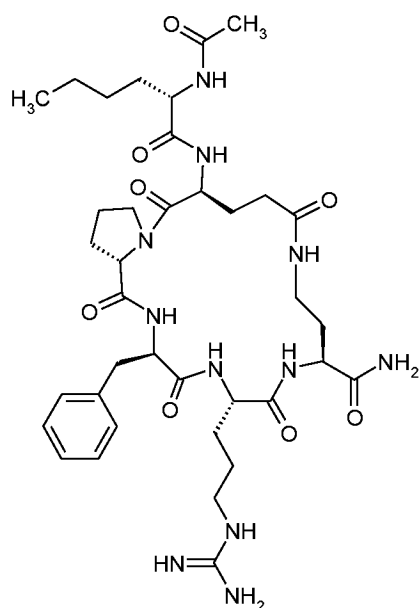
2

МС-1 EC₅₀ (среднее; цАМФ HBL)

0,12

МС-1 E_{max} (среднее; цАМФ HBL)

99%

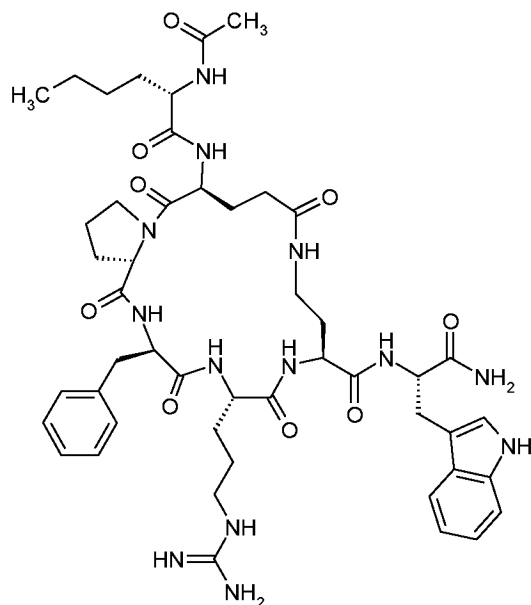
9.65 Ac-Nle-цикло(Glu-Pro-D-Phe-Arg-Dab)-NH₂ (SEQ ID NO:68)**Анализ****Результат**

МС-4 Ki (среднее)

10000

МС-1 Ki (среднее)	2250
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	332
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	102%

9.66 Ас-Nle-цикло(Glu-Pro-D-Phe-Arg-Dab)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:69)



Анализ	Результат
МС-4 Ki (среднее)	185
МС-1 Ki (среднее)	3
МС-1 EC ₅₀ (среднее; цАМФ HBL)	0,18
МС-1 E _{max} (среднее; цАМФ HBL)	97%

10. Примеры многочастичных составов, используемых в изобретении.

Были изготовлены составы партий, описанных ниже:

Ингредиент	Количество (г)								
	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия
	я 22	я 23	я 24	я 27	я 31	я 41	я 40	я 42	я 49
Eudragit L100-55		-	49,5	35,5	-	23,25	19,00	19,8	23,25
Eudragit S100		-	-		49,5	23,00	15,00	29,7	23,00
Eudragit	9,9	49,5	-		-	-	15,00	-	-

L100

Eudragit

-	-	-	12,0	-	3,75	-	-	3,75
---	---	---	------	---	------	---	---	------

FS30D

Пептид 9.3	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	1,00	0,5	-
Ацетон	70	350	350	350	350	350	350	350	350
Вода	-	-	-	-	5	10	10	10	-
Метанол	5	20	20	-	10	-	-	-	-
Выход, %	97,7	98,1	96,9	96,8	98,9	95,6	97,2	97,6	97,4

Содержание циклического пептида из примера 9.3 в различных партиях составляло от примерно 1% до 2% (мас./мас. пептид/полимер). Для анализов применяли методы ВЭЖХ с колонкой C-18, включая исследования высвобождения циклического пептида в различных кислотах и интервалах pH. Содержание лекарственного средства и эффективность капсулирования микрочастиц определяли по окончании производственного процесса. Качества микрочастиц охарактеризовывали методом высвобождения *in vitro*.

Содержание лекарственного средства определяли путем растворения микрочастиц известной массы в соответствующем объеме фосфатного буфера (1 л буфера, содержащего 0,5 мл фосфорной кислоты с pH, доведенным до 7,5 с помощью гидроксида натрия), pH 7,5-8,0. Полученный раствор анализировали на содержание лекарственного средства с помощью ВЭЖХ. Для определения эффективности инкапсуляции (ЕЕ) микрочастицы промывали 0,1 М HCl, сушили и использовали как описано для загрузки лекарственного средства. Содержание лекарственного средства и значения ЕЕ рассчитывали на основе исходных масс лекарственного средства и полимера. Содержание лекарственного средства превышало 99%, а эффективность инкапсуляции всех приготовленных образцов превышала 95%.

Теоретическое содержание лекарства (г)	Фактическое содержание (г)	Эффективность инкапсуляции после промывки (%)
1,0	0,994	96,4%
1,2	1,191	97,7%
2,0	1,993	95,9%

Растворение микрочастиц Eudragit®, содержащих циклический пептид из примера 9.3, проводили с использованием прибора USP 2, начиная с 500 мл кислоты, которая представляла собой 0,1 М HCl с pH 1,2, или ацетатного буфера с pH 4,5. Примерно 1 г микрочастиц взвешивали с высокой точностью и суспендировали в кислоте при 37°C в течение 2 часов. Затем pH среды последовательно доводили до pH 5,5 в течение 1 часа, до pH 6,8 в течение еще одного часа и, наконец, до pH 7,4 в течение 7 часов.

На Фигурах 4-11 представлены характерные профили высвобождения циклического пептида из примера 9.3 из микрочастиц, полученных с использованием различных полимеров Eudragit® и их смесей. В общем, высвобождение лекарства зависело от pH, а скорость зависела от типа используемого полимера.

На Фигурах 4-8 приведены профили высвобождения циклического пептида из примера 9.3 из микрочастиц, полученных с использованием указанных полимеров Eudragit® и их смесей. Как видно из ФИГ. 8, высвобождение пептида зависело от pH, высвобождение отсутствовало при pH 4,5-5,5, а почти полное высвобождение наблюдалось при pH 4,5-7,5.

