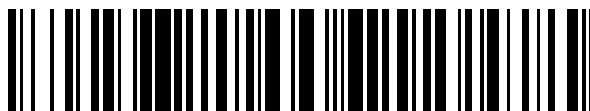


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 626**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013** **PCT/US2013/061911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14052583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013** **E 13773562 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2900230**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de obesidad y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**27.09.2012 US 201261706153 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.01.2019**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER  
CORPORATION (50.0%)  
55 Shattuck Street  
Boston, Massachusetts 02115, US y  
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**OZCAN, UMUT;  
MAJZOUN, JOSEPH;  
MAZITSCHK, RALPH;  
CAKIR, ISIN y  
CABI, SERKAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 696 626 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de obesidad y procedimientos de uso de los mismos

### Campo de la invención

Esta invención está en el campo de compuestos para regular la obesidad y procedimientos para la fabricación y el uso de los mismos.

### Antecedentes de la invención

La obesidad es una afección médica en la que el exceso de grasa corporal se ha acumulado hasta el grado en que puede tener un efecto adverso en la salud, dando lugar a una esperanza de vida reducida y/o problemas de salud aumentados. El índice de masa corporal (IMC), una medición que compara el peso y la altura, define a las personas con sobrepeso (pre-obesas o con sobrepeso) si su IMC está entre 25 y 30 kg/m<sup>2</sup> y obesas cuando es mayor que 30 kg/m<sup>2</sup>. La obesidad es una causa principal prevenible de mortalidad en todo el mundo, con prevalencia en aumento en adultos y niños, y las autoridades lo ven como uno de los problemas de salud pública más serios del siglo 21.

La obesidad aumenta el riesgo de muchos trastornos físicos y mentales. El peso corporal excesivo se asocia a diversas enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus de tipo 2, apnea del sueño obstructiva, ciertos tipos de cáncer y osteoartritis. Estas enfermedades están directamente causadas por la obesidad o bien indirectamente relacionadas a través de mecanismos que comparten una causa común tales como una dieta pobre y/o un estilo de vida sedentario. Uno de los enlaces más fuertes es con la diabetes de tipo 2. El exceso de grasa corporal subyace un 64 % de los casos de diabetes en hombres y un 77 % de los casos en mujeres. Los aumentos de la grasa corporal aumentan la respuesta del cuerpo a la insulina, dando lugar posiblemente a resistencia a la insulina.

La obesidad está causada más comúnmente por una combinación de ingesta de energía excesiva, carencia de actividad física y susceptibilidad genética, aunque unos pocos casos están causados principalmente por genes, trastornos endocrinos, medicaciones o enfermedad psiquiátrica. Desde el descubrimiento de la leptina en 1994, se han elucidado muchos otros mecanismos hormonales que participan en la regulación del apetito y la ingesta de alimentos, los patrones de almacenamiento del tejido adiposo y el desarrollo de la resistencia a insulina, incluyendo la grelina, la insulina, la orexina, el PYY 3-36, la colecistoquinina y la adiponectina.

Las adipocinas son mediadores producidos por el tejido adiposo; se cree que su acción modifica muchas enfermedades relacionadas con la obesidad. La leptina y la grelina se consideran ser complementarias en su influencia en el apetito, modulando la grelina producida por el estómago el control del apetito a corto plazo (es decir, comer cuando el estómago está vacío y parar cuando el estómago se estrecha). La leptina se produce por el tejido adiposo para señalar las reservas de almacenamiento de grasa en el cuerpo y media los controles del apetito a largo plazo (es decir, comer más cuando los almacenamientos de grasa son bajos y menos cuando los almacenamientos de grasa son altos). Aunque la administración de leptina puede ser eficaz en un pequeño subconjunto de individuos obesos que son deficientes en leptina, se cree que la mayoría de individuos obesos son resistentes a leptina y se ha descubierto que tienen altos niveles de leptina. Esta resistencia se cree que explica en parte por qué la administración de leptina no ha demostrado ser eficaz suprimiendo el apetito en la mayoría de gente obesa.

Aunque la leptina y la grelina se producen periféricamente, controlan el apetito a través de sus acciones en el sistema nervioso central. En particular, la leptina y la grelina y otras hormonas relacionadas con el apetito actúan en el hipotálamo, una región del cerebro central a la regulación de la ingesta de comida y el gasto energético. Hay varios circuitos dentro del hipotálamo que contribuyen a su papel integrando el apetito, siendo la ruta de la melanocortina la mejor entendida. El circuito comienza con el núcleo arcuato, un área del hipotálamo que tiene salidas al hipotálamo lateral y al hipotálamo ventromedial, los centros de la alimentación y la saciedad del cerebro, respectivamente.

El núcleo arcuato contiene dos grupos distintos de neuronas. El primer grupo co-exprende el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agutí (AgRP) y tiene entradas estimuladoras a la LH y entradas inhibitorias al VMH. El segundo grupo co-exprende pro-opiomelanocortina (POMC) y transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y tiene entradas estimuladoras al VMH y entradas inhibitorias a la LH. En consecuencia, las neuronas NPY/AgRP estimulan la alimentación e inhiben la saciedad, mientras que las neuronas POMC/CART estimulan la saciedad e inhiben la alimentación. Ambos grupos de neuronas del núcleo arcuato se regulan en parte por la leptina. La leptina inhibe el grupo NPY/AgRP mientras que estimula el grupo POMC/CART. De esta manera una deficiencia en la señalización de leptina, bien a través de la deficiencia de leptina o bien la resistencia a leptina, da lugar a una sobrealimentación. Esto puede explicar algunas formas de obesidad genéticas y adquiridas.

La dieta y el ejercicio físico son los pilares del tratamiento para la obesidad. Para suplementar estas actividades, o en caso de fallo, pueden tomarse fármacos anti-obesidad para reducir el apetito o inhibir la absorción de grasas. En casos graves, se realiza cirugía o se coloca un balón intragástrico para reducir el volumen del estómago y/o la longitud del intestino, dando lugar a una saciedad temprana y una capacidad reducida para absorber los nutrientes

de la comida. Mantener esta pérdida de peso es frecuentemente difícil y a menudo requiere hacer ejercicio y una dieta de menor energía de alimento una parte permanente de un estilo de vida de una persona. Las tasas de éxito de la pérdida de peso a largo plazo con cambios de estilo de vida son bajas, en un intervalo de un 2-20 %.

5 Hay disponible un número limitado de medicaciones para el tratamiento de la obesidad. Las preocupaciones acerca de los efectos secundarios han disminuido el entusiasmo por los fármacos supresores del apetito, particularmente la fenfluramina, la sibutramina y la fentermina, que conllevan riesgos graves y se han retirado del mercado. La fentermina está aprobada solamente para su uso a corto plazo. El orlistat (Xenical) es una medicación que bloquea la absorción de la grasa de la dieta y también está aprobada para su uso a largo plazo. Sin embargo, provoca efectos secundarios desagradables (heces grasas) y requiere suplemento con vitaminas liposolubles.

10 Aunque la cirugía (tal como un baipás gástrico) es el último recurso para el tratamiento de la obesidad, puede ser extremadamente eficaz. Sin embargo, debe realizarse en un centro quirúrgico experimentado, porque dichas operaciones pueden conllevar riesgos significativos, especialmente en el periodo post-operatorio. Las recomendaciones consenso son para limitar las terapias quirúrgicas a los pacientes con obesidad mórbida (IMC > 40, IMC > 35 más co-morbilidades o IMC > 30 con diabetes incontrolable).

15 Hay disponible una cantidad de píldoras para pérdida de peso en farmacias locales, supermercados o tiendas de comida sana. Hay incluso más opciones disponibles en línea. Muchas no han demostrado ser eficaces y algunas pueden ser peligrosas. La Tabla 1 (a continuación) muestra píldoras de pérdida de peso comunes y lo que la investigación muestra acerca de su eficacia y su seguridad.

20 Los extractos de hierbas son a menudo impuros y contienen muchas sustancias muy diferentes, que es difícil evaluar si la mezcla en global es efectiva, mucho menos qué constituye una dosificación eficaz. Con cientos o más compuestos diferentes en la mezcla, podría requerirse más de un compuesto para la actividad, o un compuesto que inhiba la actividad de otro compuesto, por lo que la fuente y el procesamiento del material fuente original pueden resultar en un producto inactivo o incluso peligroso.

25 Tabla 1: Productos de anécdota para la pérdida de peso. Fuentes: U.S. Food and Drug Administration, 2010; Natural Medicines, Comprehensive Database, 2010

Producto	Reivindica	Eficacia	Seguridad
Alli - versión OTC del fármaco de prescripción orlistat (Xenical)	Disminuye la absorción de la grasa de la dieta	Eficaz; cantidades de pérdida de peso típicamente menores para OTC frente a la prescripción	La FDA investiga informes de lesión hepática
Naranja amarga	Aumenta las calorías quemadas	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Posiblemente no seguro
Quitosano	Bloquea la absorción de la grasa de la dieta	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Posiblemente seguro
Cromo	Aumenta las calorías quemadas, disminuye el apetito y crea músculo	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Probablemente seguro
Ácido linoleico conjugado (CLA)	Reduce la grasa corporal y crea músculo	Posiblemente eficaz	Posiblemente seguro
Escobilla/Bala ( <i>Sida cordifolia</i> )	Disminuye el apetito y aumenta las calorías quemadas	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Probablemente insegura y prohibida por la FDA
<i>Ephedra</i>	Disminuye el apetito	Posiblemente eficaz	Probablemente insegura y prohibida por la FDA
Extracto de té verde	Aumenta el metabolismo de las calorías y las grasas y disminuye el apetito	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Posiblemente seguro
Goma guar	Bloquea la absorción de la grasa de la dieta y aumenta la sensación de estar lleno	Posiblemente ineficaz	Probablemente seguro
<i>Hoodia</i>	Disminuye el apetito	Evidencia confiable insuficiente para calificar	Información insuficiente

Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos seguros, bien caracterizados y efectivos para efectuar la pérdida de peso, y los procedimientos de uso de los mismos.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar formas de dosificación, tales como formas de dosificación oral, para promover la pérdida de peso, y procedimientos de uso de las mismas.

El documento US 5 650 167 describe formulaciones que comprenden triterpenos pentacíclicos, en particular celastrol, para su uso en el tratamiento de hepatitis B.

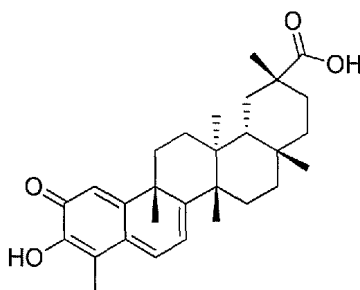
Ji Eun Lee y col, The Korean Journal of Nephrology, 1 Ene 2011, páginas S423-S423 describe el efecto reductor del peso corporal y nefroprotector del celastrol intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas.

El documento US 2010/240581 describe investigaciones en el efecto anti-hiperglucémico del celastrol en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas.

### **Sumario de la invención**

Los agentes activos para promover la pérdida de peso, así como las formulaciones que contienen estos agentes activos y procedimientos de uso de los mismos, se describen en el presente documento. La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas para su uso en la inducción de peso corporal o la reducción de grasa corporal o una combinación de las mismas de acuerdo con la reivindicación 1.

El agente de pérdida de peso ejemplar es el compuesto definido por la Fórmula I



**Fórmula I**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describen formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de pérdida de peso, o una sal farmacéuticamente aceptable o un profármaco del mismo, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse para inducir pérdida de peso en un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida, reducir la grasa corporal en un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida, reducir la ingesta de comida en un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida, mejorar la homeostasia de la glucosa en un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida, o combinaciones de los mismos.

En realizaciones particulares, el agente de pérdida de peso se co-administra con leptina o un análogo de leptina, tal como r-metHuLpetina (A-100, METRELEPTIN®), disponible de Amylin Pharmaceuticals (San Diego, Calif.).

En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida en una cantidad terapéuticamente eficaz para inducir pérdida de peso, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz y un tiempo de administración para disminuir la masa corporal o la grasa corporal en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 15 %, lo más preferentemente en al menos un 20 % o más.

En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la ingesta de comida, el apetito o combinaciones de los mismos, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la ingesta de comida diaria (en términos de calorías) en al menos un 15 %, un 17 %, un 20 %, un 22 %, un 25 %, un 28 %, un 30 %, un 32 %, un 35 % o más.

En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida en una cantidad terapéuticamente eficaz para mejorar la homeostasia de la glucosa, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la glucosa en sangre en plasma promedio en ayuno en al menos un 10 %, un 12 %, un 15 %, un 18 %, un 20 %, un 22 %, un 25 % o más. En casos donde las formulaciones farmacéuticas se administran para normalizar el azúcar en sangre, las formulaciones se administran preferentemente en una cantidad eficaz para disminuir los niveles de glucosa en sangre a menos de aproximadamente 180 mg/dl. Las formulaciones pueden co-administrarse con otras terapias anti-diabéticas, si es necesario, para mejorar la homeostasis de la glucosa.

**Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-D ilustran el efecto del celastrol, administrado intraperitonealmente (i.p.), en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones obesos alimentados con dieta alta en grasas (HFD-fcd). La Figura 1A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones obesos alimentados con HFD (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol a diferentes dosis (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 10 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de círculos), celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de triángulos) y celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 1B es un gráfico que representa la disminución en porcentaje del peso corporal de ratones obesos alimentados con HFD (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol a diferentes dosis (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 10 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de círculos), celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de triángulos) y celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 1C es un gráfico de barras que representa la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones obesos alimentados con HFD durante el transcurso del tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 10 µg/kg i.p. una vez al día, celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día y celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). La Figura 1D es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones obesos alimentados con HFD al final de dos semanas de tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 10 µg/kg i.p. una vez al día, celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día y celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 por la prueba de la t de Student. Los resultados se basan en los datos de ingesta de comida diaria tomados durante los primeros tres días.

Las Figuras 2A-2C ilustran el efecto del celastrol, administrado intraperitonealmente (i.p.), en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones sin grasa. La Figura 2A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones sin grasa (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol a diferentes dosis (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de círculos), celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de triángulos) y celastrol 500 µg/kg i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 2B es un gráfico de barras que representa la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones sin grasa durante el transcurso del tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día y celastrol 500 µg/kg i.p. una vez al día). La Figura 2C es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones sin grasa al final de dos semanas de tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 50 µg/kg i.p. una vez al día, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día y celastrol 500 µg/kg i.p. una vez al día). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 por la prueba de la t de Student.

Las Figuras 3A-3C ilustran el efecto del celastrol, administrado intraperitonealmente (i.p.), en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones deficientes en leptina (*ob/ob*). La Figura 3A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones *ob/ob* (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 100 µg/kg en 25 µl de DMSO i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 3B es un gráfico de barras que ilustra la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones *ob/ob* durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). La Figura 3C es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones *ob/ob* al final de dos semanas de tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 por la prueba de la t de Student. NS = no significativo.

Las Figuras 4A-4C ilustran el efecto del celastrol, administrado intraperitonealmente (i.p.), en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones deficientes en el receptor de leptina (*db/db*). La Figura 4A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones *db/db* (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 100 µg/kg en 25 µl de DMSO i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 4B es un gráfico de barras que ilustra la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones *db/db* durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). La Figura 4C es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones *db/db* al final de dos semanas de tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 100 µg/kg i.p. una vez al día). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo.

Las Figuras 5A-5F ilustran el efecto del celastrol, administrado oralmente, en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones obesos alimentados con HFD. La Figura 5A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones obesos alimentados con HFD (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 5B es un gráfico de barras que representa la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones obesos alimentados con HFD durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día). La Figura 5C es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones obesos alimentados con HFD al final de dos semanas de tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día). La Figura 5D es un gráfico que representa el peso corporal de ratones sin grasa (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con

celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 5E es un gráfico de barras que ilustra la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones sin grasa durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día). La Figura 5F es un gráfico de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (en mg/dl) en 6 horas de ayunas de ratones sin grasa al final de dos semanas de tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día). En todos los casos,  $n = 5$  ratones por grupo,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  por la prueba de la  $t$  de Student.

Las Figuras 6A-6D ilustran el efecto del celastrol, administrado oralmente, en la ingesta de comida, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones *ob/ob* y *db/db*. La Figura 6A es un gráfico que representa el peso corporal de ratones *ob/ob* (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de triángulos), celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 6B es un gráfico que representa el peso corporal de ratones *db/db* (en gramos) como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de triángulos), celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 6C es un gráfico de barras que ilustra la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones *ob/ob* durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día). La Figura 6D es un gráfico de barras que ilustra la ingesta de comida (en gramos/día) de ratones *db/db* durante el transcurso del tratamiento con celastrol (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, celastrol 10 mg/kg oralmente una vez al día).

Las Figuras 7A-7D ilustran el efecto de leptina y celastrol co-administrados en el peso corporal y la ingesta de comida de ratones. La Figura 7A es un gráfico que representa la ingesta de comida acumulativa de ratones obesos alimentados con HFD (en gramos) como una función del tiempo (horas) tras el tratamiento con celastrol solo, leptina sola y celastrol y leptina en combinación (vehículo control (DMSO+solución salina, trazo de diamantes), leptina sola (trazo de cuadrados), celastrol solo (trazo de triángulos) y tanto celastrol como leptina (trazo con cruces (-x-)). La Figura 7B es un gráfico de barras que representa la disminución en porcentaje en la ingesta de comida tanto en ratones sin grasa como alimentados con HFD 6 horas después de la inyección de leptina (de izquierda a derecha, ratones sin grasa sin celastrol, ratones sin grasa con celastrol, ratones obesos alimentados con HFD sin celastrol y ratones alimentados con HFD con celastrol). La Figura 7C es un gráfico que representa la ingesta de comida acumulativa de ratones sin grasa (en gramos) como una función del tiempo (horas) tras el tratamiento con celastrol solo, leptina sola y celastrol y leptina en combinación (vehículo control (DMSO+solución salina, trazo de diamantes), leptina sola (trazo de cuadrados), celastrol solo (trazo de triángulos) y tanto celastrol como leptina (trazo con cruces (-x-)). La Figura 7D es un gráfico de barras que representa el cambio en el peso corporal (en gramos) durante un periodo de 24 horas tanto en ratones sin grasa como obesos alimentados con HFD tras el tratamiento con celastrol solo, leptina sola y celastrol y leptina en combinación (de izquierda a derecha, ratones sin grasa con vehículo control (DMSO+solución salina), ratones obesos alimentados con HFD con leptina sola, ratones obesos alimentados con HFD con celastrol solo, ratones obesos alimentados con HFD tanto con celastrol como leptina). En todos los casos,  $n = 3$  ratones por grupo.

Las Figuras 8A-8D ilustran la capacidad del celastrol para disminuir selectivamente la masa de grasa (es decir, la grasa corporal) de ratones alimentados con HFD. La Figura 8A es un gráfico de barras que ilustra la masa sin grasa (en gramos) de ratones obesos alimentados con HFD según se mide usando absorciometría de rayos X de emisión dual (DEXA) después de dos semanas de tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 10  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día, celastrol 50  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día y celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día). La Figura 8B es un gráfico de barras que ilustra la masa de grasa (en gramos) de ratones obesos alimentados con HFD como se mide usando DEXA después de dos semanas de tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 10  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día, celastrol 50  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día y celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día). La Figura 8C es un gráfico de barras que ilustra la grasa corporal en porcentaje de ratones obesos alimentados con HFD como se mide usando DEXA después de dos semanas de tratamiento con celastrol a diferentes dosis (de izquierda a derecha, vehículo control, celastrol 10  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día, celastrol 50  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día y celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día). La Figura 8D es un gráfico que representa el nivel de leptina en plasma (en ng/ml) medido usando un kit de ELISA específico como una función del tiempo (días) de tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)).

Las Figuras 9A-9D ilustran el efecto del celastrol en la homeostasia de la glucosa en ratones obesos alimentados con HFD. La Figura 9A es un gráfico que representa los niveles de glucosa en sangre en ratones alimentados con HFD que se someten a un ensayo de tolerancia de glucosa (GTT) el día 7 como una función del tiempo (minutos) después de la inyección de D-glucosa (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 9B es un gráfico de barras que representa el área bajo la curva (AUC, en min mg/dl) para los trazos en la Figura 9A tanto para el vehículo control (barra izquierda) como el celastrol (celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$ , barra derecha). La Figura 9C es un gráfico que representa los niveles de glucosa en plasma en ratones alimentados con HFD que se someten a una prueba de tolerancia a insulina (PTI) el día 7 como una función del tiempo (minutos) después de la inyección de insulina (vehículo control (trazo de diamantes), celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$  i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). La Figura 9D es un gráfico de barras que representa el área bajo la curva (AUC, en min mg/dl) para los trazos en la Figura 9C tanto para el vehículo control (barra izquierda) como el celastrol (celastrol 100  $\mu\text{g/kg}$ , barra derecha). En todos los casos,  $n = 5$  ratones por grupo,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  por la prueba de la  $t$  de Student.

