

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 511**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61P 5/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2019** **PCT/KR2019/003527**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2020** **WO20196946**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2019** **E 19922178 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 3785734**

54 Título: **Derivado de GnRH que se une a ácido graso de acción prolongada y composición farmacéutica que comprende el mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2023

73 Titular/es:
NOVEL PHARMA INC. (100.0%)
1901, 36, Teheran-ro 87-gil, Gangnam-gu
Seoul 06164, KR

72 Inventor/es:
JIN, DONG KYU

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 944 511 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

Derivado de GnRH que se une a ácido graso de acción prolongada y composición farmacéutica que comprende el mismo

Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere a novedosos derivados de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) conjugados con ácido graso de acción prolongada y a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

Antecedentes

- 10 En general, una hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o una hormona liberadora de hormona luteinizante es una neurohormona hipotalámica y es un tipo de péptido neuroendocrino. Específicamente, GnRH se sintetiza en las células terminales neurovasculares del hipotálamo y actúa sobre las células gonadotrópicas en la hipófisis anterior para fomentar la síntesis y la liberación de la hormona luteinizante (LH) o de la hormona foliculoestimulante (FSH), que son ambas gonadotropinas. Las hormonas luteinizantes o las hormonas foliculoestimulantes, cuya síntesis y liberación están controladas por GnRH, desempeñan un papel en el control de las hormonas sexuales masculinas y femeninas y en la maduración de las células reproductoras.

- 15 Se sabe que, aunque GnRH tiene el efecto de fomentar la secreción de gonadotropina o la ovulación a concentraciones normales, tiene un efecto inhibitorio antagonista a altas concentraciones, lo que es contradictorio. Puede usarse una dosis alta de GnRH para tratar el cáncer de próstata o el cáncer de mama, que son tumores dependientes de hormonas, así como la endometriosis, los fibromas uterinos, la pubertad precoz central y la adenomiosis, etc. También es ampliamente conocido que GnRH o los derivados de GnRH pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades dependientes de hormonas sexuales (Kumar P. y Sharma A, J Hum Reprod Sci, 2014; 7(3): págs. 170-174).

- 20 En cuanto a los agentes terapéuticos disponibles comercialmente que comprenden GnRH, existen productos de liberación sostenida diseñados para inyectarse cada uno o tres meses, que están en forma de microcápsulas de almacenamiento multinuclear biodegradables (PLGA o PLA) que contienen un agonista de GnRH. Particularmente, está disponible comercialmente un producto de liberación sostenida que comprende un derivado de GnRH con el nombre comercial de Lupron® Depot. Este producto comercial contiene microesferas de PLGA [poli(ácido láctico-co-glicólico)] como componente de liberación sostenida, con el derivado de GnRH de acetato de leuprolida como principio activo. Debido al uso de un polímero biodegradable, Lupron® Depot debe administrarse por vía intramuscular o subcutánea a una dosis grande. A este respecto, se acompaña de dolor o lesión tisular en el sitio de inyección y permanece un bulto en el sitio durante varios meses, con la incidencia ocasional de inflamación, dado que los polímeros biodegradables no se absorben completamente incluso después de un mes. Para Lupron® Depot, estos inconvenientes se atribuyen al hecho de que el polímero biodegradable se añade después de mezclarse físicamente con el derivado de GnRH. Cuando el polímero biodegradable se mezcla físicamente con el derivado de GnRH, el derivado de GnRH queda rodeado por capas del polímero biodegradable. Con la degradación del polímero biodegradable que rodea al derivado de GnRH *in vivo*, se libera el derivado de GnRH, presentando un efecto farmacológico. Mientras tanto, dado que el polímero biodegradable se mezcla físicamente, existe el efecto secundario de que el polímero biodegradable permanece durante mucho tiempo *in vivo* durante la degradación.

- 40 Con el fin de superar estos inconvenientes de Lupron® Depot, aunque se han desarrollado adicionalmente otros productos, incluyendo Eligard®, todavía son desventajosos en cuanto a la liberación inicial del fármaco, la baja estabilidad del fármaco en la fase de disolución mixta, etc. Por tanto, existe una necesidad continua de desarrollar formulaciones o formas de dosificación que permitan el mantenimiento de altos niveles en sangre de GnRH durante un periodo de tiempo prolongado.