Одним из целевых профилей продукта было высвобождение лекарственного средства по всему ЖКТ, начиная примерно с 20% при pH 5,5. Были исследованы смеси микрочастиц, приготовленных с использованием различных полимеров. На ФИГ. 9 приведены профили высвобождения, полученные из смешанных микрочастиц. Для дальнейшей разработки была выбрана партия 38, содержащая 40% партии 29, 30% партии 27 и 30% партии 31. Чтобы упростить процесс приготовления и обеспечить однородность смеси, было приготовлена партия микрочастиц (партия 41) путем совместного растворения типов полимеров в том же соотношении, что и в смешанных микрочастицах партии 38, которую использовали при приготовлении микрочастиц так, чтобы состав содержал примерно 46,5% Eudragit® L100-55, 46% Eudragit® S100 и 7,5% Eudragit® FS30D в пересчете на массу. На ФИГ. 10 приведены профили высвобождения партии 41, которую приготовили из предварительно смешанных полимеров в том же соотношении, что и смесь микрочастиц партии 38. Эта партия была выбрана для оценки фармакокинетики и эффективности в ходе доклинического исследования. На ФИГ. 11 показан повторный профиль растворения партий 41 (n=3).

Микрочастицы плацебо (партия 49), содержащие такую же смесь полимеров Eudragit®, как в партии 41, готовили и использовали в качестве разбавителя для активной партии 41 и помещали в доклиническую капсулу размера 9 для крыс. Плацебо и активные

микрочастицы взвешивали и смешивали геометрическим разведением. Было проведено испытание однородности смеси, и микрочастицы заполняли в доклинические капсулы до 17 мг массы заполнения. Капсулы с содержанием циклического пептида примера 9.3 100, 50, 20 или 10 мкг готовили для тестирования на животных моделях. Все заполненные капсулы взвешивали индивидуально и записывали вес.

11. Экспериментальные модели.

11.1 Оценка селективности циклического пептида из примера 9.3 *in vitro* по сравнению с эндогенными агонистами MC1r АКТГ (адренокортикотропным гормоном) и α -MSH (альфа-меланокортин-стимулирующим гормоном) была проведена в Серер во Франции. Результаты были следующими:

	Функциональный - CEREP (EC₅₀; нМ)				
	MC1r	MC2r	MC3r	MC4r	MC5r
α -MSH	4,47	>10000	9,8	10,8	560
АКТГ	980	4,8	390	350	4100
Пример 9,3	0,57	>10000	>10000	510	>10000

11.2 Проведение исследований активности и безопасности *in vitro*. Циклический пептид примера 9.3 продемонстрировал индуцированное липополисахаридом ингибирование ФНО- α , сопоставимое с α -MSH и АКТГ. Отдельно, в лидирующем профиле Eurofins активность не была обнаружена ни в одном из 72 анализов *in vitro* при 10 мкМ.

11.3 Циклический пептид примера 9.3 оценивали на крысиной модели воспаления кишечника с канюлированием, в которой динитробензолсульфоновую кислоту (DNBS) вводили ректально в виде раствора самцам крыс Wistar весом 200 г для индукции воспаления просвета кишечника. Крысам имплантировали катетер в проксимальную часть восходящей ободочной кишки, который выходил за заднюю часть шеи для введения дозирования. В группах по 10 животных крысы получали дозу: 0,5 мкг и 5,0 мкг циклического пептида примера 9.3 и носитель (стерильная вода) путем внутритолстокишечной инъекции через 24 ч, 12 ч и 2 ч до и через 6 ч после введения DNBS, с последующим дозированием два раза в день в течение 5 дней подряд до 7 дня. Неканюлированным контрольным крысам вводили сульфасалазин (положительный контроль) и носитель (необработанный контроль). Как видно из ФИГ. 1А и ФИГ. 1В, в крысиной модели воспаления кишечника, вызванного DNBS, циклический пептид

примера 9.3, доставленный в просвет кишечника, был так же активен, как сульфасалазин (стандарт лечения), и превосходил необработанный контроль в снижении параметров воспаления кишечника (масса ободочной кишки и оценка воспаления в баллах).

11.4 Фармакокинетику и фармакодинамику перорального капсульного состава партии 41 из раздела 10 выше, содержащего циклический пептид примера 9.3 для высвобождения в ободочной кишке, оценивали на крысах. Всего было использовано 24 крысы Sprague-Dawley весом от 250 до 350 граммов, в возрасте 7-9 недель, которых не кормили в течение ночи перед пероральным введением одной капсулы, содержащей 0,1 мг циклического пептида примера 9.3, доступ к пище и воде ограничен не был. Содержимое кишечника и ободочной кишки собирали в определенные моменты времени ($n = 20$) и после тестирования ($n = 4$). Как видно из ФИГ. 2, пероральный состав циклического пептида примера 9.3 партии 41 высвобождался в ободочной кишке и продвигался по кишечному тракту крысы за 9 часов.

11.5 В крысиной модели колита, вызванного DNBS, капсулированный пероральной состав партии 41, содержащий 10 мкг, 20 мкг и 50 мкг циклического пептида примера 9.3, оценивали при введении дважды в день (два раза в день) и сравнивали с плацебо-носителем из партии 49 и лечением сульфасалазином. Как видно из ФИГ. 3А и ФИГ. 3В, оценка воспаления с поправкой на исходный уровень и оценка макроскопического повреждения были значительно ниже (улучшены) при лечении капсулами, содержащими 50 мкг циклического пептида примера 9.3, по сравнению с плацебо-носителем, и в той же степени, что и при лечении сульфасалазином. Анализы плазмы не выявили системного присутствия циклического пептида примера 9.3.

12. Клинические исследования на людях.

Пероральный состав циклического пептида, меченого ^{14}C и, полученного в примере 9.3, готовили так же, как и партию 41. Метку ^{14}C использовали для оценки высвобождения и абсорбции пептида примера 9.3 в дистальном отделе ЖКТ после введения однократной пероральной дозы. Была выбрана комбинация полиметакрилатов Eudragit® L100-55, Eudragit® S-100 и Eudragit® FS30D, которые использовали в массовом соотношении 23,25:23,0:12,5, где масса L100-55 и S-100 - это масса сухого твердого материала, а массу FS30D рассчитывали для производимого на продажу водного состава, в котором 12,5 граммов жидкого FS30D содержали 3,75 грамма полимера, поэтому массовое соотношение полимеров составляло 23,25:23:3,75. Комбинацию полиметакрилатов помещали в ацетон и перемешивали в течение продолжительного периода.