Las Figuras 10A-10C ilustran el efecto de la administración de celastrol en la expresión de ARNm hepático de enzimas gluconeogénicas en ratones obesos alimentados con HFD, como se determina por PCR cuantitativa al

final de una administración i.p. de 3 semanas de celastrol (100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día). La Figura 10A es un gráfico de barras que ilustra el nivel de expresión de ARNm hepático de glucosa 6-fosfatasa (G6pasa, en unidades arbitrarias) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). La Figura 10B es un gráfico de barras que ilustra el nivel de la expresión de ARNm hepático de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, en unidades arbitrarias) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). La Figura 10C es un gráfico de barras que ilustra el nivel de la expresión de ARNm hepático de gamma coactivador 1-alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1a, en unidades arbitrarias) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol).

Las Figuras 11A-11B ilustran el efecto de la administración de celastrol en los niveles en suero de la alanina transaminasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST) en ratones obesos alimentados con HFD, como se determina por ELISA, al final de una administración i.p. de 3 semanas de celastrol (100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día). La Figura 11A es un gráfico de barras que representa el nivel en suero de ALT (U/l) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). La Figura 11B es un gráfico de barras que representa el nivel en suero de AST (U/l) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 por la prueba de la t de Student.

Las Figuras 12A-12B ilustran el efecto de la administración de celastrol en los niveles en suero de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en ratones obesos alimentados con HFD al final de una administración i.p. de 3 semanas de celastrol (100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día). La Figura 12A es un gráfico de barras que representa el nivel en suero de T3 (ng/ml) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). La Figura 12B es un gráfico de barras que representa el nivel en suero de T4 (ng/ml) en ratones obesos alimentados con HFD después del tratamiento con celastrol durante tres semanas (barra izquierda, vehículo control; barra derecha, administración de celastrol). En todos los casos, n = 5 ratones por grupo, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 por la prueba de la t de Student.

La Figura 13 es un gráfico que representa el peso corporal/peso corporal inicial de ratones obesos alimentados con HFD como una función del tiempo (días) para el tratamiento con cuatro derivados del celastrol administrados a una dosis de 100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día (mCS1 (trazo de diamantes), mCS2 (trazo de cuadrados), mCS3 (trazo de triángulos) y mCS4 (trazo de cruces)).

La Figura 14 es un gráfico que representa el peso corporal/peso corporal inicial de ratones obesos alimentados con HFD como una función del tiempo (días) para el tratamiento con celastrol (vehículo control (trazo de diamantes), 100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día (trazo de cuadrados)). Se co-administró leptina, empezando el día 17 del tratamiento de celastrol, a dosis en aumento (1 mg/kg, 2 mg/kg y 4 mg/kg), como se ilustra por la barra incluida por encima del eje x de la gráfica.

La Figura 15 es un gráfico que representa el peso corporal promedio (en gramos) de cuatro ratones C57BL/6 (ratones que reciben dieta de pienso regular y vehículo control (trazo de diamantes), ratones que reciben dieta de pienso regular y 100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día (trazo de cuadrados), ratones alimentados con HFD que reciben vehículo control (trazo de triángulos) y ratones alimentados con HFD que reciben 100 µg/kg de celastrol i.p. una vez al día (trazo de cruces)) como una función del tiempo (días) para el tratamiento. Los ratones alimentados con HFD que reciben el vehículo control desarrollaron obesidad mientras que los otros grupos de ratones no.

Las Figuras 16A y 16B son gráficas que muestran la dirección x (Figura 16A) e y (Figura 16B) del movimiento ambulatorio para control y celastrol en ciclos de oscuridad y luz. Se evaluó la toxicidad usando Comprehensive Lab Animal Monitoring System de Columbus Instruments. Se midió la actividad locomotora de los animales. Como se ve en las figuras, los recuentos del movimiento ambulatorio en la dirección x e y de los animales durante los ciclos de oscuridad y de luz no son significativamente diferentes. Esto muestra que los ratones tratados con fármaco no están letárgicos y no muestran ningún signo visible de enfermedad ni toxicidad.

## **Descripción detallada de la invención**

### **I. Definiciones**

“Co-administración”, como se usa en el presente documento, incluye administración simultánea y secuencial. Un transcurso de tiempo apropiado para la administración secuencial puede elegirse por el médico, de acuerdo con dichos factores tales como la naturaleza de la enfermedad de un paciente y la condición del paciente.

“Farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivos u otros problemas o complicaciones acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

“Profármaco”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia farmacológica (fármaco) que se administra a un sujeto en una forma inactiva (o significativamente menos activa). Una vez administrado, el

profármaco se metaboliza en el cuerpo (*in vivo*) en un compuesto que tiene la actividad farmacológica deseada.

“Obeso”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que tiene un índice de masa corporal de más de 30 kg/m<sup>2</sup>. “Sobrepeso” y “Pre-obeso”, como se usan en el presente documento, se refieren a pacientes que tienen un índice de masa corporal de más de 25 kg/m<sup>2</sup>. “Obeso mórbido”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que tiene un índice de masa corporal de más de 40 kg/m<sup>2</sup>, un índice de masa corporal de más de 35 kg/m<sup>2</sup> en combinación con una o más co-morbididades, un índice de masa corporal de más de 30 kg/m<sup>2</sup> en combinación con diabetes incontrolable, o combinaciones de los mismos.

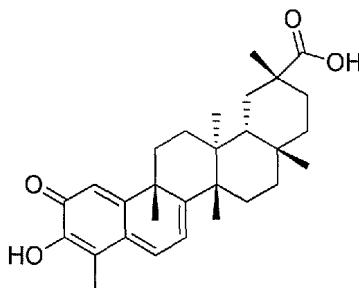
“Cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad de un agente de pérdida de peso que es eficaz induciendo pérdida de peso en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, mejorando la homeostasia de la glucosa en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, previniendo la ganancia de peso y/o previniendo un aumento del índice de masa corporal en un paciente normal, pre-obeso, obeso u obeso mórbido, o combinaciones de los mismos.

## II. Agentes de pérdida de peso

Se proporcionan en el presente documento triterpenos pentacíclicos que pueden administrarse para promover la pérdida de peso, reducir la grasa corporal, reducir la ingesta de comida, mejorar la homeostasia de la glucosa o combinaciones de las mismas.

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas para su uso en la inducción de pérdida de peso o la reducción de la grasa corporal o una combinación de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1.

El agente de pérdida de peso es un compuesto definido por la Fórmula I



Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Generalmente, las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse por reacción de las formas de ácido o base libres de un compuesto descrito anteriormente con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua, en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos incluyendo éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de las sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, p. 704; y "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use," P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth, Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fluorhídrico, bórico, fluorobórico, fosfórico, metafosfórico, nítrico, carbónico, sulfónico y sulfúrico y ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, bencensulfónico, benzoico, cítrico, etansulfónico, fumárico, glucónico, glucólico, isotiónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, metansulfónico, trifluorometansulfónico, succínico, toluensulfónico, tartárico y trifluoroacético.

Los ácidos orgánicos adecuados incluyen generalmente, por ejemplo, las clases de ácidos orgánicos alifático, cicloalifático, aromático, aralifático, heterocíclico, carboxílico y sulfónico. Los ejemplos específicos de ácidos orgánicos adecuados incluyen acetato, trifluoroacetato, formiato, propionato, succinato, glicolato, gluconato, digluconato, lactato, malato, ácido tartárico, citrato, ascorbato, glucuronato, maleato, fumarato, piruvato, aspartato, glutamato, benzoato, ácido antranílico, mesilato, estearato, salicilato, p-hidroxibenzoato, fenilacetato, mandelato, embonato (pamoato), metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, pantotenato, toluensulfonato, 2-hidroxietansulfonato, sulfanilato, ciclohexilaminosulfonato, ácido algénico, ácido β-hidroxibutírico, galactarato, galacturonato, adipato, alginato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanpropionato, dodecilsulfato, glucoheptanoato, glicerofosfato, heptanoato, hexanoato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

En algunos casos, la sal farmacéuticamente aceptable puede incluir sales de metales alcalinos, incluyendo sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de calcio o de magnesio; y sales formadas con

ligandos orgánicos solubles, por ejemplo, sales de amonio cuaternario. Las sales de bases también pueden formarse a partir de bases que forman sales no tóxicas, incluyendo sales de aluminio, arginina, benzatrina, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, meglumina, olamina, trometamina y cinc.

Las sales orgánicas pueden producirse a partir de sales de aminas secundarias, terciarias o cuaternarias, tales como trometamina, dietilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Los grupos que contienen nitrógeno básicos pueden cuaternizarse también con agentes tales como haluros de alquilo inferior (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo), sulfatos de dialquilo (por ejemplo, sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo), haluros de cadena larga (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo) y otros.

Como se describe en el presente documento, el agente de pérdida de peso puede ser un profármaco farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente. Los profármacos son compuestos que, cuando se metabolizan *in vivo*, se someten a conversión a los compuestos que tienen la actividad farmacológica deseada. Los profármacos pueden prepararse reemplazando funcionalidades apropiadas presentes en los compuestos descritos anteriormente con "pro-restos" como se describe, por ejemplo, en H. Bundgaard, *Design of Prodrugs* (1985). Los ejemplos de profármacos incluyen derivados éster, éter o amida de los compuestos descritos anteriormente, derivados de polietilenglicol de los compuestos descritos anteriormente, derivados de N-acil amina, derivados de dihidropiridin piridina, derivados que contienen amino conjugados a polipéptidos, derivados de 2-hidroxibenzamida, derivados de carbamato, derivados de N-óxidos que se reducen biológicamente a las aminas activas y derivados de la base de N-mannich. Para el análisis adicional de los profármacos, véase, por ejemplo, Rautio, J. y col. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7:255-270 (2008).

#### A. Procedimientos de preparación

Los agentes de pérdida de peso descritos anteriormente pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica. Las metodologías representativas para la preparación de ciertos principios activos se describen a continuación. La ruta apropiada para la síntesis de un agente de pérdida de peso dado puede seleccionarse en vista de la estructura del compuesto en global ya que se refiere a la compatibilidad de los grupos funcionales, las estrategias de los grupos protectores y la presencia de enlaces lábiles. Además de las metodologías sintéticas analizadas a continuación, se conocen en la técnica reacciones y estrategias alternativas útiles para la preparación de los compuestos de creatina desvelados en el presente documento. Véase, por ejemplo, March, "Advanced Organic Chemistry," 5a Edición, 2001, Wiley-Interscience Publication, Nueva York).

El celastrol puede obtenerse a partir de fuentes comerciales, o aislarse a partir de plantas, por ejemplo, *Tripterygium wilfordii*, por procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kutney, *Can. J. Chem.* 59:2677 (1981) y Zhang, W., y col., *Acta Pharm. Sin.* 21:592 (1986).

### III. Formulaciones farmacéuticas

Se proporcionan formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de pérdida de peso descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes representativos incluyen disolventes, diluyentes, agentes modificadores del pH, conservantes, antioxidantes, agentes de suspensión, agentes humectantes, modificadores de la viscosidad, agentes de tonicidad, agentes estabilizantes y combinaciones de los mismos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se seleccionan preferentemente de materiales que se reconocen generalmente como seguros (GRAS) y pueden administrarse a un individuo sin provocar efectos secundarios biológicos indeseables o interacciones no queridas.

#### A. Productos terapéuticos adicionales

En algunos casos, la formulación farmacéutica puede contener además uno o más principios activos adicionales.

En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas contienen además leptina, un análogo de leptina o combinaciones de los mismos.

La leptina es una hormona peptídica que sirve como la señal aferente en un bucle de retroalimentación negativa que regula la ingesta de comida y el peso corporal *in vivo*. La leptina humana sin procesar se sintetiza *in vivo* como una prohormona proteica de 167 aminoácidos, 167 kDa. La leptina sin procesar incluye una secuencia señal N-terminal de 21 aminoácidos que se escinde del resto del polipéptido para generar la leptina madura circulante (que contiene 146 aminoácidos). Los términos "leptina" y "análogo de leptina" como se usan en el presente documento, abarcan la leptina humana de origen natural, la leptina de origen natural producida por una especie no humana tal como un ratón o una rata, la leptina madura producida recombinantemente, tal como la metreleptina (es decir, leptina humana de metionilo recombinante o r-metHuLeptina, que es un análogo de leptina de 147 aminoácidos generado por la adición N-terminal por ingeniería genética de una metionina al aminoácido N-terminal de la leptina de 146 aminoácidos madura circulante humana), así como fragmentos de leptina, variantes de leptina, proteínas de fusión de leptina y otros derivados de la misma conocidos en la técnica que poseen actividad biológica.

Los análogos y derivados de leptina ejemplares incluyen aquellos descritos en las Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 96/05309, WO 96/40912; WO 97/06816, WO 00/20872, WO 97/18833, WO 97/38014, WO 98/08512, WO 98/12224, WO 98/28427, WO 98/46257, WO 98/55139, WO 00/09165, WO 00/47741, WO 2004/039832, WO 97/02004 y WO 00/21574; las Solicitudes de Patente Internacional N.º PCT/US96/22308 y PCT/US96/01471; las Patentes de EE.UU. N.º 5 521 283, 5 532 336, 5 552 524, 5 552 523, 5 552 522, 5 935 810, 6 001 968, 6 429 290, 6 350 730, 6 936 439, 6 420 339, 6 541 033, 7 112 659, 7 183 254 y 7 208 577 y las Publicaciones de Patente de EE.UU. N.º 2005/0176107, 2005/0163799. Las variantes de leptina ejemplares incluyen aquellas donde el aminoácido en la posición 43 está sustituido con Asp o Glu; la posición 48 está sustituida con Ala; la posición 49 está sustituida con Glu o ausente; la posición 75 está sustituida con Ala; la posición 89 está sustituida con Leu; la posición 93 está sustituida con Asp o Glu; la posición 98 está sustituida con Ala; la posición 117 está sustituida con Ser, la posición 139 está sustituida con Leu, la posición 167 está sustituida con Ser y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica incluye r-metHuLeptina (A-100, METRELEPTIN®), disponible de Amylin Pharmaceuticals (San Diego, Calif.).

Las formulaciones farmacéuticas también pueden incluir una o más vitaminas, minerales, suplementos dietéticos, agentes nutracéuticos, tales como proteínas, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, antioxidantes y extractos vegetales o animales, o combinaciones de los mismos. Las vitaminas, los minerales, los agentes nutracéuticos y los suplementos dietéticos se conocen en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en Roberts y col., (Nutriceuticals: The Complete Encyclopedia of Supplements, Herbs, Vitamins, and Healing Foods, American Nutriceutical Association, 2001). Los agentes nutracéuticos y los suplementos dietéticos también se desvelan en Physicians' Desk Reference for Nutritional Supplements, 1a Ed. (2001) y The Physicians' Desk Reference for Herbal Medicines, 1a Ed. (2001).

## B. Formulaciones entéricas

Las formas de dosificación orales adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, jarabes y pastillas para chupar. Los comprimidos pueden fabricarse usando técnicas de compresión o moldeado bien conocidas en la técnica. Las cápsulas de gelatina o distintas de gelatina pueden prepararse como cáscaras de cápsula dura o blanda, que pueden encapsular materiales de carga líquidos, sólidos y semi-sólidos, usando técnicas bien conocidas en la materia.

Las formulaciones pueden prepararse usando uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo diluyentes, conservantes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes de hinchamiento, cargas, estabilizantes y combinaciones de los mismos.

Los excipientes, incluyendo plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes y deslizantes, pueden usarse también para formar composiciones recubiertas para administración entérica. Las formulaciones de dosificación de liberación retardada pueden prepararse como se describe en referencias convencionales tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman y col. (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000 y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6a Edición, Ansel y col., (Media, PA: Williams y Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información de los excipientes, los materiales, el equipo y el procedimiento para la preparación de comprimidos y cápsulas y de formas de dosificación de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de celulosa tales como ftalato de acetato de celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropil metilcelulosa; polivinil acetato ftalato, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles en el mercado bajo la marca comercial EUDRAGIT® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Los diluyentes, también denominados "cargas", son típicamente necesarios para aumentar el volumen de una forma de dosificación sólida de tal manera que se proporcione un tamaño práctico para la compresión de comprimidos o la formación de perlas y gránulos. Los diluyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, dihidrato de fosfato dicálcico, sulfato cálcico, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro sódico, almidón seco, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicón, óxido de titanio, silicato de magnesio y aluminio y azúcar en polvo.

Los aglutinantes se usan para impartir calidades cohesivas a una formulación de dosificación sólida, y de esta manera asegurar que un comprimido o una perla o un gránulo se mantiene intacto después de la formación de las formas de dosificación. Los materiales aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (incluyendo sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto, alginato sódico, celulosa, incluyendo hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y Veegum y polímeros sintéticos tales como copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona.

Los lubricantes se usan para facilitar la fabricación de comprimidos. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, estearato magnésico, estearato cálcico, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite mineral.

Los disgregantes se usan para facilitar la disgregación de la forma de dosificación o la "ruptura" después de la administración, e incluyen generalmente, pero no se limitan a, almidón, glicolato de almidón sódico, carboximetil almidón sódico, carboximetil celulosa sódica, hidroxipropil celulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tales como PVP reticulada (Polyplasdone® XL de GAF Chemical Corp). Los estabilizantes se usan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición del fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas. Los estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, hidroxitolueno butilado (BHT); ácido ascórbico, sus sales y ésteres; Vitamina E, tocoferol y sus sales; sulfitos tales como metabisulfito sódico; cisteína y sus derivados; ácido cítrico; galato de propilo e hidroxianisol butilado (BHA).

#### 1. Formulaciones de liberación controlada

Las formas de dosificación oral, tales como cápsulas, comprimidos, soluciones y suspensiones, pueden formularse para su liberación controlada. Por ejemplo, el uno o más compuestos y el uno o más agentes activos adicionales opcionales pueden formularse en nanopartículas, micropartículas y combinaciones de los mismos y encapsulase en una cápsula de gelatina dura o blanda o distinta de gelatina o dispersarse en un medio de dispersión para formar una suspensión oral o un jarabe. Las partículas pueden formarse en el fármaco y un polímero o matriz de liberación controlada. Alternativamente, las partículas de fármaco pueden recubrirse con uno o más recubrimientos de liberación controlada antes de la incorporación a la forma de dosificación acabada.

En otra realización, el uno o más compuestos y el uno o más agentes activos adicionales opcionales se dispersan en un material de matriz, que gelifica o emulsiona tras el contacto con un medio acuoso, tales como fluidos fisiológicos. En el caso de los geles, la matriz se hincha atrapando los principios activos, que se liberan lentamente en el tiempo por difusión y/o degradación del material de matriz. Dichas matrices pueden formularse como comprimidos o como materiales de carga para cápsulas duras y blandas.

En aún otra realización, el uno o más compuestos y el uno o más agentes activos adicionales opcionales se formulan en una forma de dosificación oral sólida, tales como un comprimido o una cápsula y la forma de dosificación sólida se recubre con uno o más recubrimientos de liberación controlada, tales como unos recubrimientos de liberación retardada o recubrimientos de liberación extendida. El recubrimiento o los recubrimientos también pueden contener los compuestos y/o principios activos adicionales.

#### Formulaciones de liberación extendida

Las formulaciones de liberación extendida se preparan generalmente como sistemas de difusión u osmóticos, por ejemplo, como se describe en "Remington - The science and practice of pharmacy" (20a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000). Un sistema de difusión consiste típicamente en dos tipos de dispositivos, un reservorio y una matriz, y se conoce bien y se describe en la técnica. Los dispositivos de la matriz se preparan generalmente comprimiendo el fármaco con un polímero de disolución lenta en una forma de comprimido. Los tres tipos principales de materiales usados en la preparación de dispositivos de matriz son plásticos insolubles, polímeros hidrófilos y compuestos grasos. Las matrices plásticas incluyen, pero no se limitan a, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo y polietileno. Los polímeros hidrófilos incluyen, pero no se limitan a, polímeros celulósicos tales como metil y etil celulosa, hidroxialquilcelulosas tales como hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y Carbpol® 934, óxidos de polietileno y mezclas de los mismos. Los compuestos grasos incluyen, pero no se limitan a, diversas ceras tales como cera de carnauba y triestearato de glicerilo y sustancias de tipo cera incluyendo aceite de ricino hidrogenado o aceite vegetal hidrogenado y mezclas de los mismos.