- 45 Los productos de liberación sostenida de GnRH existentes, que están destinados a liberar lentamente GnRH en la sangre, contienen componentes de liberación sostenida adicionales para liberar el principio activo durante un periodo de tiempo prolongado. Por consiguiente, aumenta la dosis total de los productos, que conduce a problemas de dolor, sensación residual en el sitio de inyección, baja estabilidad del fármaco, etc. Particularmente, entre los pacientes que habían recibido los productos existentes (acetato de leuprolida), del 23 al 30% de los pacientes se quejaron sobre el dolor en los sitios de inyección (Lee PA *et al.*, J. Clin, Endocrinol Metab, 2014).

- 50 Mientras tanto, la patente estadounidense n.º 9.694.051 da a conocer que un péptido de adrenomedulina conjugado, en el que un resto alquilo se conjuga con lisina (Lys) en los extremos N-terminales de algunos péptidos de adrenomedulina, tiene una semivida en sangre aumentada. Aunque se muestra un aumento en la semivida en sangre del péptido conjugando un resto alquilo con el extremo N-terminal del péptido, el péptido es bastante diferente de GnRH en cuanto a función y secuencia. Además, el péptido difiere de GnRH en que el residuo amino terminal del péptido con el que se conjuga el resto alquilo es lisina.

- 55 En tales circunstancias, el presente inventor se ha esforzado por desarrollar una formulación de GnRH de acción prolongada en la que la propia GnRH tiene una semivida *in vivo* prolongada y una biodisponibilidad aumentada, a diferencia de las formulaciones de liberación sostenida existentes que presentan desventajas debido a los

componentes adicionales o al diseño de formulación para liberación sostenida, etc. Específicamente, se preparó un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada conjugando un ácido graso con un derivado de GnRH que se diseña para tener una semivida *in vivo* aumentada de GnRH y convirtiendo el conjugado en una forma de sal. Se halló que el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada muestra una excelente biodisponibilidad y una semivida *in vivo* prolongada, mantiene un nivel en sangre elevado y tiene un efecto terapéutico sobre enfermedades dependientes de hormonas sexuales o impide la maduración sexual, lo que condujo a la presente divulgación.

Pueden usarse los derivados de GnRH conjugados con ácido graso de acción prolongada según la presente divulgación y una composición farmacéutica que contiene los mismos para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades dependientes de hormonas sexuales o para impedir la maduración sexual.

Sumario

Teniendo en cuenta los problemas anteriores con las formulaciones de liberación sostenida existentes, la presente divulgación tiene como objetivo desarrollar una formulación de GnRH de acción prolongada que tenga una biodisponibilidad aumentada y una semivida *in vivo* de la propia GnRH, que sea tan corta como de 2 a 4 min en sangre circulante. Por tanto, el propósito de la presente divulgación es proporcionar un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada con facilidad de administración y una eficacia mejorada y una composición farmacéutica que contiene el mismo.

Conduciendo a la presente divulgación, la minuciosa investigación, llevada a cabo por el presente inventor, sobre un derivado de GnRH con una biodisponibilidad aumentada y una semivida *in vivo* de la propia GnRH, que tiene una semivida circulante tan corta como de 2 a 4 min en forma natural, dio como resultado el hallazgo de que un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada, que es un derivado de GnRH que tiene un ácido graso conjugado con el mismo, y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tienen una eficacia y una semivida *in vivo* mejoradas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "eficacia mejorada" de un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada significa que tiene un mayor efecto terapéutico sobre enfermedades relacionadas con las hormonas sexuales a la misma concentración que una GnRH natural. Por ejemplo, significa que el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada tiene mayores efectos citotóxicos sobre el cáncer de próstata o el cáncer de mama cuando se administra a la misma dosis que una GnRH natural o un derivado de GnRH disponible comercialmente.

GnRH tiene el efecto de fomentar la liberación de gonadotropinas o la ovulación a concentraciones normales, mientras que tiene efectos inhibidores antagonistas a altas concentraciones, lo que es contradictorio. Por consiguiente, altas concentraciones de GnRH inhiben la progresión de enfermedades agravadas por hormonas sexuales o son eficaces para el alivio y el tratamiento de enfermedades dependientes de hormonas sexuales.