Соответствующие количества меченого ^{14}C пептида примера 9.3 растворяли в воде и смешивали с приготовленным раствором полиметакрилатов в ацетоне, перемешивали в течение продолжительного периода времени и сушили в вакууме. Высушенный материал извлекали, разбавляли дополнительной высушенной смесью полиметакрилата, не содержащей пептид, для получения требуемой целевой концентрации в заранее определенном количестве материала, измельчали до требуемого диаметра и просеивали. Просеянный материал помещали в желатиновую капсулу размера 2 для получения перорального состава.

Пероральный состав вводили в виде микродоз 24 субъектам, распределенным в шесть групп по 4 субъекта в каждой. Субъекты в когортах с 1 по 5 получали слабительное через 5, 8, 11, 14 и 17 часов после введения дозы, а субъекты в когорте 6 слабительное не получали. Фармакокинетические анализы были проведены для образцов крови, мочи и кала у субъектов во всех когортах, включая анализ на присутствие пептида примера 9.3 и метаболита пептида примера 9.3, пептида примера 9.26 с N-концевой свободной кислотой.

Присутствие пептида примера 9.26 свидетельствует о высвобождении пептида примера 9.3 из полимерной матрицы, поскольку превращение C-концевого амида примера 9.3 в кислоту примера 9.26 может происходить только после высвобождения пептида из полимерной матрицы. Пептиды примера 9.3 и примера 9.26 были обнаружены в значимых количествах и при примерно равном содержании в проанализированных образцах фекалий. Кроме того, интактный пептид примера 9.3 или примера 9.26 не был обнаружен в плазме или моче. Единственным радиоактивным материалом, обнаруженным в моче, был фенилаланин, меченый ^{14}C . Эти результаты указывают на значительную защиту лекарственного продукта при прохождении через верхние отделы ЖКТ и доставку с последующим высвобождением лекарственного продукта в ободочную кишку. Кроме того, абсорбированного в системный кровоток лекарственного препарата не было обнаружено, о чем свидетельствует отсутствие какого-либо детектируемого пептида из примера 9.3 или примера 9.26 в образцах плазмы или мочи.

Хотя изобретение было подробно описано с конкретной ссылкой на эти предпочтительные варианты осуществления, другие варианты осуществления могут достичь тех же результатов. Варианты и модификации настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники, и предполагается, что оно охватывает все такие модификации и эквиваленты. Полные раскрытия всех ссылок,

заявок, патентов и публикаций, процитированных выше, включено в данный документ ссылкой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический состав для высвобождения в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), содержащий
пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные внутри матричной частицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения.
2. Состав по п. 1, где полимер замедленного высвобождения представляет собой полимер с рН-зависимым высвобождением.
3. Состав по п. 2, где пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть подмешаны в матричную частицу, тем самым образуя смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли.
4. Состав по п. 3, где смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли находится внутри водорастворимой капсулы.
5. Состав по п. 4, где водорастворимая капсула представляет собой желатиновую капсулу.
6. Состав по п. 3, где смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли сформована в таблетку.
7. Состав по п. 4 или п. 6, где капсула или таблетка дополнительно содержит по меньшей мере одно покрытие, выбранное из изолирующего покрытия и энтеросолюбильного покрытия.
8. Состав по п. 7, где по меньшей мере одно покрытие из изолирующего покрытия и энтеросолюбильного покрытия содержит полимерное энтеросолюбильное покрытие с рН-зависимым высвобождением.
9. Состав по п. 2, где полимер с рН-зависимым высвобождением содержит рН-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры.

10. Состав по п. 9, где pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры выбраны из группы, состоящей из Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D.
11. Состав по п. 10, где Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.
12. Состав по п. 1, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой пептид, специфичный к рецептору меланокортина-1 (MC1r), или его фармацевтически приемлемую соль.
13. Состав по п. 12, где эффективная концентрация EC_{50} MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC1r имеет значение ниже примерно одного нМ.
14. Состав по п. 13, где эффективная концентрация EC_{50} MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении рецептора меланокортина-4 (MC4r) по меньшей мере в сто раз превышает его эффективную концентрацию EC_{50} в отношении MC1r.
15. Состав по п. 14, где эффективная концентрация EC_{50} MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r имеет значение не ниже примерно 500 нМ.
16. Состав по п. 12, где MC1r-специфичный пептид или его фармацевтически приемлемая соль функционально неактивны в отношении рецептора меланокортина-2 (MC2r), рецептора меланокортина-3 (MC3r) и рецептора меланокортина-5 (MC5r).

17. Состав по п. 12, где полимер замедленного высвобождения высвобождает по меньшей мере часть MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке.
18. Состав по п. 12, где полимер замедленного высвобождения высвобождает терапевтически эффективное количество MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке.
19. Состав по п. 1, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль.
20. Состав по п. 19, где матричная частица, содержащая по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.
21. Состав по п. 20, где Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D представляют собой частицы с максимальным размером частиц не более чем 1000 мкм в диаметре.
22. Состав по п. 20, где частицы имеют максимальный размер частиц не более примерно 600 мкм в диаметре и минимальный размер частиц не менее примерно 250 мкм в диаметре.
23. Состав по п. 19, где процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения составляет не более примерно 2% в пересчете на вес.
24. Состав по п. 23, где процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в

полимере замедленного высвобождения составляет не более примерно 1% в пересчете на вес.