En ciertas realizaciones, el material plástico es un polímero acrílico farmacéuticamente aceptable, incluyendo pero no limitado a, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, ácido poli(acrílico), ácido poli(metacrílico), copolímero de alquilamina de ácido metacrílico poli(metacrilato de metilo), (anhídrido) de ácido poli(metacrílico), polimetacrilato, poli(acrilamida), poli(anhídrido de ácido metacrílico) y copolímeros de metacrilato de glicidilo. En ciertas realizaciones, el polímero acrílico está comprendido por uno o más copolímeros de metacrilato de amonio. Los copolímeros de metacrilato de amonio se conocen bien en la técnica y se describen en NF XVII como copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternarios.

En una realización, el polímero acrílico es una laca de resina acrílica tal como aquella que está disponible en el mercado de Rohm Pharma bajo el nombre comercial EUDRAGIT®. En realizaciones preferidas adicionales, el polímero acrílico comprende una mezcla de dos lacas de resina acrílica disponibles en el mercado de Rohm Pharma bajo los nombres comerciales EUDRAGIT® RL30D y EUDRAGIT® RS30D, respectivamente. EUDRAGIT® RL30D y EUDRAGIT® RS30D, son copolímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos con un bajo contenido de grupos amonio cuaternarios, siendo la relación molar de grupos amonio a los ésteres (met)acrílicos neutros restantes 1:20

en EUDRAGIT® RL30D y 1:40 en EUDRAGIT® RS30D. El peso molecular medio es aproximadamente 150 000. También se prefieren EUDRAGIT® S-100 y EUDRAGIT® L-100. Las designaciones del código RL (alta permeabilidad) y RS (baja permeabilidad) se refieren a las propiedades de permeabilidad de estos agentes. Las mezclas de EUDRAGIT® RL/RS son insolubles en agua y en fluidos digestivos. Sin embargo, los sistemas

5 multiparticulados formados para incluir los mismos son hinchables y permeables en soluciones acuosas y fluidos digestivos.

Los polímeros descritos anteriormente tales como EUDRAGIT® RL/RS pueden mezclarse juntos en cualquier relación deseada para obtener en última instancia una formulación de liberación sostenida teniendo un perfil de disolución deseable. Los sistemas multiparticulados de liberación sostenida deseables pueden obtenerse, por

10 ejemplo, a partir de EUDRAGIT® RL al 100 %, EUDRAGIT® RL al 50 % y EUDRAGIT® RS al 50 %, y EUDRAGIT® RL al 90 % y EUDRAGIT® RS al 10 %. Un experto en la materia reconocerá que pueden usarse otros polímeros acrílicos, tales como por ejemplo, EUDRAGIT® L.

Alternativamente, las formulaciones de liberación extendida pueden prepararse usando sistemas osmóticos o aplicando un recubrimiento semi-permeable a la forma de dosificación. En el último caso, el perfil de liberación de

15 fármaco deseado puede lograrse combinando materiales de recubrimiento de baja permeabilidad y de alta permeabilidad en proporción adecuada.

Los dispositivos con diferentes mecanismos de liberación de fármaco descritos anteriormente pueden combinarse en una forma de dosificación final que comprende unidades únicas o múltiples. Los ejemplos de unidades múltiples incluyen, pero no se limitan a, comprimidos multicapa y cápsulas que contienen comprimidos, perlas o gránulos. Una

20 porción de liberación inmediata puede añadirse al sistema de liberación extendida por medio de aplicar una capa de liberación inmediata en la parte superior del núcleo de liberación extendida usando un proceso de recubrimiento o de compresión o bien en un sistema de unidad múltiple tal como una cápsula que contiene perlas de liberación extendida e inmediata.

Los comprimidos de liberación extendida que contienen polímeros hidrófilos se preparan por técnicas comúnmente conocidas en la materia tales como compresión directa, granulación en húmedo o granulación en seco. Sus formulaciones incorporan habitualmente polímeros, diluyentes, aglutinantes y lubricantes así como el principio farmacéutico activo. Los diluyentes habituales incluyen sustancias inertes en polvo tales como almidones, celulosa

25 en polvo, especialmente celulosa cristalina y microcristalina, azúcares tales como fructosa, manitol y sacarosa, harinas de grano y polvos comestibles similares. Los diluyentes típicos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de almidón, lactosa, manitol, caolín, fosfato o sulfato cálcico, sales inorgánicas tales como cloruro sódico y azúcar en polvo. Los derivados de celulosa en polvo también son útiles. Los aglutinantes de comprimidos típicos incluyen sustancias tales como almidón, gelatina y azúcares tales como lactosa, fructosa y glucosa. También pueden usarse gomas naturales y sintéticas, incluyendo acacia, alginatos, metilcelulosa y polivinilpirrolidona. También pueden servir

30 como aglutinantes polietilenglicol, polímeros hidrófilos, etilcelulosa y ceras. Un lubricante es necesario en la formulación de comprimidos para evitar que el comprimido y los punzones se peguen en el troquel. El lubricante se elige de sólidos resbaladizos tales como talco, estearato de magnesio y de calcio, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados.

Los comprimidos de liberación extendida que contienen materiales de cera se preparan generalmente usando procedimientos conocidos en la técnica tales como un procedimiento de combinación directa, un procedimiento de congelación y un procedimiento de dispersión acuosa. En el procedimiento de congelación, el fármaco se mezcla

40 con un material ceroso y se congela por pulverización o se congela y se tamiza y se procesa.

#### *Formulaciones de liberación retardada*

Las formulaciones de liberación retardada pueden crearse recubriendo una forma de dosificación sólida con una película polimérica, que es insoluble en el ambiente ácido del estómago, y soluble en el ambiente neutro del intestino

45 delgado. Las unidades de dosificación de liberación retardada pueden prepararse, por ejemplo, recubriendo un fármaco o una composición que contiene un fármaco con un material de recubrimiento seleccionado. La composición que contiene un fármaco puede ser, por ejemplo, un comprimido para su incorporación en una cápsula, un comprimido para su uso como un núcleo interno en una forma de dosificación de "núcleo recubierto" o una pluralidad de perlas, partículas o gránulos que contienen fármaco, para su incorporación en un comprimido o bien

50 una cápsula. Los materiales de recubrimiento preferidos incluyen polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables, gradualmente hidrosolubles y/o enzimáticamente degradables y pueden ser polímeros "entéricos" convencionales. Los polímeros entéricos, como se apreciará por aquellos expertos en la materia, se vuelven solubles en el ambiente de pH más alto del tracto gastrointestinal inferior o se erosionan lentamente conforme la forma de dosificación pasa a través del tracto gastrointestinal, mientras que los polímeros enzimáticamente

55 degradables se degradan por enzimas bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal inferior, particularmente en el colon. Los materiales de recubrimiento adecuados para efectuar la liberación retardada incluyen, pero no se limitan a, polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, acetato succinato de hidroxipropil metil celulosa, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, metilcelulosa, etil celulosa, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, acetato trimeliato de celulosa y carboximetilcelulosa sódica; polímeros y copolímeros de ácido acrílico, preferentemente formados a partir de ácido

acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o metacrilato de etilo y otras resinas metacrílicas que están disponibles en el mercado bajo el nombre comercial EUDRAGIT® (Rhom Pharma; Westerstadt, Alemania), incluyendo EUDRAGIT® L30D-55 y L100-55 (soluble a pH 5,5 y por encima), EUDRAGIT® L-100 (soluble a pH 6,0 y por encima), EUDRAGIT® S (soluble a pH 7,0 y por encima, como resultado de un grado de esterificación más alto) y EUDRAGITs® NE, RL y RS (polímeros insolubles en agua que tienen diferentes grados de permeabilidad y capacidad de expansión); polímeros y copolímeros de vinilo tales como polivinil pirrolidona, acetato de vinilo, ftalato de vinilacetato, copolímero de acetato de vinilo y ácido crotonico y copolímero de etilenoacetato de vinilo; polímeros enzimáticamente degradables tales como polímeros azo, pectina, quitosano, amilosa y goma guar; zeína y goma laca. También pueden usarse combinaciones de diferentes materiales. También pueden aplicarse recubrimientos multi-capa usando diferentes polímeros.

Los pesos de recubrimiento preferidos para los materiales de recubrimiento particulares pueden determinarse fácilmente por aquellos expertos en la materia evaluando los perfiles de liberación individual para comprimidos, perlas y gránulos preparados con diferentes calidades de diversos materiales de recubrimiento. Es la combinación de los materiales, el procedimiento y la forma de aplicación lo que produce las características de liberación deseadas, que uno puede determinar solamente a partir de los estudios clínicos.

La composición de recubrimiento puede incluir aditivos convencionales, tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes, deslizantes, etc. Un plastificante está presente normalmente para reducir la fragilidad del recubrimiento y generalmente representará aproximadamente un 10 % en peso a un 50 % en peso con respecto al peso seco del polímero. Los ejemplos de plastificantes típicos incluyen polietilenglicol, propilenglicol, triacetina, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, citrato de trietil acetilo, aceite de ricino y monoglicéridos acetilados. Un agente estabilizante se usa preferentemente para estabilizar partículas en la dispersión. Los agentes estabilizantes típicos son emulsionantes no iónicos tales como ésteres de sorbitán, polisorbatos y polivinilpirrolidona. Se recomiendan deslizantes para reducir los efectos de pegajosidad durante la formación y el secado de la película y generalmente representarán aproximadamente un 25 % en peso a un 100 % en peso del peso del polímero en la solución de recubrimiento. Un deslizante eficaz es talco. También pueden usarse otros deslizantes tales como estearato magnésico y monoestearatos de glicerol. También pueden usarse pigmentos tales como dióxido de titanio. También pueden añadirse pequeñas cantidades de un agente anti-espumante, tales como una silicona (por ejemplo, simeticona), a la composición de recubrimiento.

### *Liberación pulsátil*

La formulación puede proporcionar la administración pulsátil del uno o más de los compuestos desvelados en el presente documento. Por "pulsátil" se entiende que una pluralidad de dosis de fármacos se liberan a intervalos de tiempo espaciados entre sí. Generalmente, tras la ingestión de la forma de dosificación, la liberación de la dosis inicial es sustancialmente inmediata, es decir, el primer "pulso" de liberación de fármaco ocurre dentro de aproximadamente una hora de ingestión. Este pulso inicial se sigue de un primer intervalo de tiempo (tiempo de retraso) durante el que no se libera fármaco o muy poco de la forma de dosificación, después de lo que se libera después una segunda dosis. De forma similar, puede diseñarse un segundo intervalo casi libre de liberación de fármaco entre el segundo y el tercer pulsos de liberación de fármaco. La duración del intervalo de tiempo casi libre de liberación de fármaco variará dependiendo del diseño de la forma de dosificación, por ejemplo, un perfil de dosificación de dos veces al día, un perfil de dosificación de tres veces al día, etc. Para las formas de dosificación que proporcionan un perfil de dosificación de dos veces al día, el intervalo casi libre de liberación de fármaco tiene una duración de aproximadamente 3 horas a 14 horas entre la primera y la segunda dosis. Para formas de dosificación que proporcionan un perfil de tres veces al día, el intervalo casi libre de liberación de fármaco tiene una duración de aproximadamente 2 horas a 8 horas entre cada una de las tres dosis.

En una realización, el perfil de liberación pulsátil se logra con formas de dosificación que son cápsulas cerradas y preferentemente selladas que alojan al menos dos "unidades de dosificación" que contienen fármaco en las que cada unidad de dosificación dentro de la cápsula proporciona un perfil de liberación de fármaco. El control de la unidad o unidades de dosificación de liberación retardada se logra por un recubrimiento polimérico de liberación controlada sobre la unidad de dosificación, o por la incorporación del principio activo en una matriz polimérica de liberación controlada. Cada unidad de dosificación puede comprender un comprimido comprimido o moldeado, en el que cada comprimido dentro de la cápsula proporciona un perfil de liberación de fármaco diferente. Para las formas de dosificación que imitan un perfil de dosificación de dos veces al día, un primer comprimido libera fármaco de forma sustancial inmediatamente después de la ingestión de la forma de dosificación, mientras que un segundo comprimido libera fármaco aproximadamente 3 horas a menos de 14 horas después de la ingestión de la forma de dosificación. Para formas de dosificación que imitan un perfil de dosificación de tres veces al día, un primer comprimido libera fármaco de forma sustancial inmediatamente después de la ingestión de la forma de dosificación, un segundo comprimido libera fármaco de aproximadamente 3 horas a menos de 10 horas después de la ingestión de la forma de dosificación y el tercer comprimido libera fármaco de al menos 5 horas a aproximadamente 18 horas después de la ingestión de la forma de dosificación. Es posible que la forma de dosificación incluya más de tres comprimidos. Aunque la forma de dosificación no incluirá generalmente más de un tercer comprimido, pueden utilizarse formas de dosificación que alojen más de tres comprimidos.

Alternativamente, cada unidad de dosificación en la cápsula puede comprender una pluralidad de perlas, gránulos o partículas que contienen fármaco. Como se conoce en la técnica, “perlas” que contienen fármaco se refieren a perlas hechas con fármaco y uno o más excipientes o polímeros. Las perlas que contienen fármaco pueden producirse aplicando fármaco a un soporte inerte, por ejemplo, perlas de azúcar inerte recubiertas con fármaco o creando un “núcleo” que comprende tanto fármaco como uno o más excipientes. Como también se conoce, los “gránulos” y las “partículas” que comprenden fármaco comprenden partículas de fármaco que pueden o pueden no incluir uno o más excipientes o polímeros adicionales. En contraste con las perlas que contienen fármaco, los gránulos y las partículas no contienen un soporte inerte. Los gránulos comprenden generalmente partículas de fármaco y requieren procesamiento adicional. Generalmente, las partículas son más pequeñas que los gránulos y no se procesan adicionalmente. Aunque las perlas, los gránulos y las partículas pueden formularse para proporcionar liberación inmediata, las perlas y los gránulos se emplean generalmente para proporcionar liberación retardada.

## 2. Formulaciones líquidas

Las formulaciones líquidas contienen uno o más agentes de pérdida de peso disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéutico líquido.

Los vehículos líquidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua destilada, agua desionizada, agua pura o ultrapura, solución salina u otras soluciones acuosas fisiológicamente aceptables que contienen sales y/o tampones, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de Ringer y cloruro sódico isotónico o cualquier otra solución acuosa aceptable para la administración a un animal o un humano.

Preferentemente, las formulaciones líquidas son isotónicas con respecto a los fluidos fisiológicos y de aproximadamente el mismo pH, variando por ejemplo, de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 7,4, más preferentemente de aproximadamente pH 6,0 a pH 7,0. El vehículo farmacéutico líquido puede incluir uno o más tampones fisiológicamente compatibles, tales como tampones fosfato. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un contenido salino y un pH adecuados para una solución acuosa para administración pulmonar.

Las formulaciones líquidas pueden incluir uno o más agentes de suspensión, tales como derivados de celulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto o lecitina. Las formulaciones líquidas pueden incluir también uno o más conservantes, tales como *p*-hidroxibenzoato de etilo o de *n*-propilo.

En algunos casos la formulación líquida puede contener uno o más disolventes que son disolventes residuales de clase 3 orgánicos (es decir, no acuosos) de baja toxicidad, tales como etanol, acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, éter de etilo y propanol. Estos disolventes pueden seleccionarse basándose en su capacidad para aerosolizar fácilmente la formulación. Cualquier disolvente tal incluido en la formulación líquida no debe reaccionar perjudicialmente con el uno o más principios activos presentes en la formulación líquida. El disolvente debe ser lo suficientemente volátil para permitir la formación de un aerosol de la solución o suspensión. Los disolventes o agentes aerosolizantes adicionales, tales como un freón, alcohol, glicol, poliglicol o ácido graso, también pueden incluirse en la formulación líquida según se desee para aumentar la volatilidad y/o alterar el comportamiento de aerosolización de la solución o la suspensión.

Las formulaciones líquidas también pueden contener cantidades minoritarias de polímeros, tensioactivos u otros excipientes bien conocidos por aquellos expertos en la materia. En este contexto, “cantidades minoritarias” significa que no están presentes excipientes que puedan afectar adversamente a la captación del uno o más principios activos en los pulmones.

## V. Formulaciones para su uso en el tratamiento

Las formulaciones farmacéuticas que contienen uno o más de los agentes de pérdida de peso descritos en el presente documento pueden administrarse para inducir la pérdida de peso en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, reducir la grasa corporal en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, reducir la ingesta de comida en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, mejorar la homeostasia de la glucosa en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido, prevenir la ganancia de peso y/o prevenir un aumento del índice de masa corporal en un paciente normal, pre-obeso, obeso u obeso mórbido, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas se administran a un paciente que padece obesidad (por ejemplo, un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido), una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad, diabetes, síndrome de resistencia a insulina, lipodistrofia, esteatohepatitis no alcohólica, una enfermedad cardiovascular, síndrome de ovario poliquístico o un síndrome metabólico.

En casos donde las formulaciones farmacéuticas se administran para normalizar el azúcar en sangre, las formulaciones se administran preferentemente en una cantidad eficaz para disminuir los niveles de glucosa en sangre a menos de aproximadamente 180 mg/dl. Las formulaciones pueden co-administrarse con otras terapias anti-diabéticas, si es necesario, para mejorar la homeostasia de la glucosa.

Las formulaciones farmacéuticas también pueden administrarse a pacientes que padecen una enfermedad o un trastorno que provoca obesidad o predispone a un paciente a ser obeso, tales como el síndrome de Bardet-Biedl o

una mutación en el gen que codifica para la proteína del receptor 4 de melanocortina (MC4R) (es decir, una mutación de MCR4).

#### A. Dosificaciones

5 Las dosificaciones precisas administradas a un paciente dependerán de muchos factores, incluyendo las características físicas del paciente (por ejemplo, el peso), el grado de gravedad de la enfermedad o el trastorno a tratarse y la presencia o la ausencia de otras enfermedades o trastornos que complican y pueden determinarse fácilmente por el médico que prescribe.

10 El agente de pérdida de peso se administra a una dosificación oral de entre 0,005 mg y 10 mg por kg de peso corporal al día, tal como entre 0,05 mg y 1,0 mg por kg de peso corporal al día; más preferentemente entre aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal al día, tal como entre 0,05 mg y 1,0 mg por kg de peso corporal al día o entre 0,5 mg y 0,1 mg por kg de peso corporal al día. El agente de pérdida de peso puede administrarse a una dosificación oral de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal al día, tal como entre aproximadamente 1,0 mg y 5,0 mg por kg de peso corporal al día.

15 En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para inducir la pérdida de peso. En ciertas realizaciones, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para disminuir la masa corporal en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 15 %, lo más preferentemente en al menos un 20 %.

20 En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la grasa corporal. En ciertas realizaciones, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para disminuir la grasa corporal en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 15 %, lo más preferentemente en al menos un 20 %.

25 En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la ingesta de comida, el apetito o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la ingesta de comida diaria promedio (en términos de calorías) en al menos un 15 %, un 17 %, un 20 %, un 22 %, un 25 %, un 28 %, un 30 %, un 32 %, un 35 % o más.

30 En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida en una cantidad terapéuticamente eficaz para mejorar la homeostasia de la glucosa. En algunos casos, se administra una formulación farmacéutica que contiene uno o más de los agentes de pérdida de peso a un paciente pre-obeso, obeso o con obesidad mórbida en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la glucosa en sangre en plasma promedio en ayuno en al menos un 10 %, un 12 %, un 15 %, un 18 %, un 20 %, un 22 %, un 25 % o más. En casos donde las formulaciones farmacéuticas se administran para normalizar el azúcar en sangre, las formulaciones se administran preferentemente en una cantidad eficaz para disminuir los niveles de glucosa en sangre a menos de aproximadamente 180 mg/dl, más preferentemente menos de aproximadamente 160 mg/dl, más preferentemente menos de aproximadamente 140 mg/dl.

#### B. Administración terapéutica

35 Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse, por ejemplo, en una dosificación única, como una dosificación continua, una o más veces al día, o menos frecuentemente, tal como una vez a la semana. Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse una vez al día o más de una vez al día, tales como dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día o más. En ciertas realizaciones, las formulaciones se administran oralmente, una vez al día o menos.

40 Las formulaciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz y durante un periodo de tiempo eficaz para provocar el beneficio terapéutico deseado. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica se administra diariamente, bisemanalmente, semanalmente, bimensualmente o mensualmente durante un periodo de al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, un año o más.

45 Las formulaciones farmacéuticas también pueden administrarse profilácticamente, por ejemplo, a pacientes o sujetos quienes están en riesgo de una enfermedad o trastorno tales como diabetes u obesidad. De esta manera, los procedimientos también pueden implicar identificar a un sujeto en riesgo de diabetes u obesidad antes de la administración de las formulaciones.