A continuación en el presente documento, se proporcionará una descripción detallada sobre el derivado de GnRH; el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada, que comprende un derivado de GnRH que tiene un ácido graso conjugado con el mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una composición farmacéutica que contiene el mismo según la presente divulgación.

1. Derivados de GnRH conjugados con ácido graso de acción prolongada

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada, que es un derivado de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que tiene un ácido graso conjugado con el mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)" se refiere a una hormona sintetizada en las células terminales neurovasculares del hipotálamo y actúa sobre las células gonadotrópicas en la hipófisis anterior para fomentar la síntesis y la liberación de una hormona luteinizante (LH) o una hormona foliculoestimulante (FSH), que son ambas gonadotrofinas. GnRH puede diferir en cuanto a secuencia de una especie a otra. La GnRH natural de mamífero puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 tal como sigue.

[Secuencia de GnRH de mamífero]

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly (SEQ ID NO: 1)

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado de GnRH" se refiere a una sustancia que es estructuralmente análoga a GnRH, pero puede actuar de manera diferente *in vivo*. En una etapa temprana después de administrarse, el derivado de GnRH, particularmente correspondiente a un agonista de GnRH, se une a un receptor de GnRH para fomentar la síntesis y la secreción *in vivo* de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la

hormona luteinizante (LH) hasta un nivel determinado. Sin embargo, el mantenimiento continuo de la concentración de derivado de GnRH *in vivo* agota las gonadotropinas y regula por disminución el receptor de GnRH, dando como resultado un efecto contradictorio (es decir, efecto antagonista) ya que la síntesis y la secreción de FSH y LH se suprimen bastante. Por tanto, a través de tales efectos, los derivados de GnRH pueden usarse para prevenir o tratar enfermedades dependientes de hormonas sexuales y para impedir la maduración sexual.

En una realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH es un agonista de GnRH, que puede seleccionarse del grupo que consiste en leuprolida, goserelina, triptorelina, nafarelina, buserelina, histrelina, deslorelina, meterelina, gonadorelina y derivados modificados de las mismas.

En otra realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH tiene una secuencia que tiene al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de homología con los agonistas de GnRH existentes.

Particularmente, el derivado de GnRH de la presente divulgación puede tener una secuencia que tiene al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de homología con GnRH natural, leuprolida, goserelina, triptorelina, nafarelina, buserelina, histrelina, deslorelina, meterelina o gonadorelina, y más particularmente una secuencia que tiene al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de homología con GnRH (SEQ ID NO: 1) o leuprolida (SEQ ID NO: 2).

En una realización de la presente divulgación, un derivado de GnRH es una leuprolida modificada en la que el primer aminoácido, ácido glutámico, en la leuprolida se sustituye por un aminoácido diferente, más particularmente por glutamina.

En una realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 a 11.

En una realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH puede significar un derivado que tiene una modificación adicional de la GnRH o del derivado de GnRH existente.

Específicamente, el derivado de GnRH según una realización de la presente divulgación puede ser un derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada, que es un derivado de GnRH que tiene un ácido graso conjugado con el mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Más particularmente, el ácido graso puede conjugarse con el extremo amino terminal del derivado de GnRH.

En una realización de la presente divulgación, el ácido graso puede ser un ácido graso saturado o insaturado de C6 a C30, que puede ser lineal o ramificado. En una realización de la presente divulgación, los ejemplos concretos del ácido graso incluyen, pero no se limitan a, ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecílico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido linoléico, ácido alfa-linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido linoleico (LA), ácido gamma-linoleico (GLA), ácido dihomogamma-linoleico (DGLA), ácido araquidónico (AA), ácido oleico, ácido vacénico, ácido elaídico, ácido eicosanoico, ácido erúxico y ácido nervónico. Siempre que logre el propósito de la presente divulgación, puede emplearse cualquier ácido graso, sin limitaciones. El ácido láurico, también denominado sistemáticamente ácido dodecanoico, es un ácido graso saturado con una cadena normal de 12 átomos de carbono y existe como componente de triglicéridos. Es estructuralmente estable y se encuentra como uno de los principales componentes en la leche materna humana. El ácido graso tiene un punto de fusión de 43,8°C y existe como un sólido blanco a temperatura ambiente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido palmítico” se refiere a un carboxilo de una cadena de hidrocarburo que es un ácido graso saturado normal hidrófobo de 16 átomos de carbono y tiene un grupo carboxilo (-COOH).