25. Состав по п. 19, где процентная массовая доля *Ac-Nle-цикло*(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения составляет не более примерно 10% в пересчете на вес.
26. Состав по п. 20, дополнительно содержащий по меньшей мере одно формообразующее, выбранное из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, разрыхлителя, смазывающего вещества и связующего.
27. Состав по п. 1, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения при введении пациенту-человеку осуществляет максимальное высвобождение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке.
28. Состав по п. 27, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой полимер с pH-зависимым высвобождением.
29. Состав по п. 28, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.
30. Состав по п. 1, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль функционально активны в отношении MC1r и по меньшей мере одного дополнительного рецептора меланокортина, выбранного из группы, состоящей из MC3r, MC4r и MC5r.
31. Фармацевтический состав, высвобождаемый в нижних отделах ЖКТ, получаемый способом, включающим стадии:

- a. предоставление раствора смеси Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношение, составляющее примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75;
 - b. добавление Ас-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли к раствору смеси;
 - c. сушку раствора смеси, содержащего Ас-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль; и
 - d. преобразование высушенной смеси в частицы, где размер получаемых частиц характеризуется диаметром, который составляет не более примерно 1000 мкм и не менее примерно 25 .
32. Способ по п. 31, где Ас-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль добавляют к раствору смеси Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D в количестве не более чем примерно 2% в пересчете на массу.
33. Способ по п. 31, где сушка включает вакуумную сушку.
34. Способ по п. 31, где преобразование включает измельчение высушенной смеси и просеивание через сито.
35. Способ по п. 31, где размер получаемых частиц составляет примерно от 250 мкм до 600 мкм в диаметре.
36. Состав с модифицированным высвобождением, содержащий
 МС1г-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемую соль в качестве единственного активного фармацевтического ингредиента, и
 по меньшей мере, один полимер, контролирующий высвобождение, выбранный из группы, состоящей из рН-зависимых полимеров и рН-независимых полимеров;

где при пероральном введении пациенту-человеку MC1r-специфичный циклический пептид или его фармацевтически приемлемая соль доставляется практически в неизменном виде в просвет толстой кишки пациента-человека.

37. Фармацевтическая композиция, подходящая для перорального введения, для лечения воспалительного заболевания кишечника, причем фармацевтическая композиция содержит:

ядро таблетки, причем ядро таблетки содержит активное соединение, выбранное из MC1r-специфичного циклического пептида или его фармацевтически приемлемой соли в качестве единственного активного фармацевтического ингредиента, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; а также энтеросолюбильное покрытие.

38. Фармацевтическая композиция, подходящая для перорального введения, для лечения воспалительного заболевания кишечника, причем фармацевтическая композиция содержит:

пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемую соль, размещенные внутри инкапсулированной матричной частицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения; а также энтеросолюбильное покрытие, нанесенное на капсулу.

39. Фармацевтическая композиция по п. 38, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль.

40. Фармацевтическая композиция по п. 38 или п. 39, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения содержит pH-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры.

41. Способ лечения воспалительного заболевания кишечника (ВЗК) у человека, больного ВЗК, включающий:

введение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли, размещенных внутри матричной частицы, содержащей по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения.

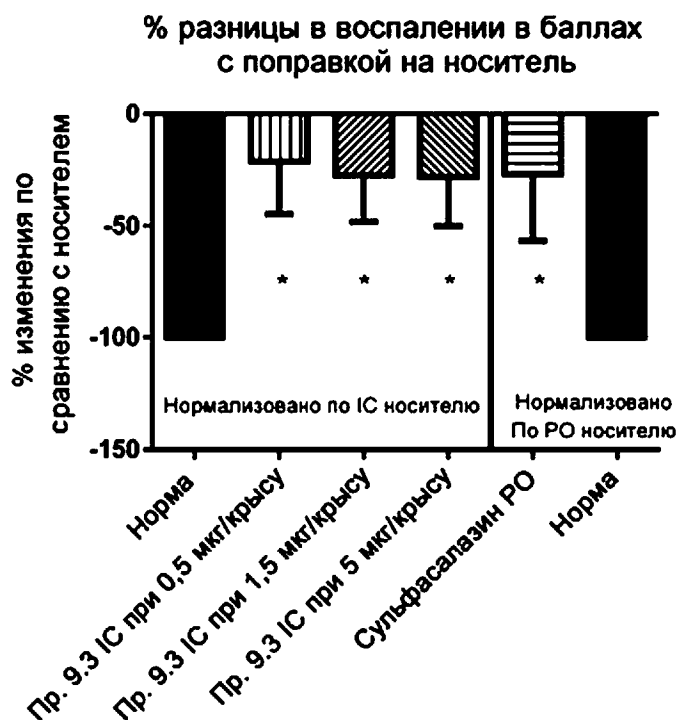
42. Способ по п. 41, где полимер замедленного высвобождения представляет собой полимер с рН-зависимым высвобождением.
43. Способ по п. 41, где пептид или его фармацевтически приемлемая соль могут быть подмешаны в матричную частицу, тем самым образуя смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли.
44. Способ по п. 42, где смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли размещена внутри водорастворимой капсулы.
45. Способ по п. 44, где водорастворимая капсула представляет собой желатиновую капсулу.
46. Способ по п. 43, где смесь матричной частицы и пептида или его фармацевтически приемлемой соли сформована в таблетку.
47. Способ по п. 46, где таблетка дополнительно содержит энтеросолюбильное покрытие.
48. Способ по п. 46, где энтеросолюбильное покрытие содержит полимер с рН-зависимым высвобождением.
49. Способ по п. 42, где полимер с рН-зависимым высвобождением содержит рН-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры.
50. Способ по п. 49, где рН-чувствительные метилметакрилатные/метакриловые сополимеры выбраны из группы, состоящей из Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D.

51. Способ по п. 50, где Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.
52. Способ по п. 41, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой MC1r-специфичный пептид или его фармацевтически приемлемую соль.
53. Способ по п. 52, где эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC1r имеет значение ниже примерно одного нМ.
54. Способ по п. 53, где эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r по меньшей мере в сто раз превышает его эффективную концентрацию EC₅₀ в отношении MC1r.
55. Способ по п. 53, где эффективная концентрация EC₅₀ MC1r-специфичного пептида или его фармацевтически приемлемой соли в отношении MC4r имеет значение не ниже примерно 500 нМ.
56. Способ по п. 52, где MC1r-специфичный пептид или его фармацевтически приемлемая соль функционально неактивны в отношении MC2r, MC3r и MC5r.
57. Способ по п. 41, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемую соль.
58. Способ по п. 57, где матричная частица, содержащая по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