La cantidad exacta de las formulaciones requeridas variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad, el sexo, el peso y la condición general del sujeto, el grado de la enfermedad en el sujeto, la ruta de administración, si se incluyen otros fármacos en el régimen y similares. De esta manera, no es posible especificar una dosificación exacta para cada formulación. Sin embargo, puede determinarse una dosificación apropiada por un experto en la materia usando solamente experimentación rutinaria. Por ejemplo, las dosificaciones eficaces y los calendarios para administrar las composiciones pueden determinarse empíricamente y realizar dichas determinaciones está dentro de la habilidad en la materia.

La dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administraciones diarias, durante uno o varios días. Pueden encontrarse directrices en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos.

### 1. Co-administración con principios activos

En otras realizaciones, los compuestos desvelados en el presente documento pueden co-administrarse con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos o diagnósticos. La co-administración, como se usa en el presente documento, incluye la administración dentro de la misma forma de dosificación o dentro de diferentes formas de dosificación. Para estas realizaciones donde los compuestos descritos en el presente documento y el uno o más agentes adicionales terapéuticos, profilácticos o diagnósticos se administran en diferentes formas de dosificación, las formas de dosificación pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, en el mismo tiempo o esencialmente al mismo tiempo) o bien secuencialmente. "Esencialmente al mismo tiempo" como se usa en el presente documento significa generalmente dentro de diez minutos, preferentemente dentro de cinco minutos, más preferentemente dentro de dos minutos, más preferentemente dentro de un minuto. Las formas de dosificación administradas secuencialmente pueden administrarse dentro de varias horas entre sí, por ejemplo, con diez horas, nueve horas, ocho horas, siete horas, seis horas, cinco horas, cuatro horas, tres horas, dos horas, una hora, 30 minutos, 20 minutos o 15 minutos.

En ciertas realizaciones, los agentes de pérdida de peso descritos en el presente documento se co-administran con leptina o un análogo de leptina. En estos casos, la leptina o un análogo de leptina pueden co-administrarse con los agentes de pérdida de peso durante una porción del periodo de tratamiento, o durante la totalidad del periodo de tratamiento. En realizaciones preferidas, los agentes de pérdida de peso se co-administran con r-metHuLeptina (A-100, METRELEPTIN®), disponible de Amylin Pharmaceuticals (San Diego, Calif.).

En ciertas realizaciones, los pacientes padecen diabetes. En estos casos, los agentes de pérdida de peso descritos en el presente documento pueden co-administrarse con una o más terapias para diabetes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Administración de celastrol a ratones obesos

El celastrol se obtuvo de fuentes comerciales. Ratones C57B1/6J se colocaron en alimentación con dieta alta en grasas (HFD; Research Diets, D12451, % de grasa 45 kcal) durante 16 semanas. Después del establecimiento de la obesidad y la resistencia a leptina, a los ratones se administró en primer lugar celastrol a diferentes dosis (10, 50 y 100 µg/kg) en 25 µl de DMSO, una vez al día y vehículo (DMSO, 25 µl) por inyección intraperitoneal (i.p.). Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua salvo que se indique de otra manera.

En todos los experimentos, cuatro días antes de la administración de fármacos, los animales se llevaron a través de un periodo de aclimatación donde se les dio solución salina (25 µl) para reducir el efecto del estrés creado por la inyección i.p. Después de cuatro días de aclimatación, se administró celastrol a ratones obesos alimentados con HFD diariamente por inyección i.p. a dosis en aumento (10, 50 y 100 µg/kg) durante tres semanas en 25 µl de DMSO. Un grupo control recibió el mismo volumen de DMSO por inyección i.p.

Como se muestra en la Figura 1A, la administración i.p. de celastrol disminuyó significativamente el peso corporal (Figura 1A,  $p < 0,001$ , 100 µg/kg; Figura 1B  $p < 0,05$ , 10 µg/kg;  $p < 0,001$ , 50 y 100 µg/kg) y la ingesta de comida (Figura 1C,  $p < 0,01$ , tres días de promedio dentro de la primera semana de administración de fármaco) de ratones obesos alimentados con HFD de manera dependiente de la dosis. El día 14 del ensayo, se midió la glucosa en sangre en 6 horas de ayuno de los ratones. Como se muestra en la Figura 1D, el celastrol disminuyó la glucosa en sangre de ratones obesos.

#### Ejemplo 2: Administración de celastrol a ratones sin grasa

Se administró celastrol a ratones sin grasa con dieta de pienso a 50, 100 o 500 µg/kg durante tres semanas por inyecciones i.p. usando el mismo protocolo descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 2A y la Figura 2B, el celastrol indujo una disminución significativa pero pequeña en la ingesta de comida; sin embargo, no indujo pérdida de peso corporal en ratones sin grasa, incluso cuando se administró a ratones sin grasa a dosis cinco veces más altas que la eficaz para reducir el peso corporal en ratones obesos. Estos descubrimientos sugieren que el efecto anoréxico del celastrol se limita a animales obesos. En animales sin grasa, solamente la dosis más alta probada (500 µg/kg) indujo una disminución significativa en la glucosa en sangre (Figura 2C,  $p < 0,05$ ) después de 2

semanas de inyecciones de fármaco.

En combinación, estos descubrimientos sugieren que el celastrol puede administrarse en una cantidad eficaz (por ejemplo, 100 µg/kg en estos estudios) para inducir la pérdida de peso corporal en ratones obesos, pero no en ratones sin grasa.

### 5 Ejemplo 3: Examinación de la dependencia de leptina de la actividad de celastrol

Se administró celastrol (100 µg/kg, una vez al día, en 25 µl de DMSO) a modelos de obesidad de ratón deficiente en leptina (*ob/ob*) y deficiente en receptor de leptina (*db/db*). Ninguno de estos modelos de ratón mostró una disminución significativa en el apetito tras la administración de celastrol (ratones *ob/ob*, Figura 3; ratones *db/db*, Figura 4). Tanto en ratones *ob/ob* como en *db/db*, el peso corporal continuó aumentando de forma similar al grupo control (tratado con vehículo) (*ob/ob*, Figura 3A; *db/db*, Figura 4A). Además, el celastrol falló disminuyendo la glucosa en sangre en 6 horas de ayuno en ratones *ob/ob* (Figura 3C) o bien *db/db* (Figura 4C) después de 2 semanas de inyecciones de fármaco.

La capacidad del celastrol para ejercer efectos anti-obesidad cuando se administra oralmente también se examinó. El celastrol indujo una disminución robusta y significativa en el peso corporal (Figura 5A,  $p < 0,001$ ) y en la ingesta de comida (Figura 5B,  $p < 0,001$ ) en ratones obesos alimentados con HFD cuando se administra oralmente a 10 mg/kg en una suspensión de captisol. Además, el celastrol oral disminuyó los niveles de glucosa en sangre en 6 horas de ayuno de ratones obesos alimentados con HFD (Figura 5C,  $p < 0,001$ , glucosa reducida a niveles hipoglucémicos). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la ingesta de comida (Figura 5D) o el peso corporal (Figura 5E) cuando los ratones sin grasa se trataron con celastrol oralmente. A esta dosis, la administración oral de celastrol dio como resultado una disminución pequeña pero significativa en los niveles de glucosa en sangre de ratones sin grasa después de tres semanas de tratamiento (Figura 5F). Además, los ratones *ob/ob* y en *db/db* eran completamente insensibles al tratamiento con celastrol oral (Figura 6A-D).

El hecho de que el celastrol disminuyera el peso corporal y la ingesta de comida de ratones obesos alimentados con HFD pero no en ratones *ob/ob* o en *db/db* sugiere que el efecto anoréxico del celastrol está mediado a través de la señalización de leptina. Aunque los ratones obesos alimentados con HFD tienen niveles de leptina elevados, desarrollan resistencia a leptina y no responden a la administración de leptina exógena. Se hipotético por lo tanto que el celastrol ejerce efectos anti-obesidad a través del aumento de la sensibilidad a la leptina en los cerebros de los ratones obesos alimentados con HFD. Para probar esta hipótesis, se administró leptina a animales obesos alimentados con HFD tratados con celastrol o con vehículo. Para evitar cualquier posible efecto de señalización de leptina de pérdida de peso o ingesta de alimento disminuida creados por la administración de celastrol, se llevaron a cabo inyecciones de leptina tras el tratamiento de celastrol agudo como se describe a continuación.

Los ratones sin grasa y obesos alimentados con HFD se dividieron en cuatro grupos: 1) DMSO + solución salina, 2) DMSO + leptina, 3) celastrol + solución salina y 4) celastrol + leptina ( $n = 3$  por grupo). Los ratones se inyectaron (ip) con 100 µg/kg de celastrol o vehículo (DMSO) una hora antes del ciclo de oscuridad (día cero). 24 horas más tarde, los ratones se inyectaron una segunda vez con celastrol o DMSO (Día 1) y todos los animales se llevaron a un ayuno de 24 horas. El día dos, a 21 horas de ayuno, los ratones recibieron una inyección final de DMSO o celastrol. 30 minutos antes del ciclo de oscuridad, a 23,5 horas de ayuno, los ratones recibieron una inyección ip sencilla de leptina (10 mg/kg, disuelta en solución salina) o de solución salina. 30 minutos más tarde (final del ayuno de 24 horas) se proporcionó a los ratones su dieta previa (bien pienso regular o bien HFD) a discreción. Se grabaron los cambios de ingesta de comida a 1, 3, 6, 15 y 24 horas y de peso corporal a 24 horas (Figura 7A). En el punto de tiempo de 6 horas, la leptina redujo la ingesta de comida aproximadamente un 40 % en grupos sin grasa y obesos alimentados con HFD tratados con DMSO. Los ratones sin grasa tratados con celastrol mostraron una disminución del 60 % en la ingesta de comida tras la inyección de leptina, mientras que los ratones alimentados con HFD exhibieron una disminución del 80 % en la ingesta de comida tras la inyección de leptina (Figura 7B). Durante el periodo de 24 horas de alimentación a discreción todos los ratones sin grasa y los ratones obesos alimentados con HFD tratados con vehículo ganaron peso, mientras que los ratones obesos alimentados con HFD tratados con celastrol continuaron exhibiendo pérdida de peso. Esta pérdida de peso se aumentó además (aproximadamente dos veces) por la administración de leptina (Figura 7D). Esto es claramente evidente cuando la ingesta de comida de los ratones tratados con celastrol se calcula en valores en porcentaje (Figura 7B). Además, los ratones obesos alimentados con HFD eran resistentes al efecto reductor de peso de la leptina salvo que recibieran celastrol (Figura 7D). Como nota, el celastrol solo, como se esperaba, disminuyó la ganancia de peso de ratones obesos alimentados con HFD en ausencia de la administración de leptina exógena, probablemente debido a niveles de leptina ya elevados de los ratones obesos alimentados con HFD.

Para analizar el cambio en la composición corporal durante el tratamiento de celastrol (ip 100 µg/kg), la masa sin grasa y la masa grasa de los ratones se midió usando Absorciometría de rayos X de emisión dual (DEXA). La masa sin grasa se mantuvo sin cambios después de las dos semanas de administración crónica de celastrol (Figura 8A). Esto es consistente con que el celastrol no tiene un efecto tóxico que cause anorexia, ya que la masa sin grasa se preservó. Sin embargo, la masa grasa y el porcentaje de grasa se disminuyó significativamente en animales alimentados con HFD tratados con celastrol (Figuras 8B-8C). Consistente con la masa adiposa disminuida, los niveles de leptina mostraron disminuir gradualmente durante la administración crónica de celastrol (Figura 8D).

Además, la ingesta de comida de los ratones alimentados con HFD se elevó gradualmente hacia el final del estudio conforme los niveles de leptina endógena disminuían. Este descubrimiento soporta la hipótesis de que el efecto anoréxico del celastrol es dependiente de la señalización de leptina.

- 5 La actividad locomotora también fue normal en ratones tratados con celastrol. Esto es consistente con que el celastrol no tiene un efecto tóxico que cause anorexia y pérdida de peso, ya que lo último estaría asociado a una actividad locomotora disminuida.

#### **Ejemplo 4: Efecto de la administración de celastrol en la homeostasia de la glucosa.**

- 10 Como se describe anteriormente, la administración i.p. y oral de celastrol da como resultado una disminución robusta en los niveles de glucosa en sangre en ratones obesos alimentados con HFD. Para analizar el efecto del celastrol en la homeostasis de la glucosa, se realizaron Pruebas de Tolerancia a Glucosa (PTG) y Pruebas de Tolerancia a Insulina (PTI) después de la administración crónica i.p. de celastrol (100 µg/kg).

- 15 Para la PTG, los ratones se dejaron en ayunas durante toda la noche después de una semana de tratamiento con celastrol y recibieron una inyección i.p. de D-glucosa (0,75 g/kg) por la mañana. Para la PTI, después de 16 días de tratamiento de celastrol, los ratones se dejaron en ayunas durante 6 horas (de 8 a.m. a 2 p.m.) y se inyectó intraperitonealmente insulina humana recombinante (1 IU/kg de Eli Lilly). En ambos procedimientos, la glucosa en sangre se midió de la sangre de la vena de la cola a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección.

- 20 Como se muestra en la Figura 9A, después de una semana de tratamiento con celastrol, la homeostasia de la glucosa mejoró significativamente en ratones tratados con celastrol cuando se compara con los ratones tratados con vehículo, como se evidencia por la diferencia en el área bajo la curva (AUC) de PTG (Figura 9B,  $p < 0,001$ ). El día 16, se realizó la PTI. Los ratones obesos alimentados con HFD también exhibieron sensibilidad a la insulina mejorada (Figuras 9C-9D,  $p < 0,01$ ). Consistente con la homeostasia de la glucosa mejorada, los ratones tratados con celastrol exhibieron una expresión de ARNm hepático disminuida de las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) y gamma coactivador 1-alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1a) (Figura 10).

#### **Ejemplo 5: Efecto de la administración de celastrol en la función hepática, renal y tiroidea.**

Para investigar el efecto de la administración de celastrol en la función hepática, se midieron los niveles en suero de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) en ratones después de tres semanas de tratamiento con celastrol (100 µg/kg, i.p.). Se midieron ALT y AST usando un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (de Bio Scientific).

- 30 Como se muestra en la Figura 11, la administración de celastrol disminuye los niveles de ALT y AST de ratones obesos alimentados con HFD, sugiriendo función hepática mejorada. Este descubrimiento se confirmó además histológicamente. El tejido hepático recogido de estos ratones se fijó durante toda la noche en formalina, se seccionó y se tiñó con Hematoxilina & Eosina (H&E). Se redujo la hepatoesteatosis en animales obesos alimentados con HFD por el tratamiento con celastrol. Las secciones hepáticas obtenidas de ratones tratados con celastrol parecían prácticamente idénticas a los hígados de ratones sin grasa. De forma similar, no hubo cambios detectables en la morfología de los riñones de estos ratones. Estos resultados indican que el tratamiento de celastrol también reduce la hepatoesteatosis.

- 40 Se sabe que las hormonas tiroideas aumentan la tasa metabólica basal y por lo tanto aumentan el gasto energético. Se sabe que los niveles elevados de hormonas tiroideas disminuyen el peso corporal con diversos efectos secundarios indeseados. Para examinar si las hormonas tiroideas pueden jugar un papel en la acción anoréxica del celastrol, se midieron los niveles de T3 y T4 en plasma en ratones obesos alimentados con HFD después de 3 semanas de tratamiento con celastrol (100 µg/kg, i.p.). Se sabe que las hormonas tiroideas, incluyendo T3 y T4, están elevadas en animales obesos alimentados con HFD.

- 45 Como se muestra en la Figura 12, el celastrol disminuye los niveles de T3 y T4 en ratones obesos alimentados con HFD. Esta disminución es probablemente una consecuencia de la pérdida de peso y sugiere que el efecto reductor del peso del celastrol no está mediado por la actividad aumentada de hormona tiroidea.

#### **Ejemplo 6: Preparación y Actividad de derivados de celastrol**

- 50 El celastrol es un aceptor de Michael y puede formar aductos de Michael con nucleófilos, tales como los restos cisteína de las proteínas. Se prepararon cuatro derivados (mCS1-mCS4) de celastrol que contenían un sustituyente que bloquea la formación de aductos de Michael en la posición reactiva del celastrol (el átomo de carbono C<sup>6</sup> de la Fórmula I). Ya no se esperaba que estos derivados funcionaran como aceptores de Michael.

##### *Preparación de mCS1*

Se disolvieron 20 mg (0,0378 mmol) de celastrol en 1 ml de etanol a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de 2-mercaptoetanol y la reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Durante el tiempo de reacción, el

color de la mezcla de reacción cambió de naranja brillante a incoloro. El consumo completo del material de partida se confirmó por CL/EM. El disolvente se retiró después a presión reducida para proporcionar mCS1m1 en rendimiento cuantitativo como una película naranja tenue. La purificación adicional puede realizarse en gel de sílice.

#### *Preparación de mCS2*

- 5 Se disolvieron 10 mg (0,0189 mmol) de celastrol en 1 ml de etanol a temperatura ambiente. Se añadieron 3 mg de cistamina y la reacción se agitó. Se observó un cambio de color de naranja brillante a casi incoloro dentro de 10 minutos. Después de la agitación durante toda la noche a temperatura ambiente, mCS2 precipitó, se aisló por filtración y se secó a presión reducida.

#### *Preparación de mCS3*

- 10 Se disolvieron 10 mg (0,0189 mmol) de celastrol en 1 ml de etanol a temperatura ambiente. Se añadieron 5 µl de ácido 3-mercaptopropiónico y la reacción se agitó. Se observó un cambio de color de naranja brillante a casi incoloro dentro de 1 h de agitación a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar mCS3 en rendimiento cuantitativo como una película naranja tenue.

#### *Preparación de mCS4*

- 15 Se disolvieron 10 mg (0,0189 mmol) de celastrol en 1 ml de etanol a temperatura ambiente. Se añadieron 5 ml de D-cisteína y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Se observó un cambio de color de naranja brillante a casi incoloro dentro de 1 h de agitación a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar mCS4 en rendimiento cuantitativo como un sólido blanquecino.

#### *Actividad de mCS1-mCS4*

- 20 Los cuatro derivados de celastrol (mCS1-mCS4) se administraron a ratones obesos alimentados con HFD (100 µg/kg/día durante 25 días, i.p.). Como se muestra en la Figura 13, mCS1-mCS4 disminuyeron el peso corporal y la ingesta de comida con una potencia similar al celastrol.

#### **Ejemplo 7: Co-administración de celastrol y leptina**

- 25 El celastrol y la leptina se co-administraron para disminuir el peso corporal de ratones obesos. Ratones C57B1/6J se colocaron en una alimentación con dieta alta en grasas durante 16 semanas. Posteriormente, se administró celastrol (100 µg/kg/día, i.p.) durante un periodo de 40 días.

- 30 Como se muestra en la Figura 14, el peso corporal de ratones tratados con celastrol disminuyó gradualmente y alcanzó una meseta a aproximadamente el día 17. En este punto, la leptina (1 mg/kg/día, i.p.) se administró a ambos grupos control y celastrol. Como se muestra en la Figura 14, los ratones tratados con celastrol respondieron a leptina por una disminución en el peso corporal, una respuesta que se potenció por las dosis en aumento de leptina.

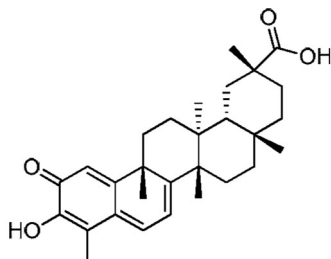
#### **Ejemplo 8: Administración de celastrol para prevenir la obesidad**

- 35 Cuatro grupos de ratones C57BL/6 se tomaron al destete a la edad de 3 semanas. Dos de los grupos se colocaron con dieta de pienso regular y dos grupos se colocaron con dieta alta en grasas. Un grupo de cada dieta recibió diariamente inyecciones de celastrol (100 µg/kg/día, i.p.) y el otro grupo de cada dieta recibió inyecciones de vehículo (25 µl de DMSO al día, i.p.) como un control durante más de 6 meses. Los pesos corporales se midieron a lo largo de todo el estudio y se informan en la figura adjunta. Como se muestra en la Figura 15, el grupo vehículo-HFD desarrolló obesidad, mientras que los otros grupos no.

- 40 Las Figuras 16A y 16B son gráficos que muestran el movimiento ambulatorio en la dirección x (Figura 16A) e y (Figura 16B) para control y celastrol en ciclos de oscuridad y luz. La toxicidad se evaluó usando Comprehensive Lab Animal Monitoring System de Columbus Instruments midiendo la actividad locomotora de los animales. Como se ve en las figuras, los recuentos del movimiento ambulatorio en la dirección x e y de los animales durante los ciclos de oscuridad y de luz no son significativamente diferentes. Esto muestra que los ratones tratados con fármaco no están letárgicos y no muestran ningún signo visible de enfermedad ni toxicidad.