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido araquídico” o “ácido eicosanoico” es un ácido graso saturado con una cadena normal de 20 carbonos. Tiene un punto de fusión de 75,5°C y existe como un sólido cristalino blanco a temperatura ambiente.

A través de la conjugación con ácido palmítico, el derivado de GnRH de acción prolongada según una realización de la presente divulgación presenta las siguientes ventajas: i) reabsorción renal y eficiencia de almacenamiento de grasa potenciadas; ii) efecto de protección resultado de la unión aumentada con proteínas séricas; iii) aclaramiento renal retardado resultado de la hidrofobia aumentada de una serie de análogos; y iv) aumento en el tiempo de liberación y en la eficacia farmacéutica resultado de la unión a membranas lipídicas o membranas biológicas.

Se sabe que una emulsión de palmitato de dexametasona en la que el ácido palmítico se conjuga con dexametasona muestra un efecto antiinflamatorio 5,6 veces mayor que la dexametasona sola a la misma dosis (Peng *et al.*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 2010: 36(12)). Los productos de acción prolongada disponibles comercialmente que se formulan por conjugación con ácido graso se ejemplifican mediante INVEGA TRINZA® en el que la paliperidona se conjuga con un ácido graso y Lipotalon® en el que la dexametasona se

conjuga con un ácido graso.

Se sabe que cuando un ácido palmítico se conjuga con hormonas o enzimas, se aumenta la semivida *in vivo* de las hormonas o enzimas debido al mecanismo anterior. Sin embargo, su solubilidad en agua puede disminuirse significativamente debido a la hidrofobia aumentada de la molécula. Además, pueden provocarse la agregación intermolecular en un entorno soluble en agua o enlaces hidrófobos intramoleculares en sitios hidrófobos de la proteína. Por tanto, cuando se conjugan con un ácido graso tal como ácido palmítico, las proteínas pueden presentar la desventaja de disminuciones en la estabilidad de la formulación, la biodisponibilidad y la actividad de proteína.

A este respecto, existe una necesidad de una estrategia de formulación apropiada para aumentar la semivida *in vivo* de proteínas a través de la conjugación con un ácido graso, sin disminuir la eficacia de la proteína específica ni provocar la agregación de proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que una "sal farmacéuticamente aceptable" englobe todas las sales farmacéuticamente aceptables que pueden usarse con el propósito de aumentar la estabilidad, la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, etc., del derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación, sin limitaciones a las mismas.

En una realización de la presente divulgación, la sal farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, sales de amonio, sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos. En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse del grupo que consiste en clorhidrato, bromhidrato, fosfato, metafosfato, nitrato, sulfato, acetato, sulfonato, benzoato, citrato, etanosulfonato, furmarato, lactato, maleato, malato, succinato, tartrato, sal de sodio, sal de calcio, sal de potasio y sal de magnesio.

En una realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de la presente divulgación puede incluir o puede estar compuesto por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 11, en el que ácido láurico, ácido palmítico o ácido araquídico puede conjugarse con el extremo amino terminal del derivado de GnRH, y la sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de sodio o un acetato.

En otra realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso puede incluir o puede estar compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o 4, en el que ácido láurico puede conjugarse con el extremo amino terminal del derivado de GnRH, y la sal farmacéuticamente aceptable puede ser un acetato.

En una realización adicional de la presente divulgación, el derivado de GnRH conjugado con ácido palmítico puede incluir o puede estar compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 10, en el que ácido araquídico puede conjugarse con el extremo amino terminal del derivado de GnRH, y la sal farmacéuticamente aceptable puede ser un acetato.

2. Composiciones farmacéuticas que comprenden el derivado de GnRH conjugado con ácido graso

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada según una realización de la presente divulgación como principio activo.