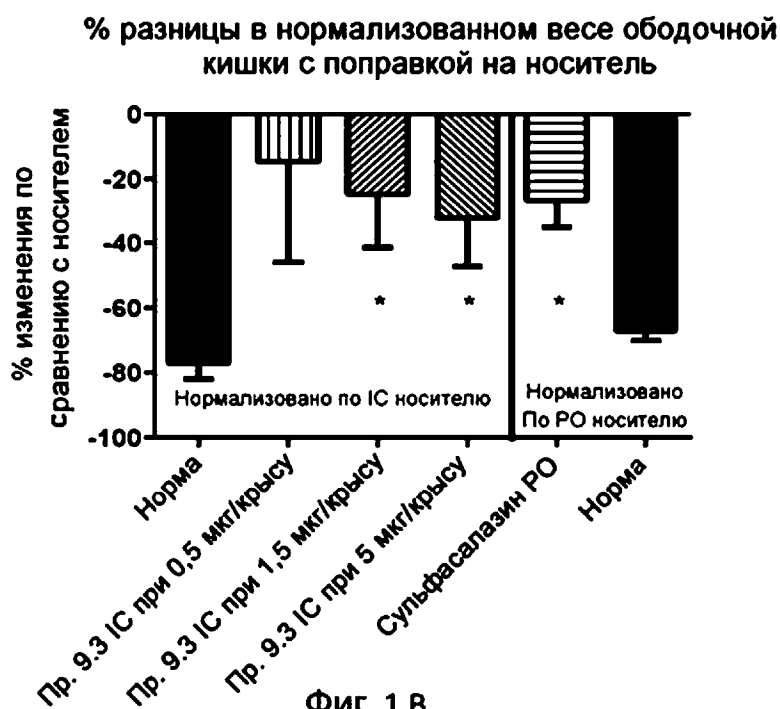
59. Способ по п. 58, где Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и Eudragit® FS30D представляют собой частицы с максимальным размером частиц не более чем 1000 мкм в диаметре.
60. Способ по п. 58, где частицы имеют максимальный размер частиц не более примерно 600 мкм в диаметре и минимальный размер частиц не менее примерно 250 мкм в диаметре.
61. Способ по п. 57, где процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения составляет не более примерно 2% в пересчете на вес.
62. Способ по п. 57, где процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения составляет не менее примерно 1% в пересчете на вес.
63. Способ по п. 57, где процентная массовая доля Ac-Nle-цикло(Glu-His-D-Phe-Arg-Dap)-Trp-NH₂ (SEQ ID NO:6) или его фармацевтически приемлемой соли в полимере замедленного высвобождения составляет не менее примерно 10% в пересчете на вес.
64. Способ по п. 41, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения при введении пациенту-человеку, больному ВЗК, осуществляет максимальное высвобождение пептида, специфичного к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемой соли в ободочной кишке.
65. Способ по п. 64, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой полимер с рН-зависимым высвобождением.
66. Способ по п. 65, где по меньшей мере один полимер замедленного высвобождения представляет собой смесь, содержащую Eudragit® L100-55, Eudragit® S100 и

Eudragit® FS30D, которые присутствуют в массовом отношении L100-55 к S100 к FS30D, выбранном из группы, включающей соотношения, составляющие примерно 6:6:1, или примерно 6,2:6,2:1, или примерно 23,25:23:3,75.

67. Способ по п. 41, где пептид, специфичный к рецептору меланокортина, или его фармацевтически приемлемая соль функционально активны в отношении MC1r и по меньшей мере одного дополнительного рецептора меланокортина, выбранного из группы, состоящей из MC3r, MC4r и MC5r.