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para su uso en la inducción de pérdida de peso o reducción de grasa corporal, o una combinación de las mismas en un paciente pre-obeso, obeso u obeso mórbido por administración oral de un agente de pérdida de peso en una cantidad entre 0,005 mg y 10 mg al día por kg de peso corporal; en la que la formulación comprende un agente de pérdida de peso que es un compuesto definido por la Fórmula I



Fórmula I;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto de Fórmula I se administra oralmente al individuo a una dosificación de entre 0,005 mg y 1,0 mg por kg de peso corporal al día.
3. Una formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el compuesto de Fórmula I se administra oralmente al individuo a una dosificación de entre 0,05 mg y 1,0 mg por kg de peso corporal al día.
4. Una formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el compuesto de Fórmula I se administra oralmente al individuo a una dosificación de entre 0,05 mg y 1,0 mg por kg de peso corporal al día.
5. Una formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la formulación para su uso comprende además leptina.
6. Una formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la formulación farmacéutica es para administrarse en una cantidad eficaz para disminuir la masa corporal en al menos un 10 % en peso, más preferentemente en al menos un 15 % en peso, lo más preferentemente en al menos un 20 % en peso.
7. Una formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la formulación farmacéutica es para administrarse en una cantidad eficaz para disminuir la grasa corporal en al menos un 10 % en peso, más preferentemente en al menos un 15 % en peso, lo más preferentemente en al menos un 20 % en peso.
8. La formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene un índice de masa corporal de más de 40 kg/m<sup>2</sup>.
9. La formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene obesidad mórbida.
10. La formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de un paciente que es resistente a leptina.
11. La formulación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene un nivel elevado de leptina.

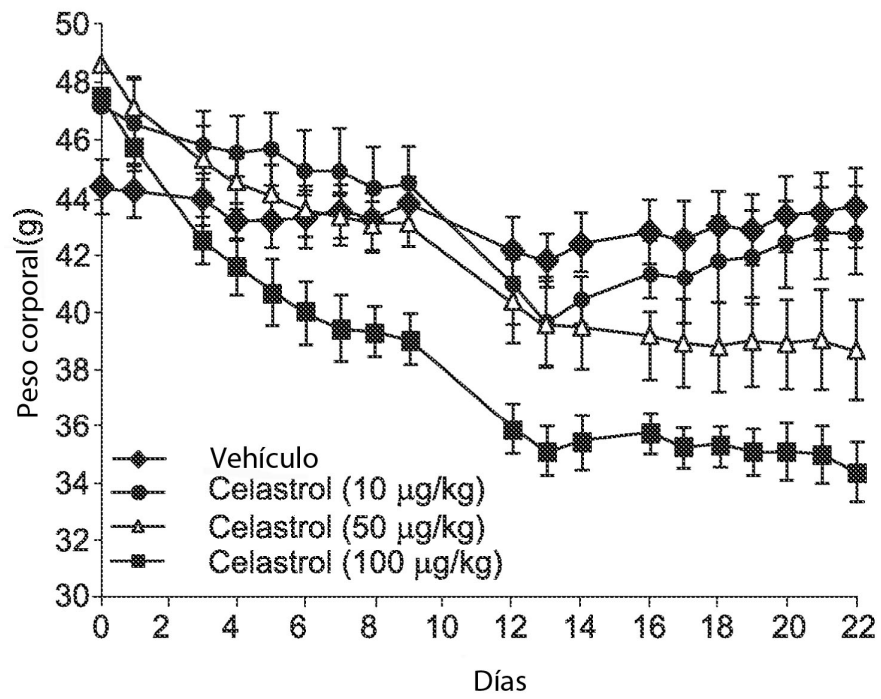


FIG. 1A

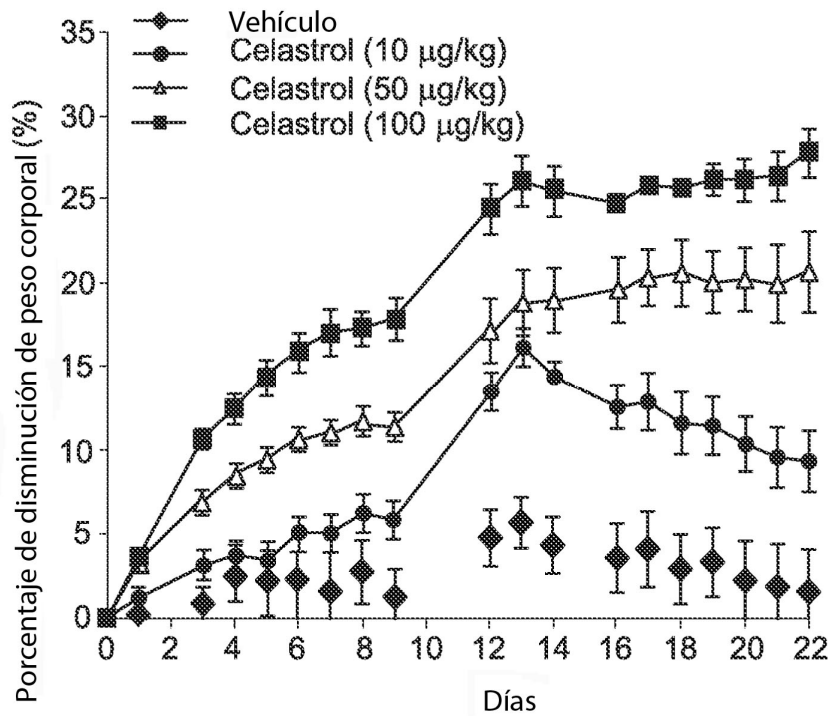


FIG. 1B

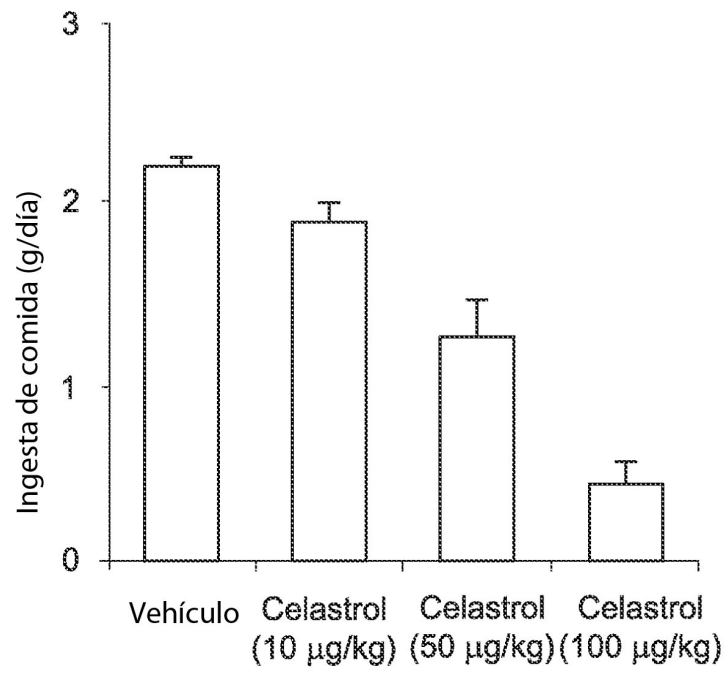


FIG. 1C

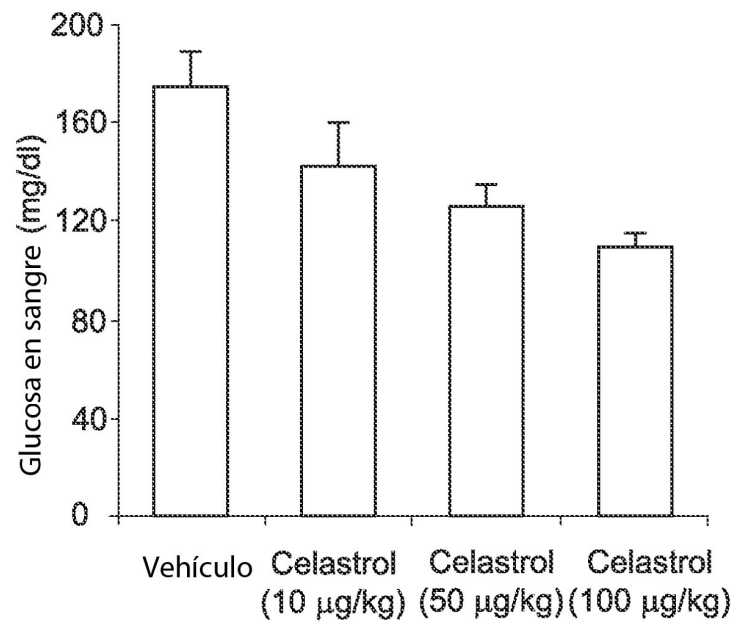
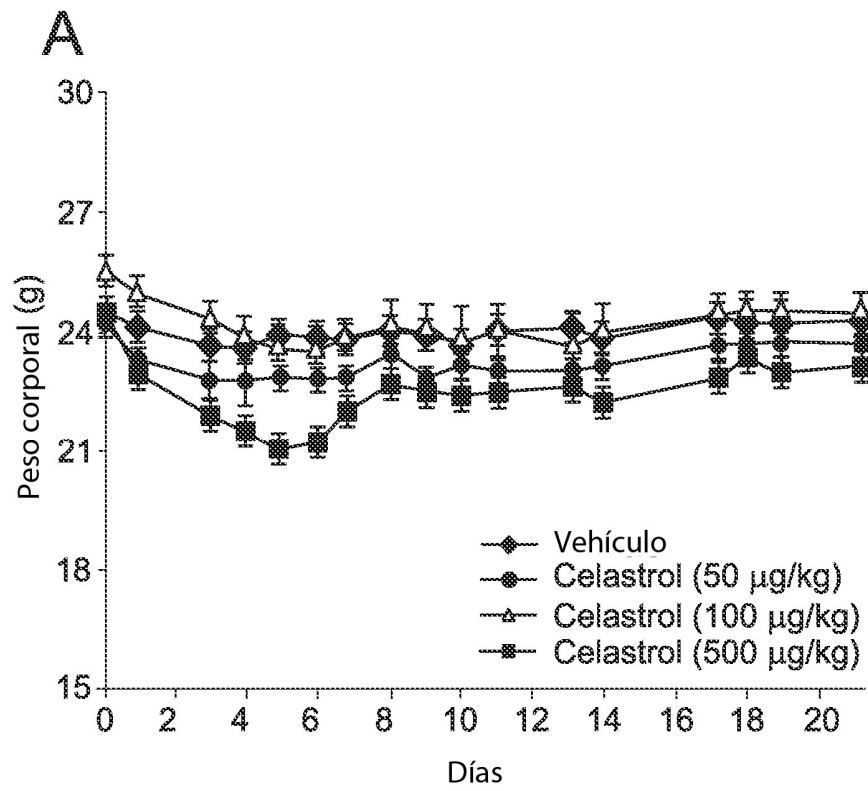


FIG. 1D



**FIG. 2A**

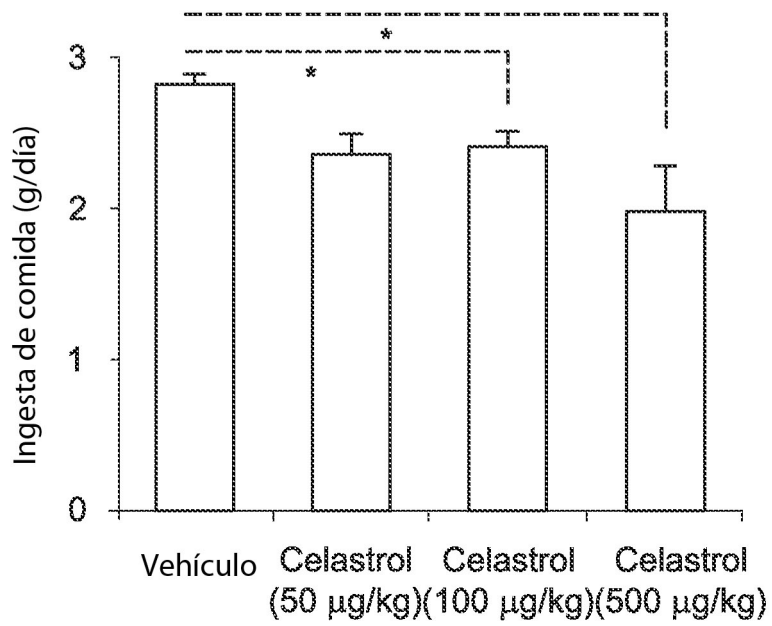


FIG. 2B

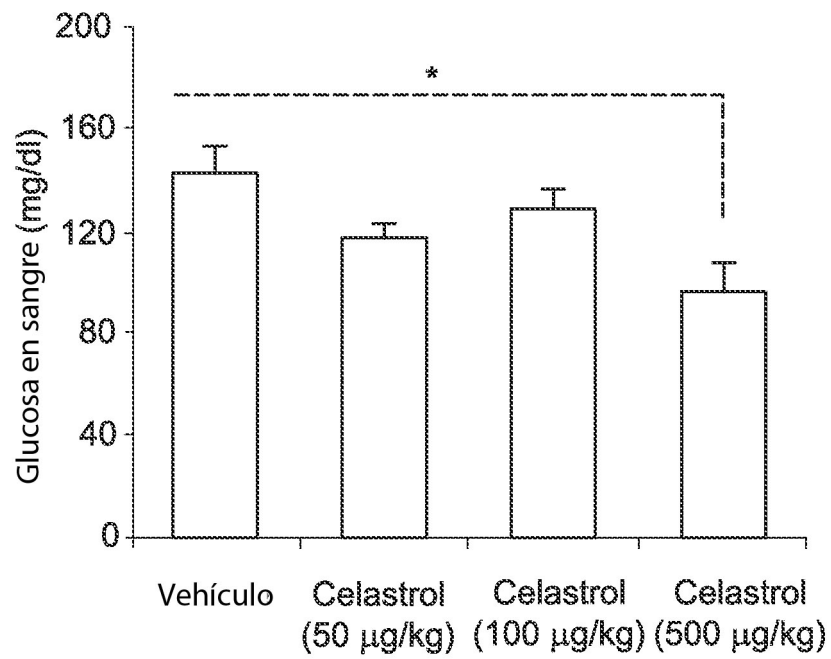


FIG. 2C

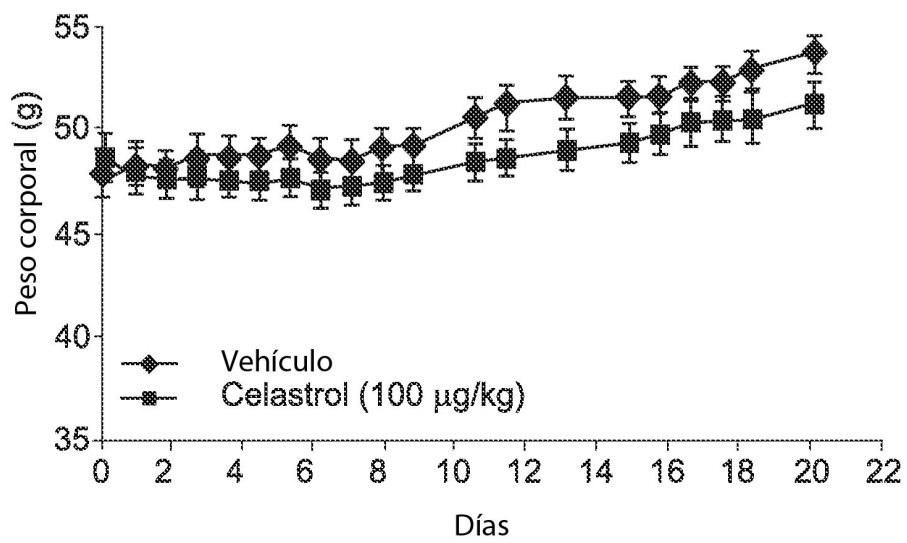


FIG. 3A

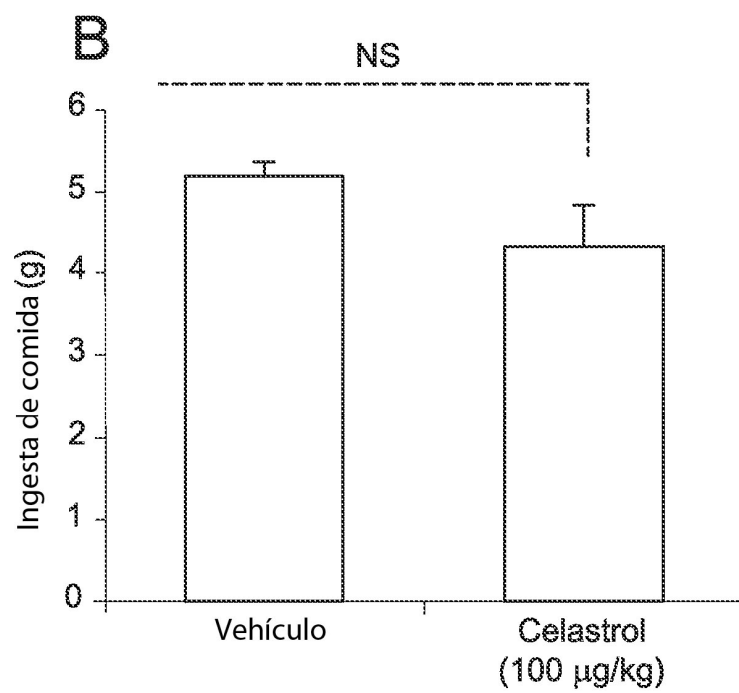


FIG. 3B

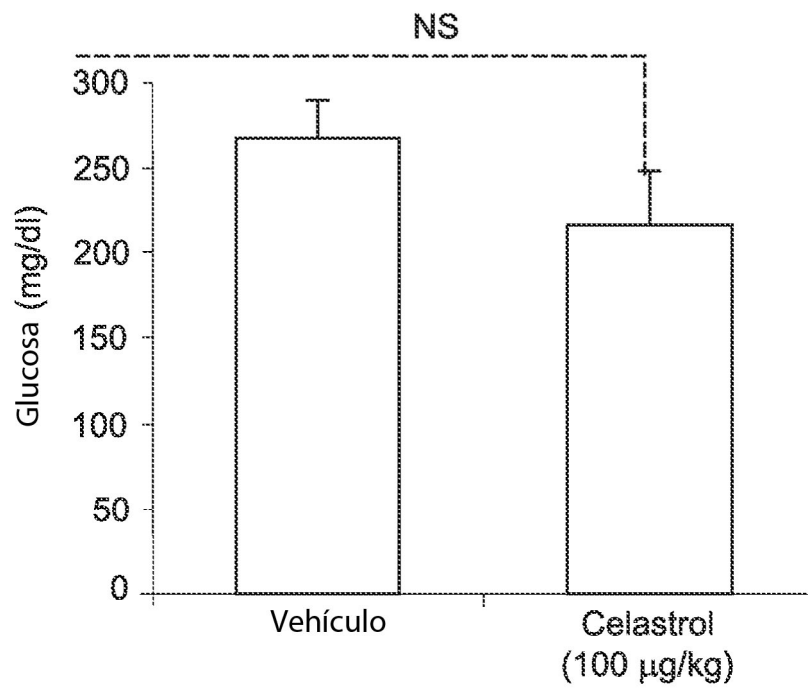


FIG. 3C

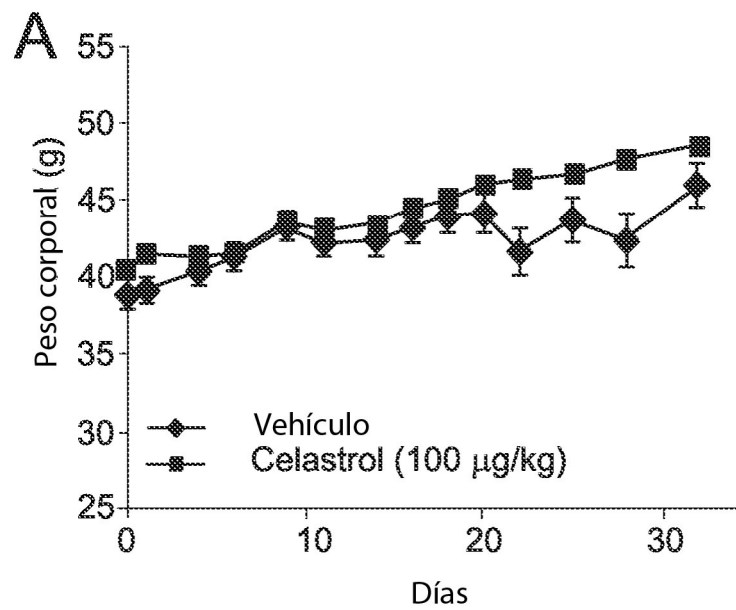
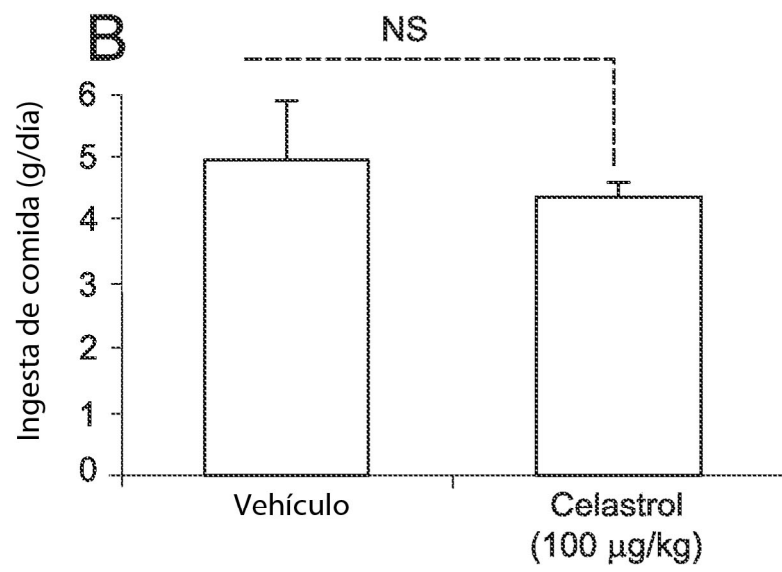
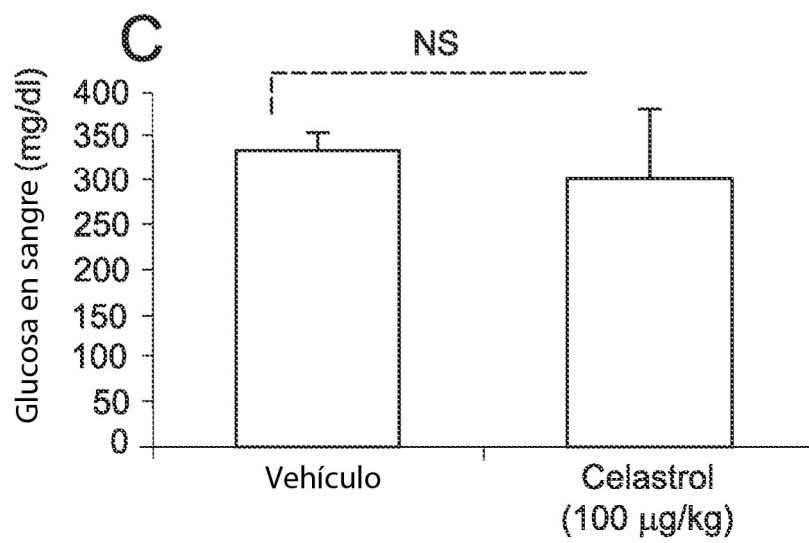