En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede comprender además una ciclodextrina. A este respecto, la ciclodextrina puede ser α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina y puede ser particularmente metil- β -ciclodextrina. Sin embargo, siempre que logre el propósito de la presente divulgación, puede usarse cualquier ciclodextrina.

En una realización de la presente divulgación, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada puede existir como incluido dentro de una ciclodextrina. A este respecto, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso y la ciclodextrina pueden formar un complejo de inclusión.

En una realización de la presente divulgación, una ciclodextrina puede formar un complejo de inclusión con un principio activo que sea difícil de disolver en agua, dotando de ese modo el principio insoluble en agua de estabilidad, solubilidad mejorada y liberación sostenible en una disolución acuosa. Por tanto, en una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica que comprende un complejo de inclusión del derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada y una ciclodextrina puede mostrar una sostenibilidad mejorada de liberación del derivado de GnRH.

En la presente divulgación, una ciclodextrina es un oligosacárido cíclico no reductor que consiste en un anillo macrocíclico de subunidades de glucosa ($C_6H_{10}O_5$)_n unidas mediante enlaces α -1,4-glicosídicos, denominada α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina para n=6, 7 y 8, respectivamente.

En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede contener una ciclodextrina y el

principio activo, derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada, a una razón molar de desde aproximadamente 7:1 hasta 1:1, desde 6:1 hasta 1:1 o desde 5:1 hasta 1:1. A tales razones en peso, la composición farmacéutica según una realización de la presente divulgación puede mostrar una excelente solubilidad.

5 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación y puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad farmacéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para lograr la eficacia o actividad del derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación.

10 Portadores farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la composición farmacéutica según una realización de la presente divulgación son aquellos habitualmente usados para preparar una formulación, y los ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, pero no se limitan a los mismos.

15 Además de los componentes anteriores, la composición farmacéutica según una realización de la presente divulgación puede comprender además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares.

20 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral. Particularmente, para vías de inyección, puede administrarse en una forma de dosificación o bien de inyección subcutánea o bien de inyección intramuscular. Una forma de dosificación puede seleccionarse teniendo en cuenta diversos factores, tales como el efecto de controlar las concentraciones *in vivo*.

25 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse en la forma de dosificación de una inyección, una pasta, un agente gelificante, una loción, una cápsula, un comprimido, un líquido, una suspensión, un pulverizador, un inhalador, un colirio, un adhesivo o un parche, y particularmente una inyección.

30 En una realización de la presente divulgación, la dosificación adecuada de la composición farmacéutica varía dependiente de factores que incluyen el método de formulación, el método de dosificación, la edad, el peso corporal, el género y morbilidad del paciente, la alimentación, el momento de administración, la vía administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta. La composición farmacéutica de la presente divulgación se administra generalmente a una dosis de 0,001 a 100 mg/kg para un adulto. La composición farmacéutica comprende el derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 30 mg/ml.

35 En una realización de la presente divulgación, se pretende que el término “aproximadamente” cubra un error permisible para un proceso o un ajuste numérico que se encuentra dentro del espíritu técnico de la presente divulgación. Por ejemplo, el término “aproximadamente” se refiere a un término relativo que indica una aproximación de $\pm 10\%$ del valor nominal al que se refiere, en una realización, de $\pm 5\%$, y en otra realización, de $\pm 2\%$. Para el campo de esta divulgación, este nivel de aproximación es apropiado a menos que se indique específicamente que el valor requiere un intervalo más estrecho.

40 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica se formula usando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, según un método que puede llevarse a cabo fácilmente por un experto habitual en la técnica. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede prepararse en una forma de dosificación unitaria o puede insertarse en un recipiente de múltiples dosis. A este respecto, la formulación puede estar en forma de una disolución, una suspensión, un jarabe o una emulsión en un medio oleaginoso o acuoso o en forma de un extracto, polvo, gránulos, un comprimido o una cápsula, y puede comprender además un dispersante o un estabilizador.

45 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede usarse para la prevención o el tratamiento de una enfermedad dependiente de hormonas sexuales o para impedir la maduración sexual. La enfermedad dependiente de hormonas sexuales puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, endometriosis, fibroma uterino, poliquistosis ovárica, pubertad precoz central, hipertricosis, adenoma hipofisario gonadotrópico, apnea del sueño, síndrome del intestino irritable, síndrome premenstrual, hiperplasia prostática benigna y anticoncepción, pero no se limita a los mismos.