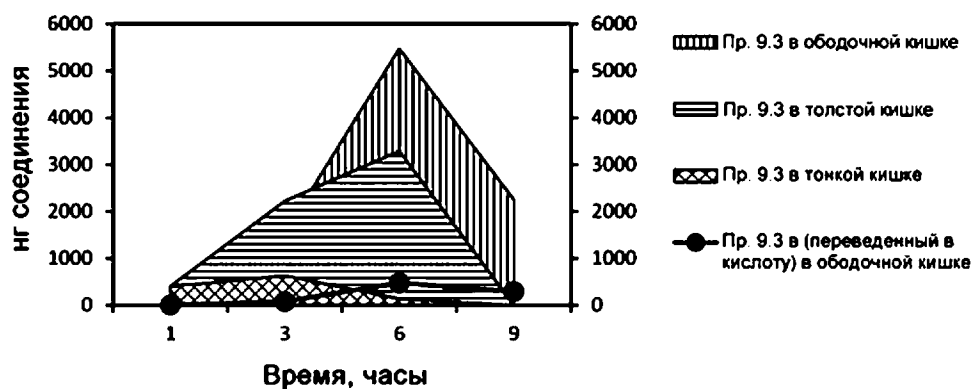


Фиг. 1 А



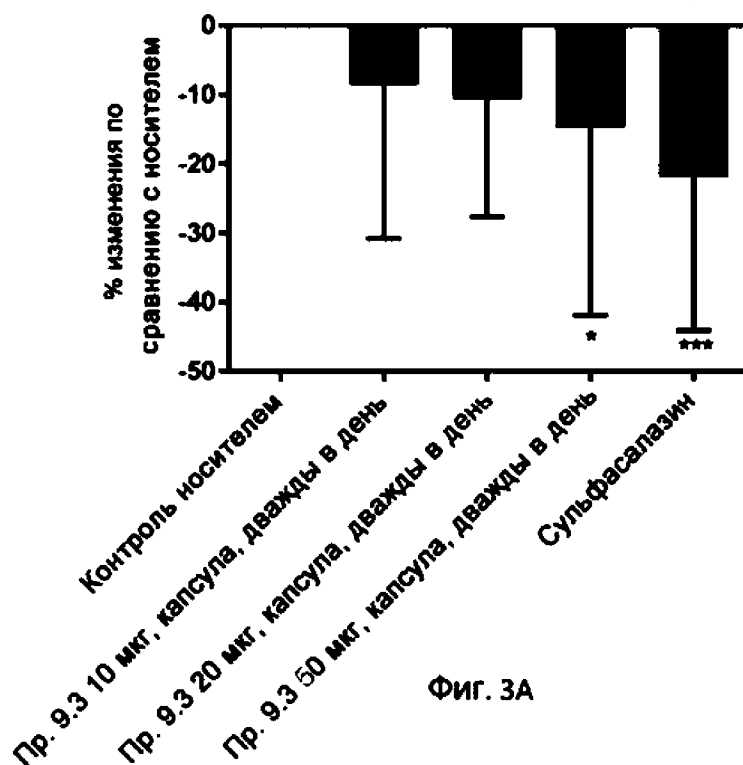
Фиг. 1 В

Пептид примера 9.3 в кишечнике после введения капсулы



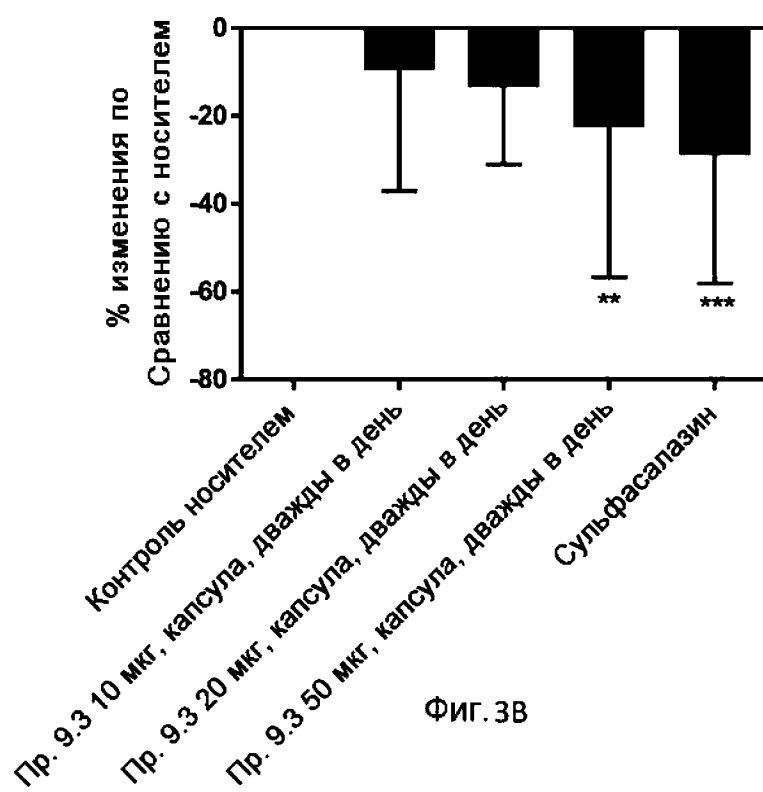
Фиг. 2

Оценка макроскопического повреждения в баллах с поправкой на исходный уровень

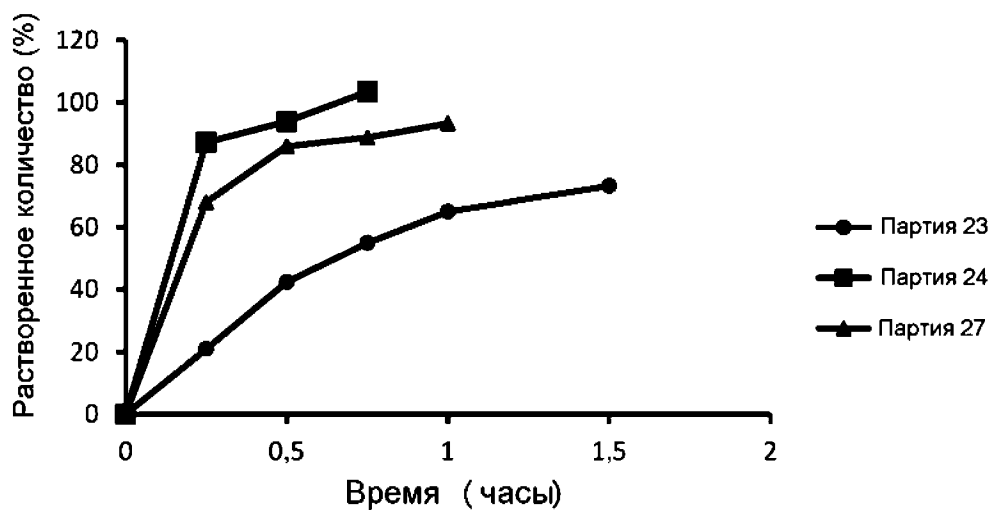


Фиг. 3А

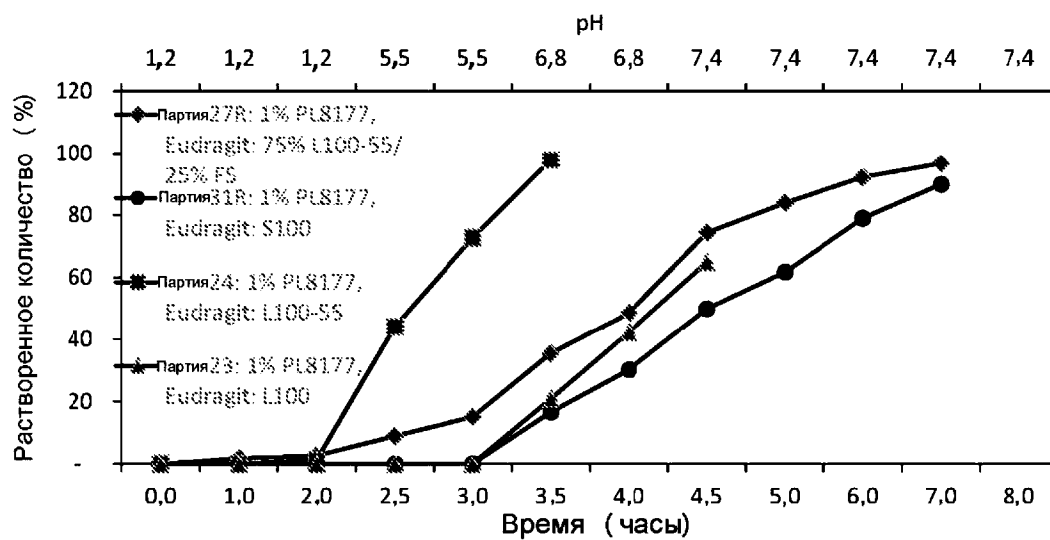
Оценка воспаления в баллах с поправкой на исходный уровень