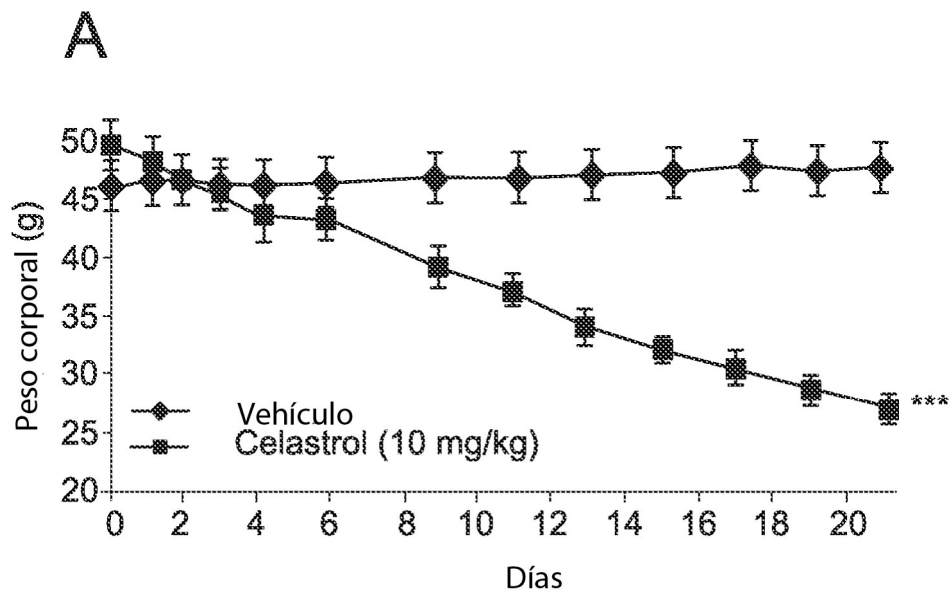
FIG. 4A



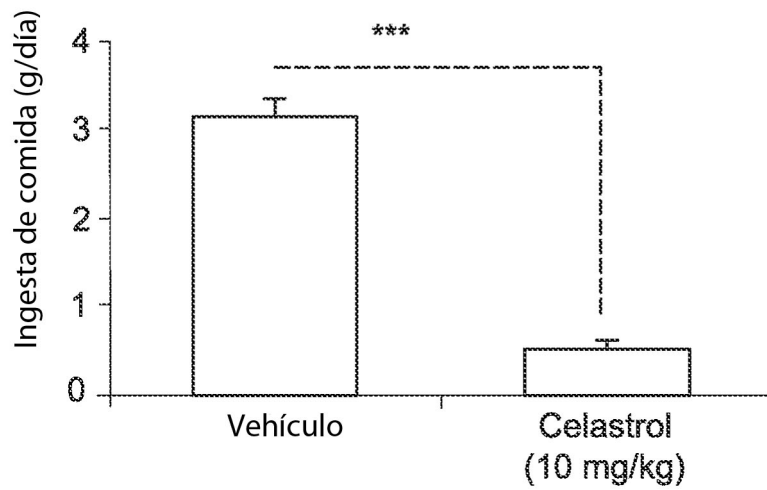
**FIG. 4B**



**FIG. 4C**



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**

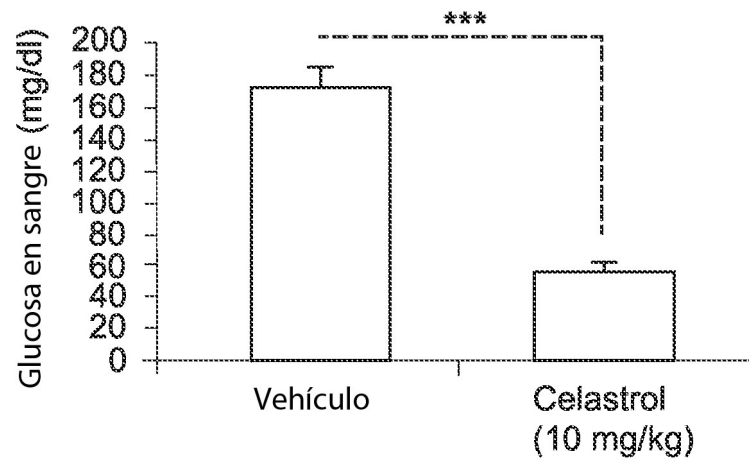


FIG. 5C

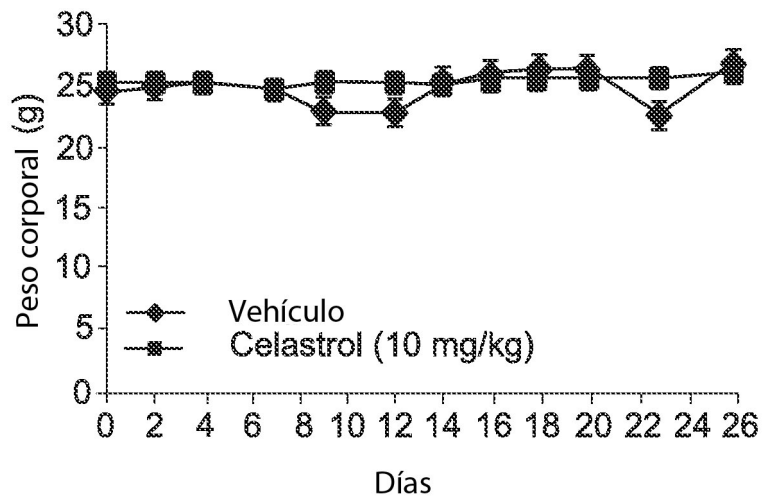


FIG. 5D

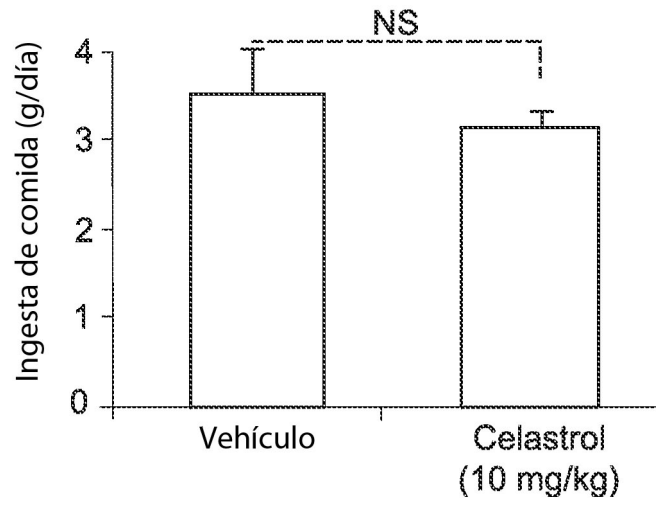


FIG. 5E

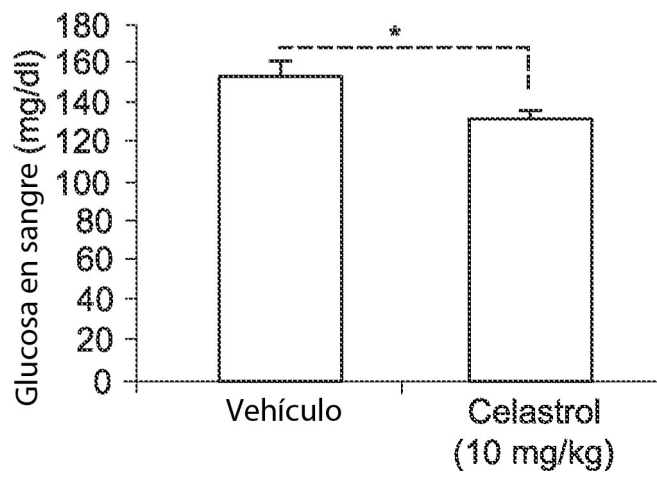


FIG. 5F

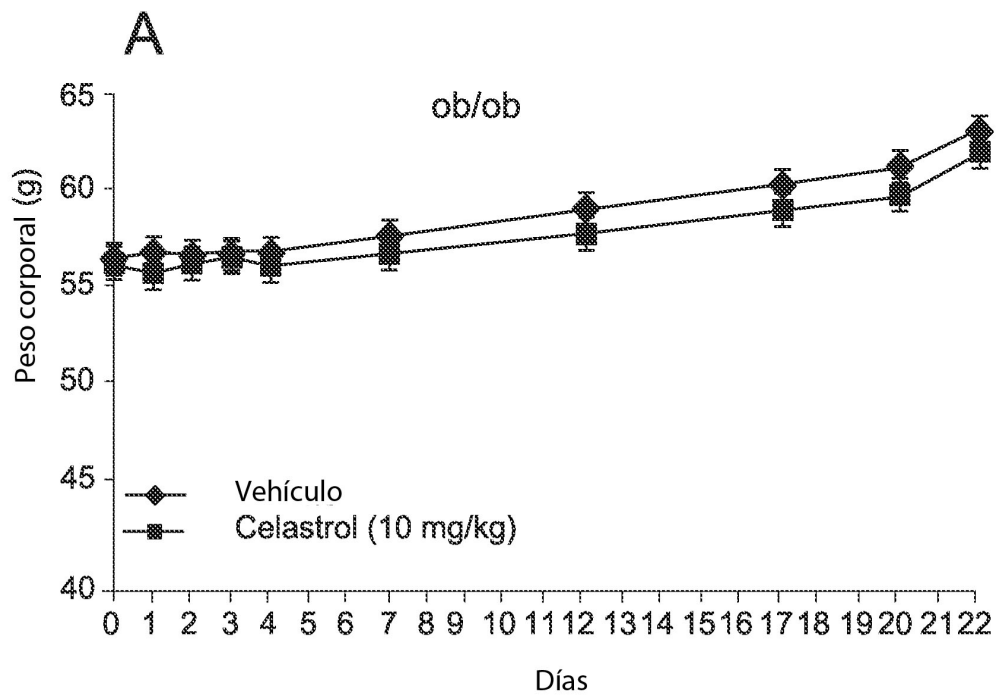


FIG. 6A

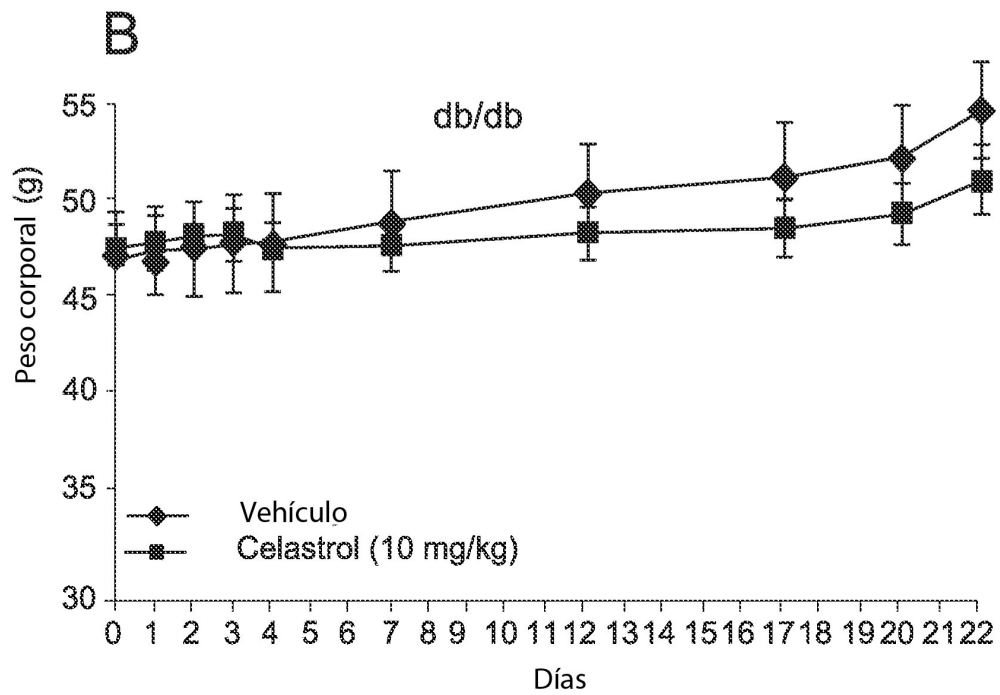


FIG. 6B

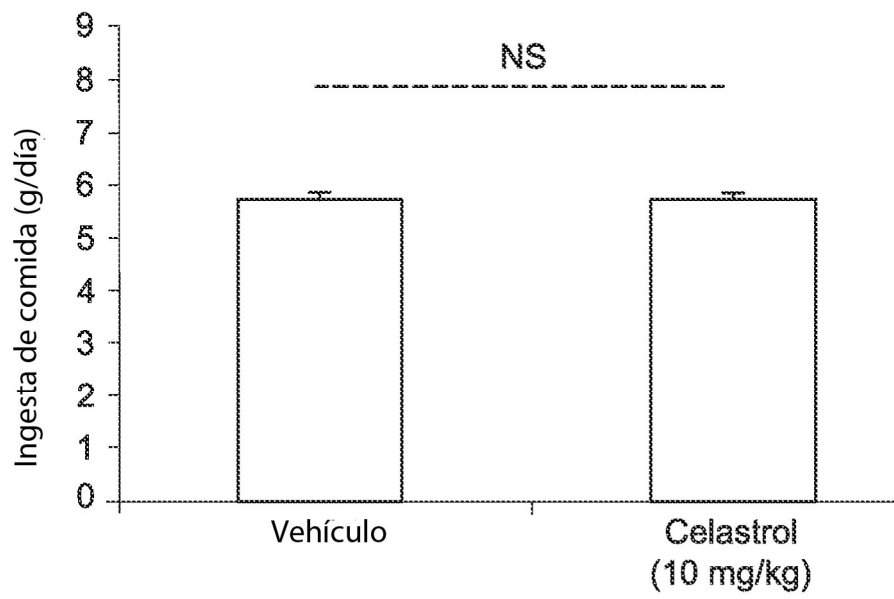


FIG. 6C

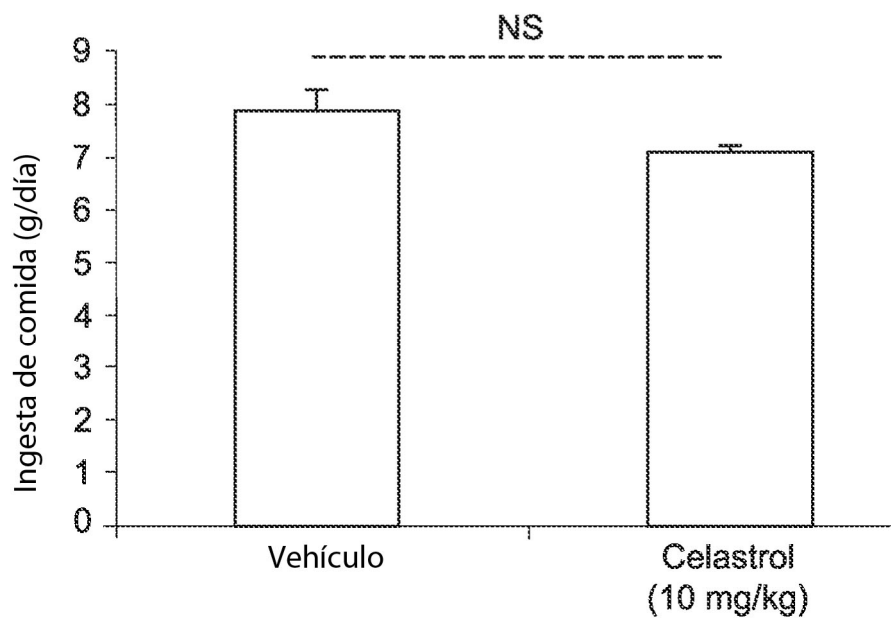
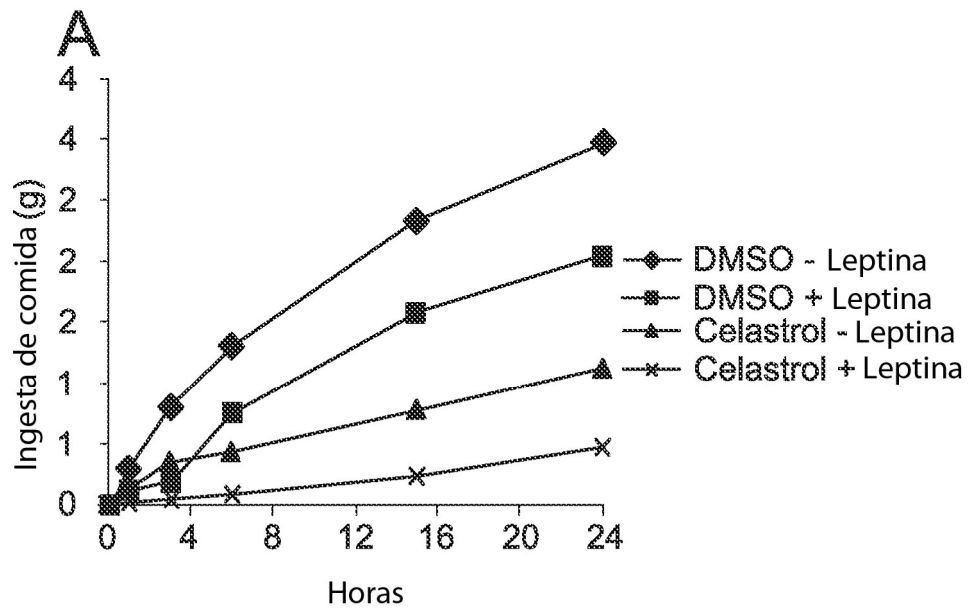
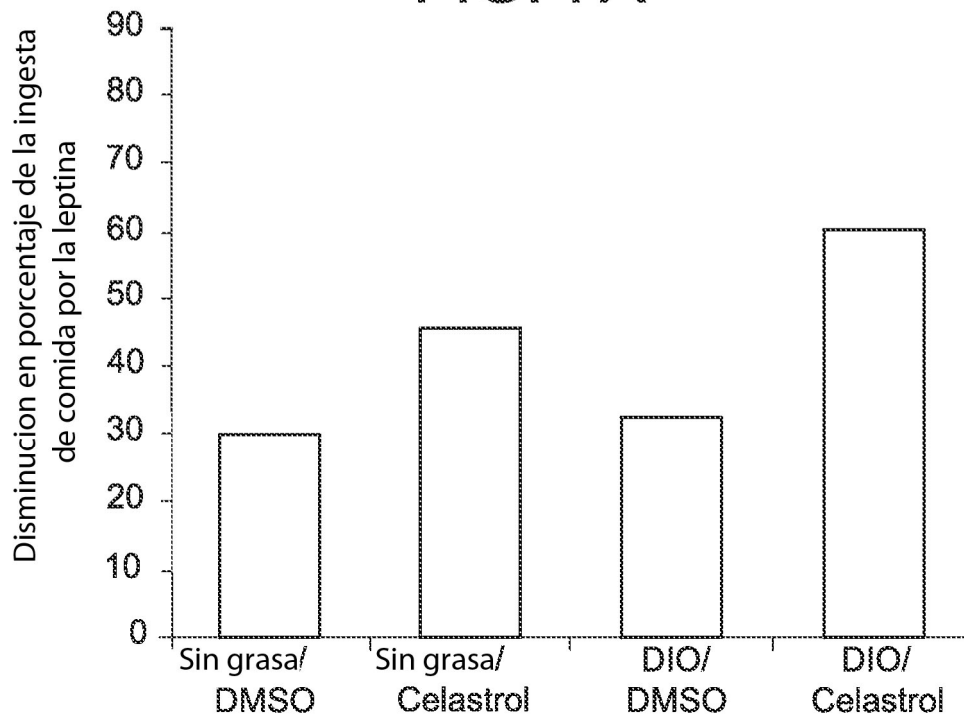