50 En una realización de la presente divulgación, cuando se usa en combinación con un polímero biodegradable convencional, la composición farmacéutica puede mostrar una semivida *in vivo* notablemente excelente. Por consiguiente, la composición farmacéutica según una realización de la presente divulgación puede comprender además polímeros biodegradables.

55 En una realización de la presente divulgación, el polímero biodegradable permite que el fármaco se administre por vías parenterales a través del cuerpo, o permite que el polímero que comprende el derivado de GnRH de la presente

divulgación o una sal del mismo actúe por vía tópica sobre un sitio específico. Con respecto al polímero biodegradable en la presente divulgación, puede hacerse referencia a Chasin M *et al.* ("Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", Nueva York, Marcel Dekker, 1990) o D. Wescman *et al.* ("Handbook of Biodegradable Polymers", Taylor y Francis, 1998), sin limitaciones a los mismos.

- 5 A modo de ejemplo, el polímero biodegradable según una realización de la presente divulgación puede ser PLA (poli(ácido láctico)), PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)) lineal o ramificado, PGA (poli(ácido glicólico)), hidrogel, o similares.

- Según un aspecto de la misma, la presente divulgación proporciona además un método y un uso para impedir la maduración sexual o un método y un uso para prevenir o tratar un síntoma o una enfermedad relacionado con hormonas sexuales mediante la administración del derivado de GnRH conjugado con ácido palmítico según una realización de la presente divulgación, una sal del mismo o una composición que contiene el mismo, a mamíferos, incluyendo seres humanos.
- 10

- Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un uso del derivado de GnRH conjugado con ácido graso o una sal del mismo según una realización de la presente divulgación para impedir la maduración sexual o para prevenir o tratar un síntoma o una enfermedad relacionado con hormonas sexuales.
- 15

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para su uso en impedir la maduración sexual o en prevenir o tratar un síntoma o una enfermedad relacionado con hormonas sexuales, comprendiendo la composición el derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación, una sal del mismo, o ambos.

- 20 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un uso del derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación o una sal del mismo para preparar una composición farmacéutica (o un medicamento) para impedir la maduración sexual o para prevenir o tratar un síntoma o una enfermedad relacionado con hormonas sexuales.

- 25 Se espera que la excelente biodisponibilidad y la semivida *in vivo* aumentada mediante el novedoso derivado de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) conjugado con ácido graso de acción prolongada según una realización de la presente divulgación contribuyan en gran medida a la reducción en la dosificación y la frecuencia de dosificación. Particularmente, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada puede superar los problemas de las formulaciones de GnRH de liberación sostenida existentes, tales como los efectos adversos de sensación residual y dolor en el sitio de inyección.

- 30 Además, el derivado de GnRH conjugado con ácido graso de acción prolongada y la composición farmacéutica que comprende el mismo según una realización de la presente divulgación muestran efectos terapéuticos notablemente excelentes sobre enfermedades dependientes de hormonas sexuales y, de este modo, se espera que contribuyan en gran medida a la reducción en la dosificación y la frecuencia de dosificación.

Breve descripción de dibujos

- 35 La figura 1 muestra imágenes en las que las extensiones de suspensiones formadas por composiciones farmacéuticas (ejemplos 9, 10, 15 y 16) que comprenden derivados de GnRH conjugados con ácido graso (ejemplos 1, 2, 7 y 8) según una realización de la presente divulgación y ciclodextrina se visualizan a simple vista.

- La figura 2 muestra imágenes en las que las extensiones de suspensiones formadas por composiciones farmacéuticas (ejemplos 11 a 14) que comprenden derivados de GnRH conjugados con ácido graso (ejemplos 3 a 6) según una realización de la presente divulgación y ciclodextrina se visualizan a simple vista.
- 40

La figura 3 es un gráfico que muestra la viabilidad celular (%) de la línea celular de cáncer de próstata DU-145 después del tratamiento con composiciones de los ejemplos y los ejemplos comparativos, en comparación con el control negativo de metil-β-ciclodextrina al 1%.