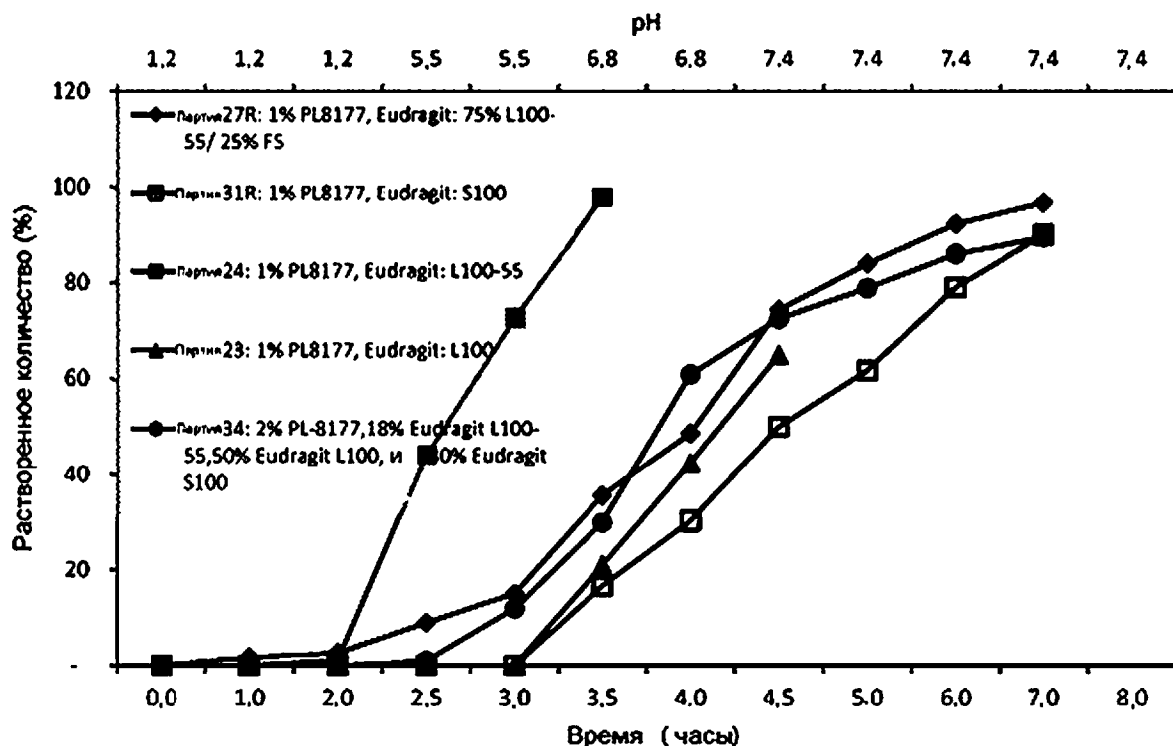
Фиг.3В



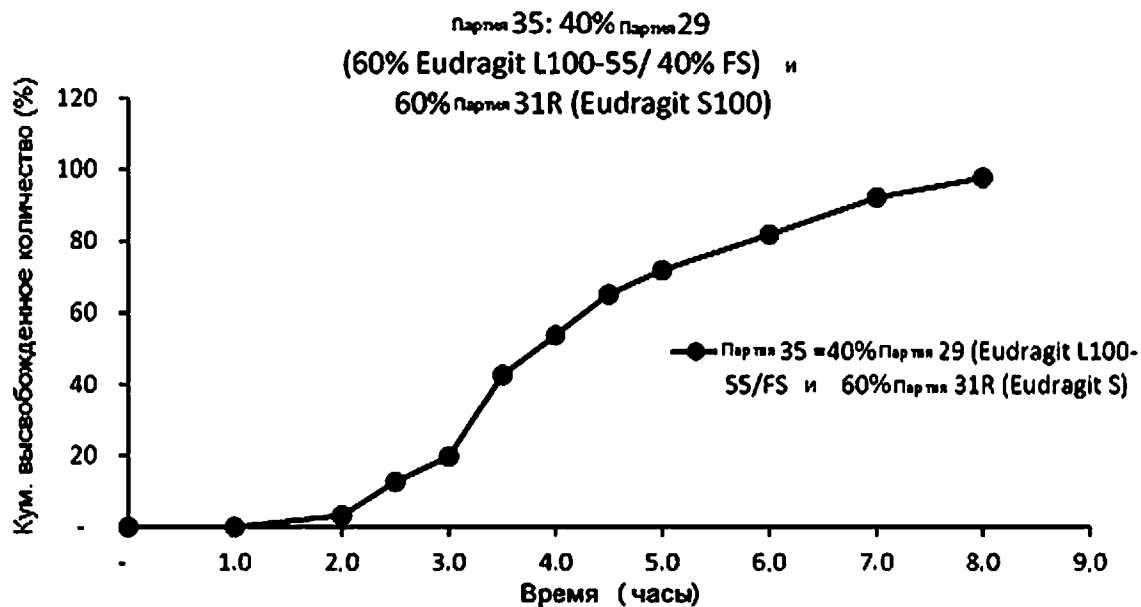
Фиг. 4



Фиг. 5

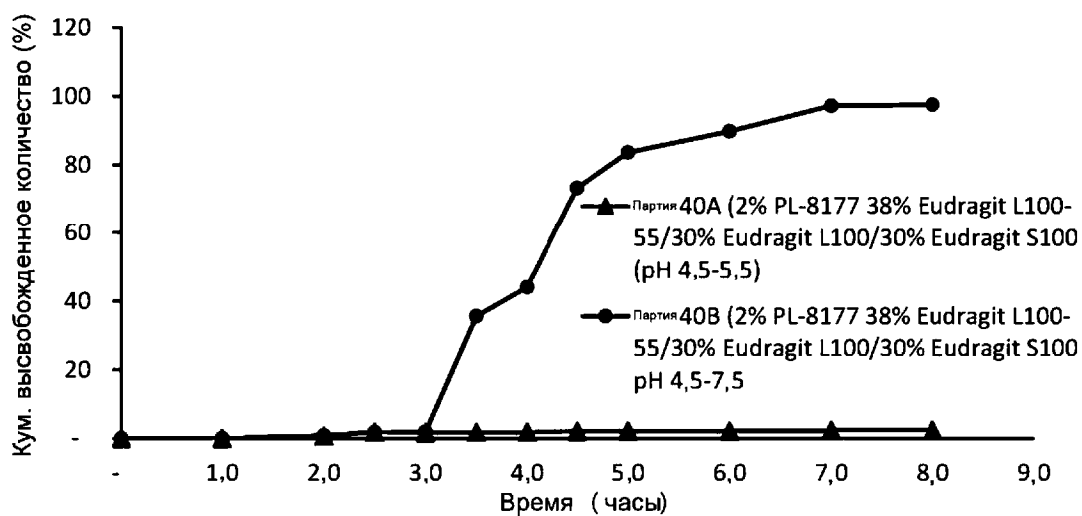


Фиг. 6

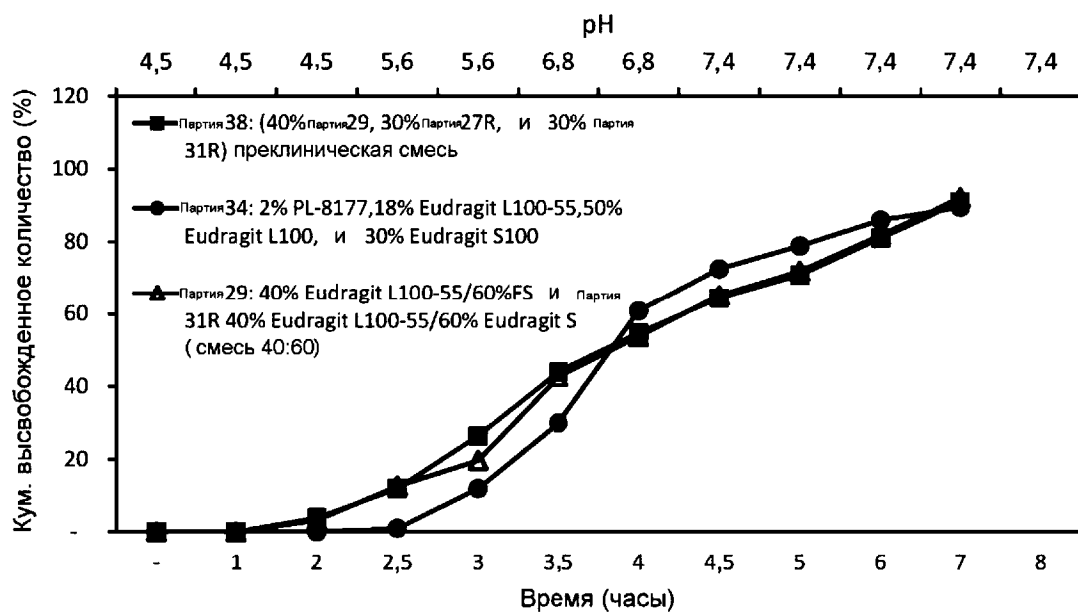


Фиг. 7