FIG. 6D



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**

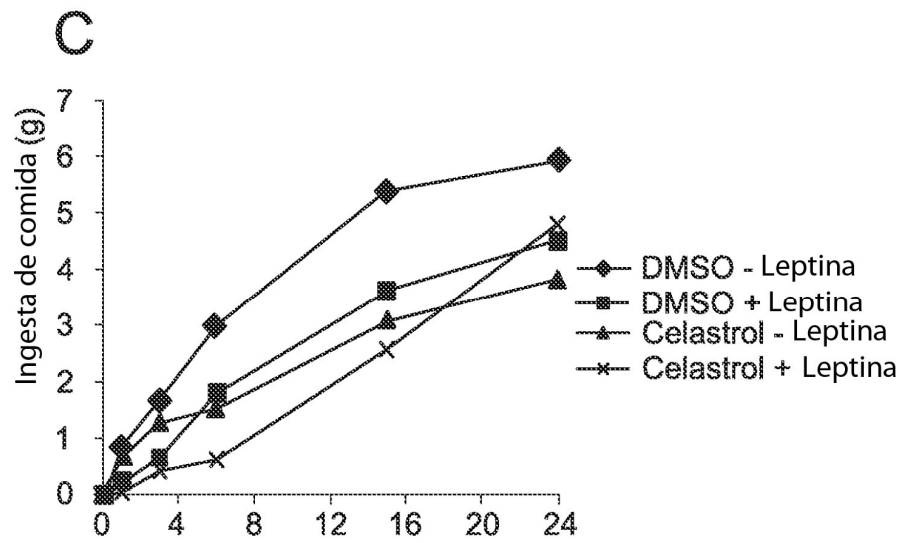


FIG. 7C

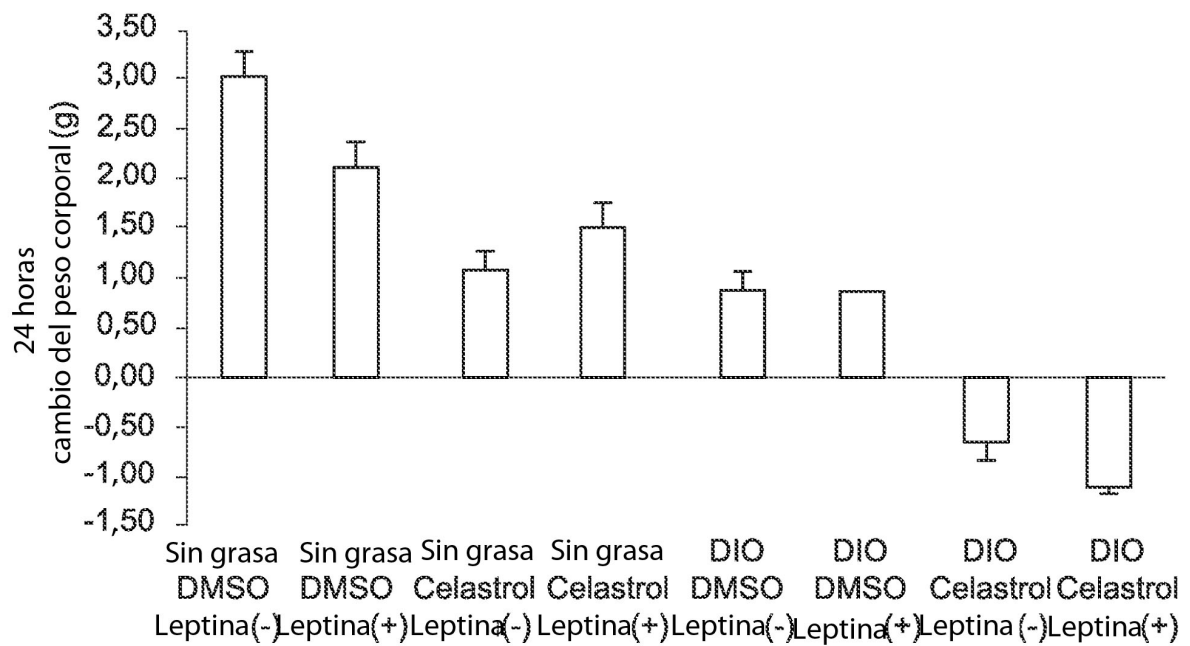


FIG. 7D

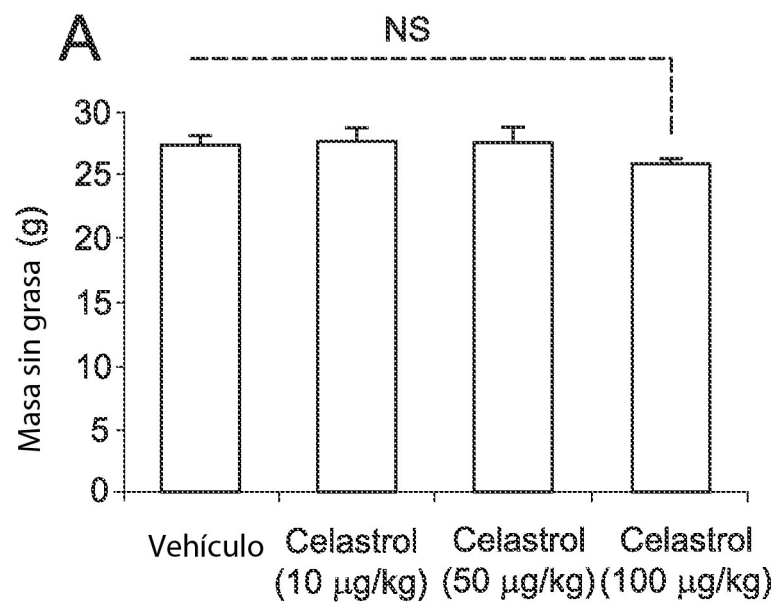


FIG. 8A

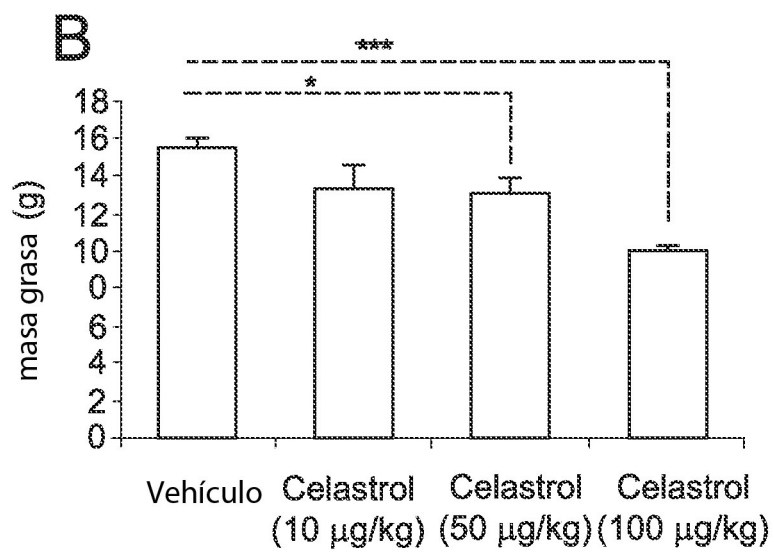


FIG. 8B

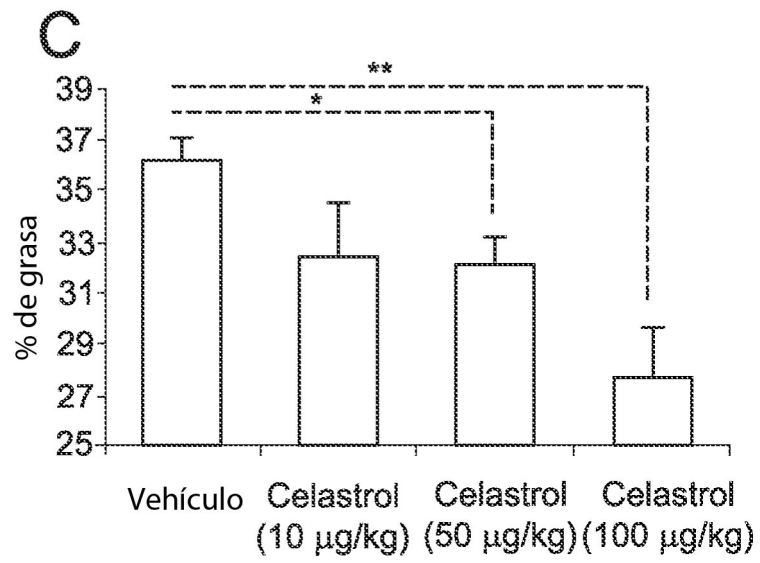


FIG. 8C

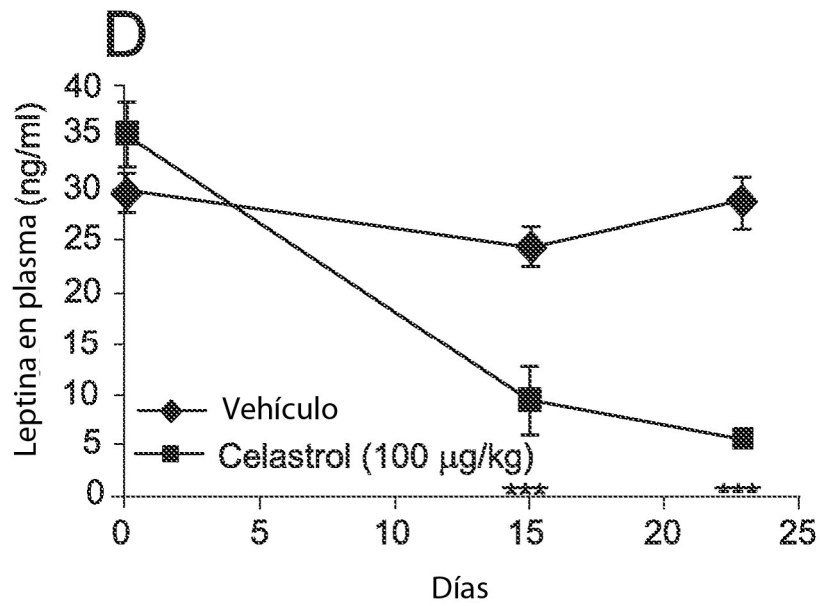
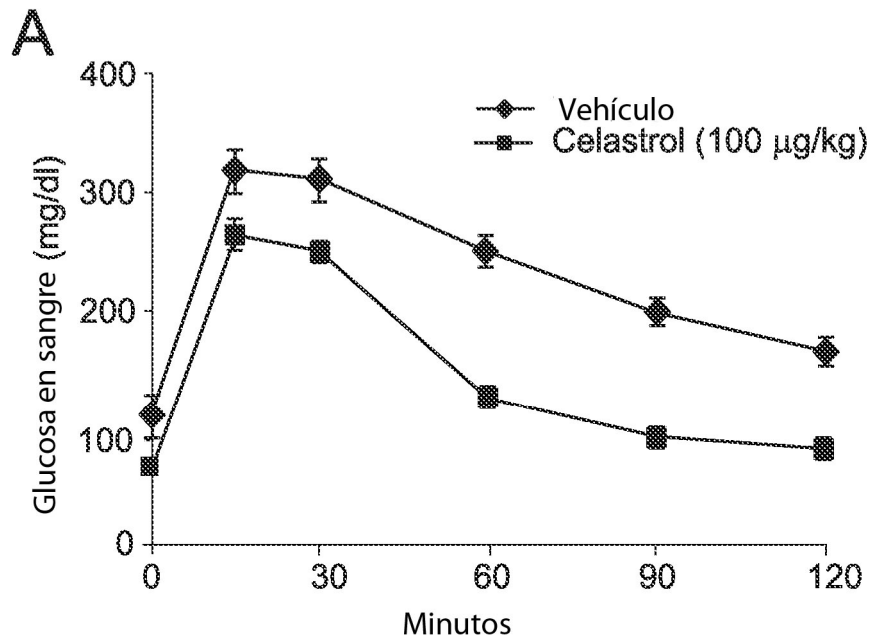
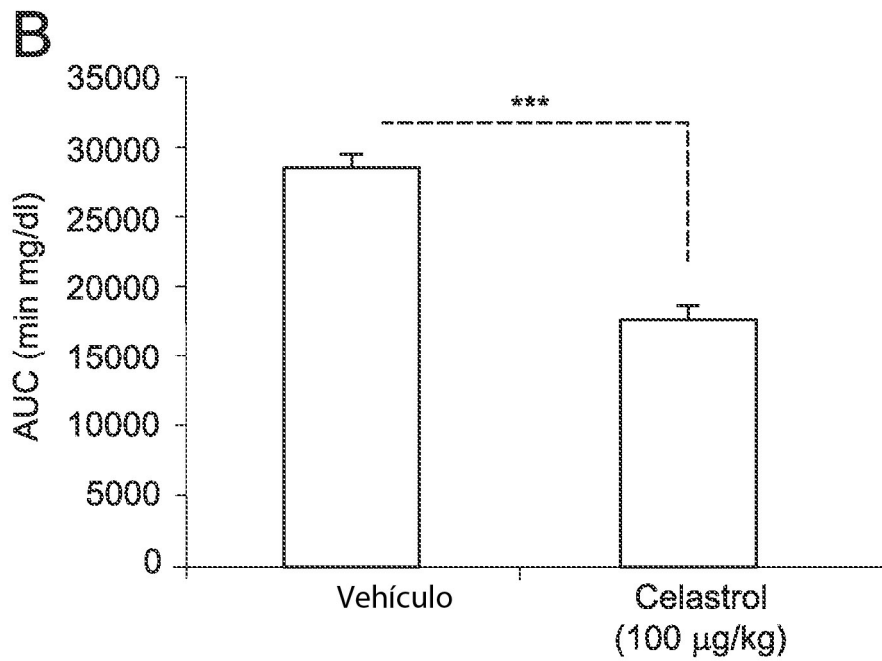


FIG. 8D



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**

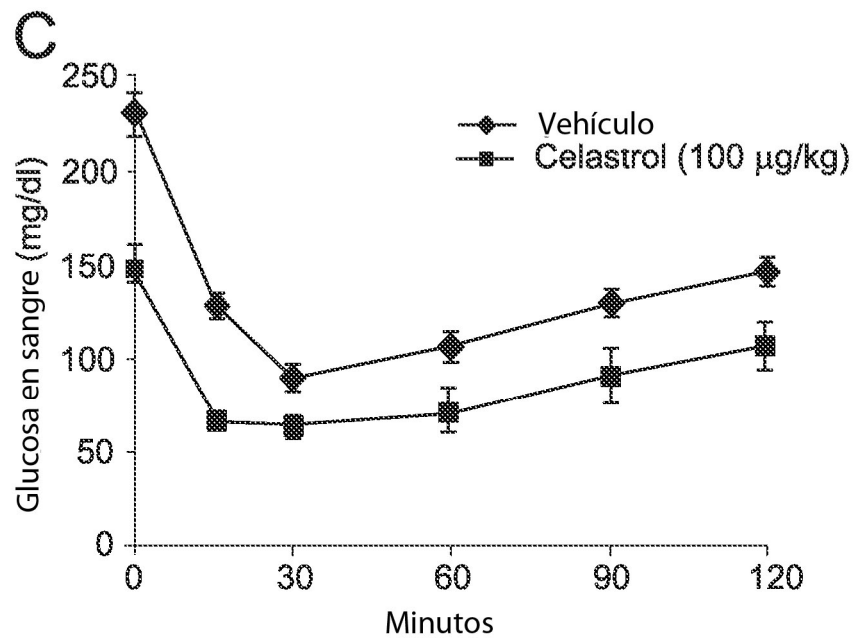


FIG. 9C

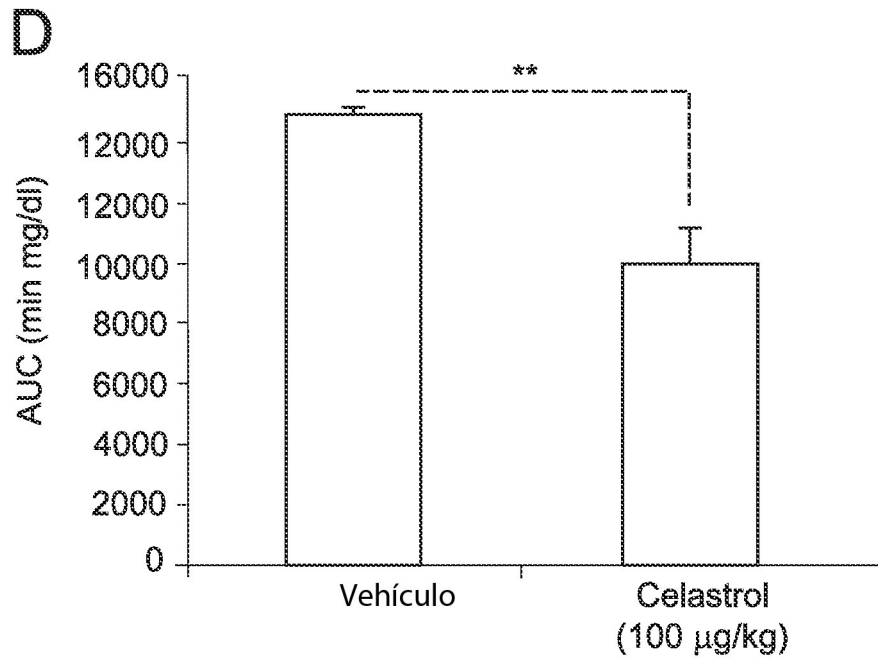
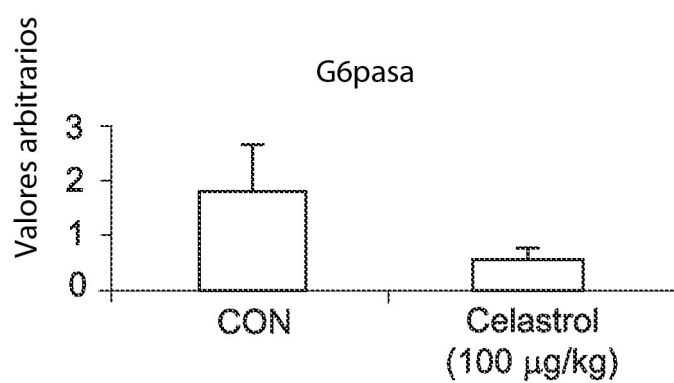
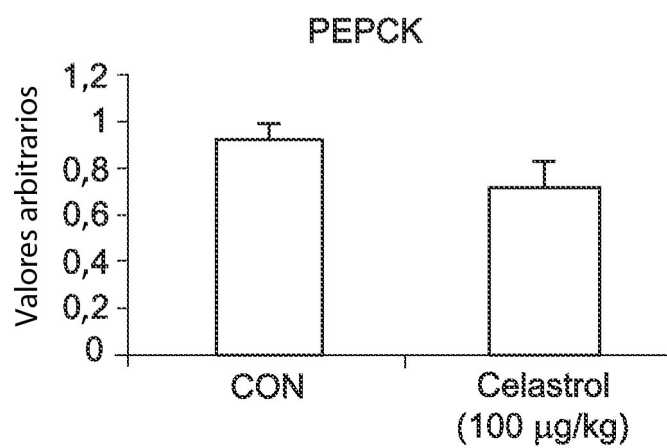