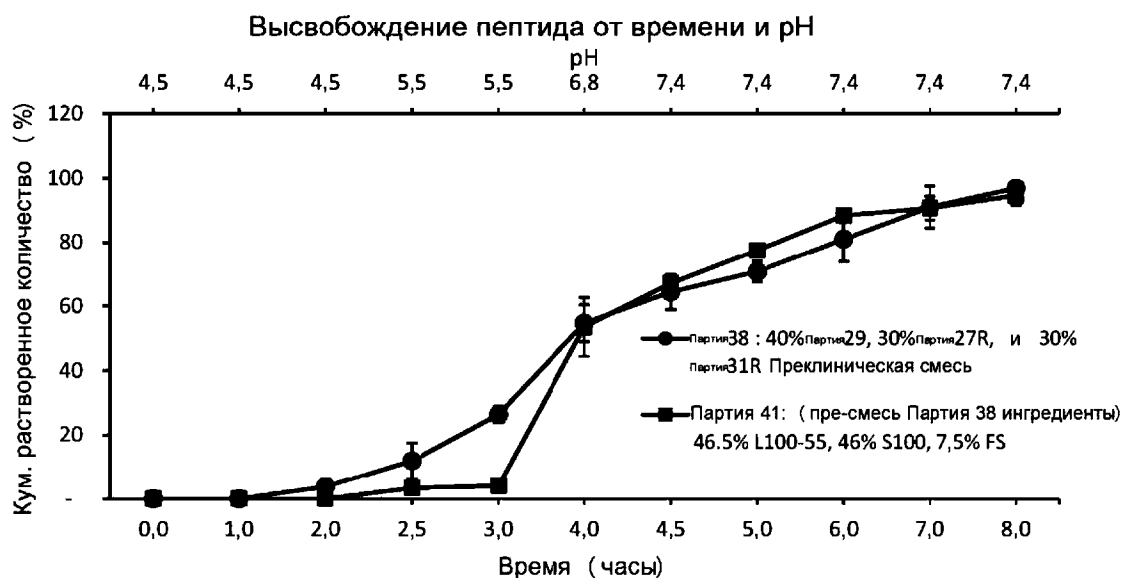
Партия 40 при pH 4,5/5,5 в течение 8 часов или pH 4,5-7,5 в течение 8 часов



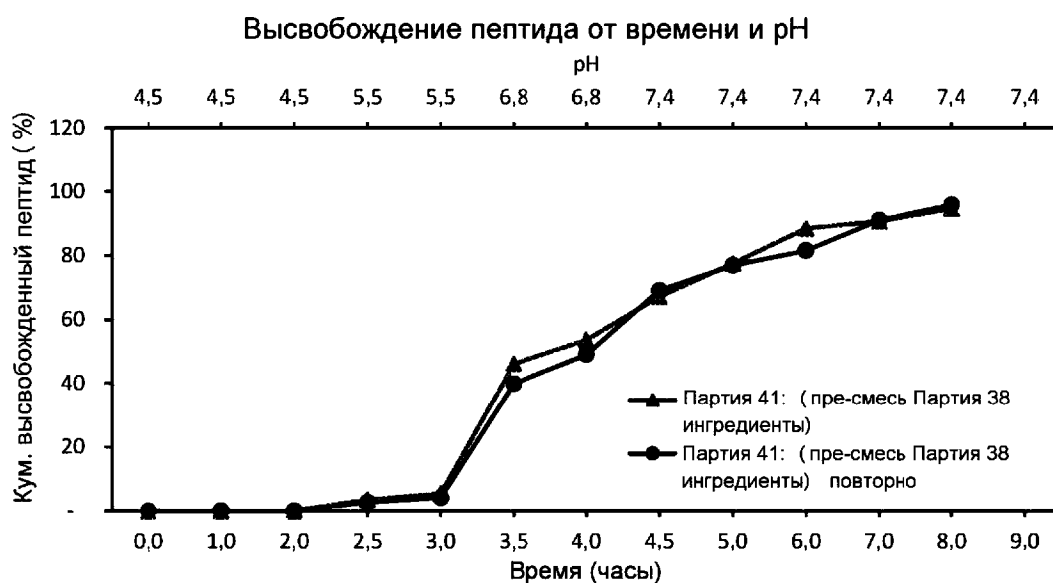
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11