FIG. 9D



**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

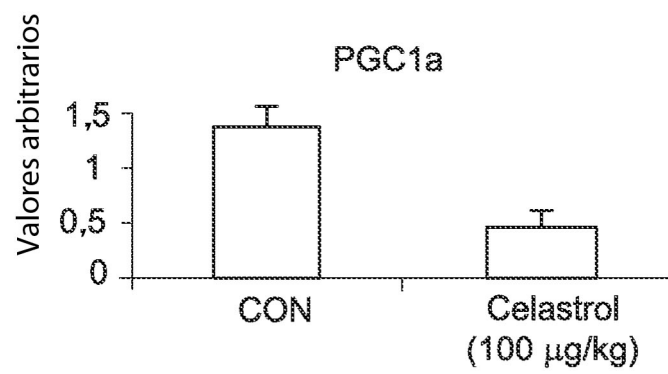


FIG. 10C

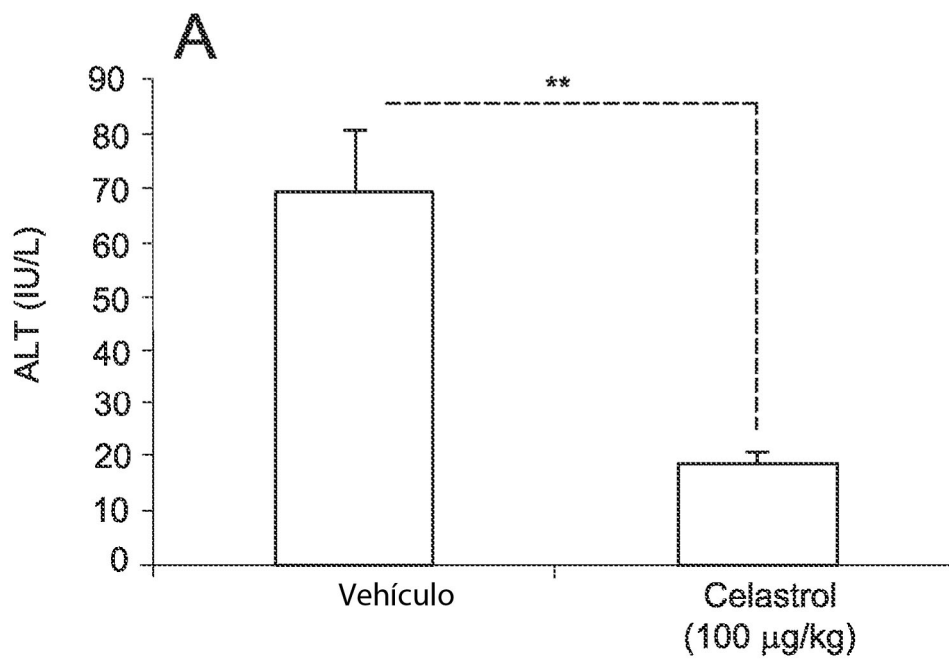
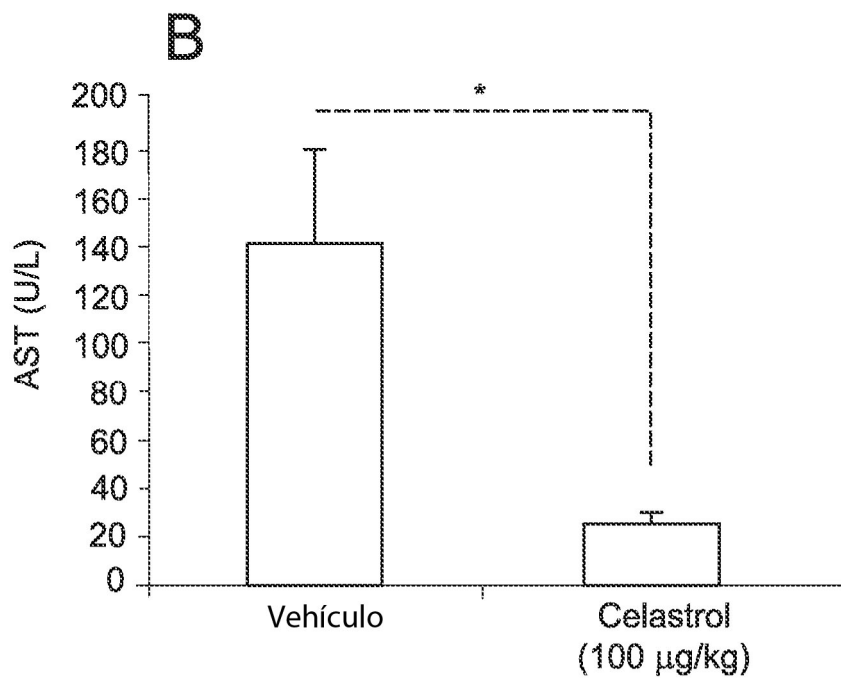
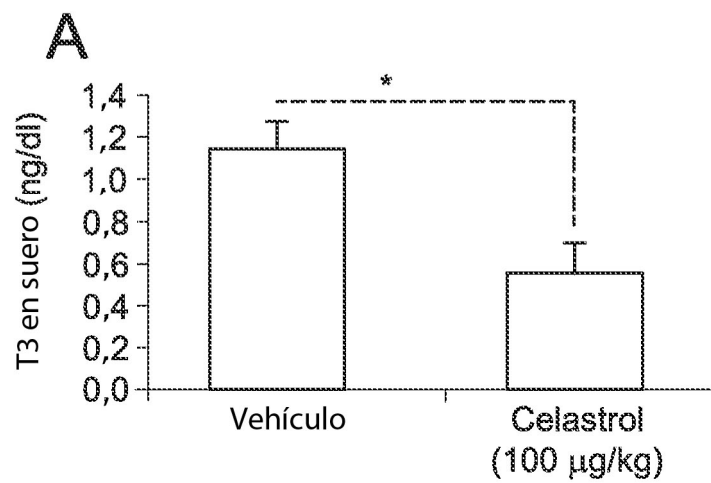


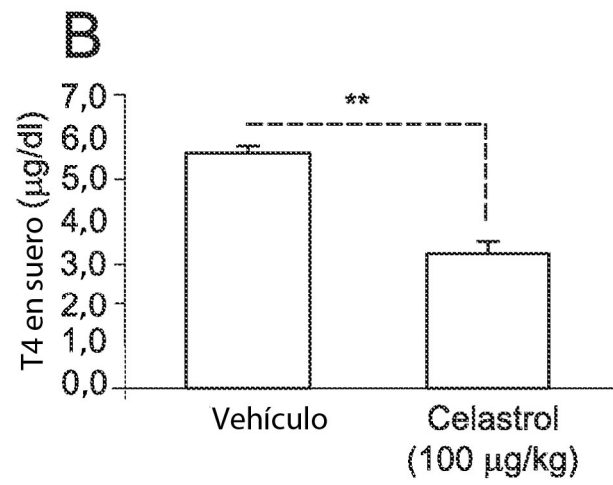
FIG. 11A



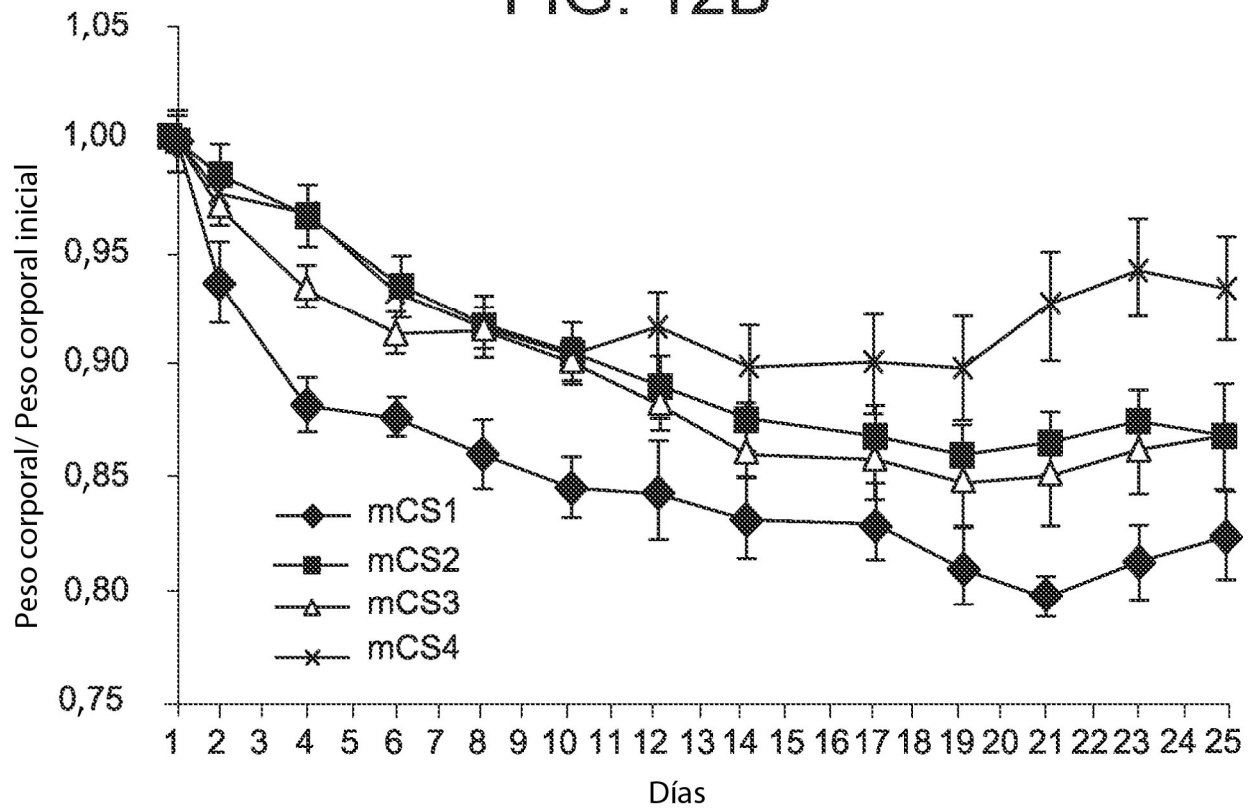
**FIG. 11B**



**FIG. 12A**



**FIG. 12B**



**FIG. 13**

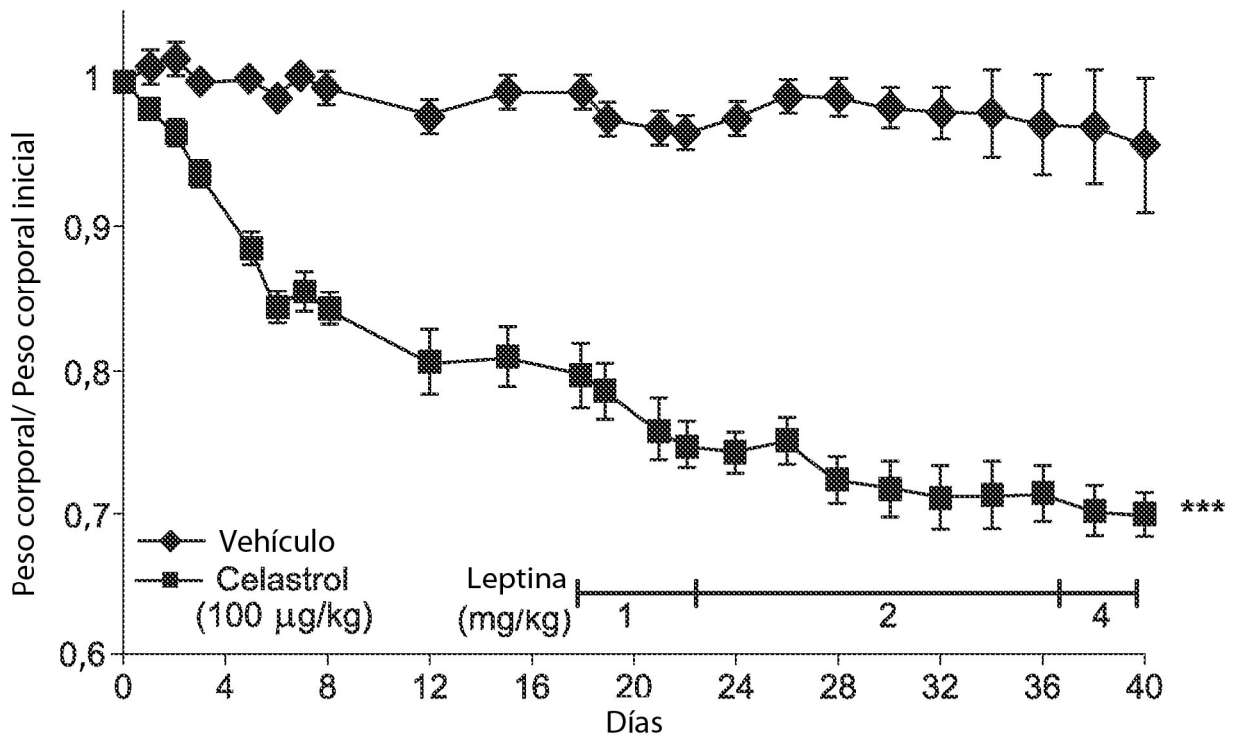


FIG. 14

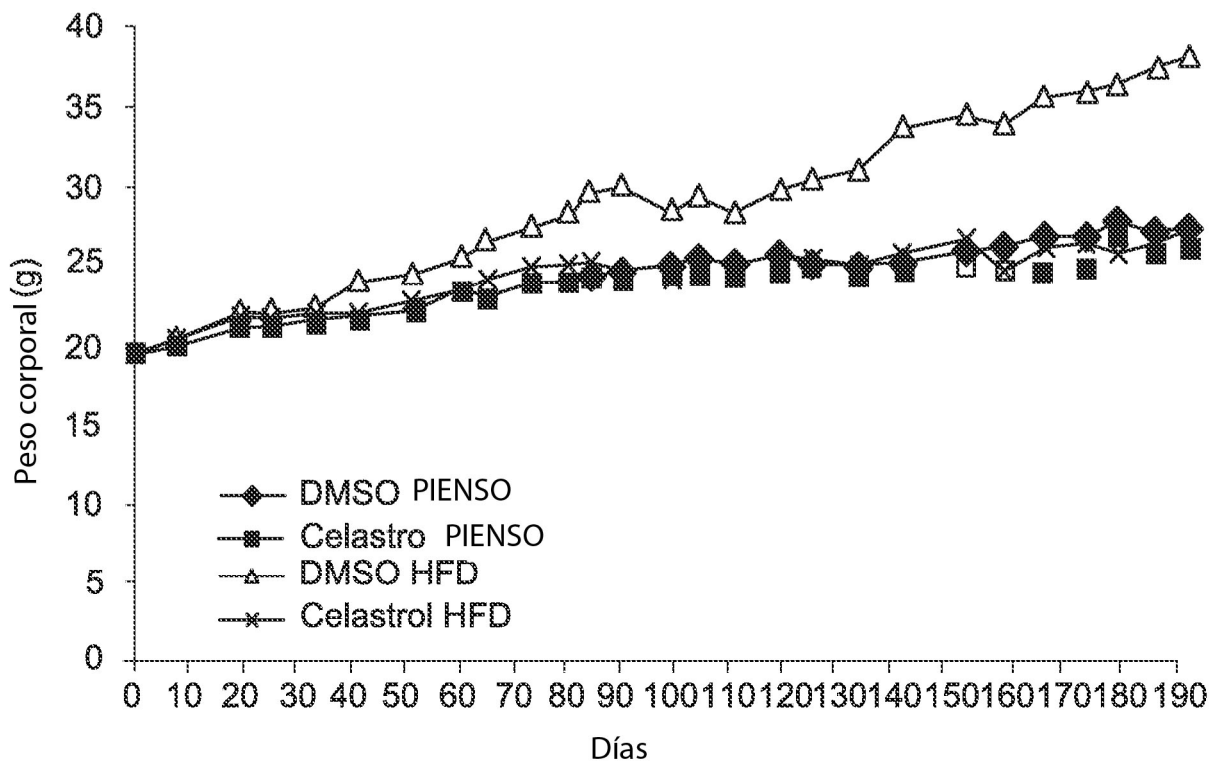
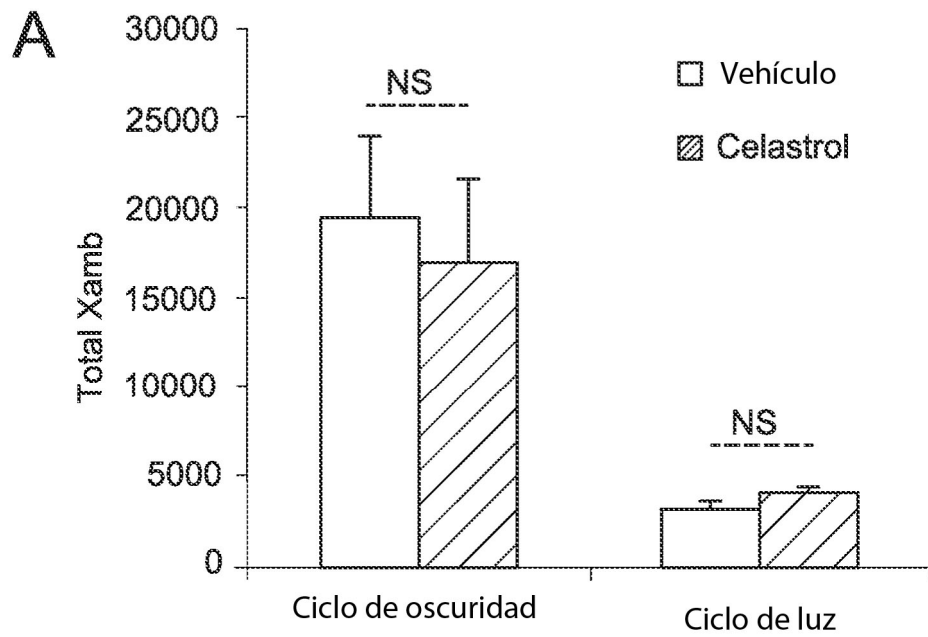
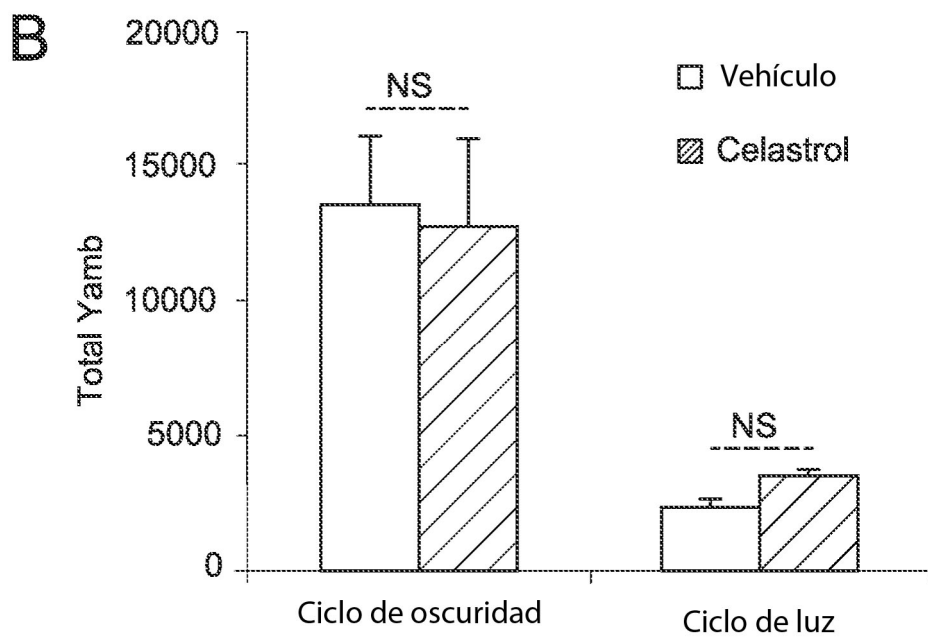


FIG. 15



**FIG. 16A**



**FIG. 16B**