- 45 La figura 4 es un gráfico que muestra la viabilidad celular (%) de la línea celular de cáncer de próstata PC3 después del tratamiento con composiciones de los ejemplos y los ejemplos comparativos, en comparación con el control negativo de metil-β-ciclodextrina al 1%.

La figura 5 es un gráfico que muestra la viabilidad celular (%) de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP después del tratamiento con composiciones de los ejemplos y los ejemplos comparativos, en comparación con el control negativo de metil-β-ciclodextrina al 1%.

- 50 La figura 6 muestra imágenes de ecografía de ovario de control sin tratar y control al que se le administró β-ciclodextrina después de la tinción.

La figura 7 muestra imágenes de ecografía de ovario de grupos que se tiñeron después de la administración a los mismos de composiciones farmacéuticas (ejemplos 9 y 10) que comprenden derivados de GnRH conjugados con

ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 1 y 2).

La figura 8 muestra imágenes de ecografía de ovario de grupos que se tiñeron después de la administración a los mismos de composiciones farmacéuticas (ejemplos 13 y 14) que comprenden derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 5 y 6).

- 5 La figura 9 muestra imágenes de ecografía de ovario de grupos que se tiñeron después de la administración a los mismos de composiciones farmacéuticas (ejemplos 15 y 16) que comprenden derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 7 y 8).

- 10 La figura 10 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* aumentada de derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación, en la que la concentración en sangre se representa gráficamente frente al tiempo después de que los fármacos de control (ejemplos comparativos 1 y 4) y los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación se administren cada uno por vía subcutánea una vez a una dosis de 12,5 mg/kg a animales (ratas).

- 15 La figura 11 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* aumentada de derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación, en la que la concentración en sangre se representa gráficamente frente al tiempo después de que la formulación de fármaco de control acetato de leuprolida para administración de un día (ejemplo comparativo 1) y los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 4 y 6) se administren cada uno por vía subcutánea una vez a una dosis de 12,5 mg/kg a animales (ratas).

- 20 La figura 12 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* aumentada de derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación, en la que la concentración en sangre se representa gráficamente frente al tiempo después de que la formulación de fármaco de control Leuprolide Depot para administración de un día (ejemplo comparativo 4) y los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 4 y 6) se administren cada uno por vía subcutánea una vez a una dosis de 12,5 mg/kg a animales (ratas).

25 Descripción detallada

A continuación en el presente documento, se describirán las realizaciones de la presente divulgación haciendo referencia a los ejemplos de preparación y los ejemplos, que se exponen para ilustrar la presente divulgación.

EJEMPLO DE PREPARACIÓN 1: Preparación de derivados de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

La GnRH de mamífero natural tiene la siguiente secuencia.

- 30 [Secuencia de GnRH de mamífero]

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly (SEQ ID NO: 1)

Se usó Leuprolide® que tiene la secuencia de GnRH de mamífero con la D-Leu sustituida en lugar de Gly en la posición 6 y la des-Gly sustituida en lugar de Gly en la posición 10 como estructura principal para el derivado y el derivado conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación.

- 35 [Secuencia de leuprolida]

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH₂ (SEQ ID NO: 2)

Se prepararon derivados en los que el glutamato en la posición 1 de la secuencia de leuprolida permanece sin sustituir o se sustituyó por glutamina de la siguiente manera.

A modo de referencia, se proporciona la secuencia de triptorelina tal como sigue:

- 40 [Secuencia de triptorelina]

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (SEQ ID NO: 3)

(1) Método de preparación para péptidos de derivado de GnRH

- 45 Los derivados se sintetizan usando un método general de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) con Fmoc/tBu, en el que los grupos α -amino de los residuos de aminoácido están protegidos por el grupo lábil básico de Fmoc (cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo) mientras que los grupos laterales están protegidos por un grupo lábil ácido. En el método de síntesis de péptidos en fase sólida que comprende las siguientes etapas, una cadena peptídica se extiende secuencialmente mediante escisión de Fmoc y acoplamiento de aminoácido repetitivos.

- ① Cargar Fmoc-aminoácido sobre una resina (Fmoc-Pro-tritil-resina);
- ② Retirar el grupo protector Fmoc a partir de la Fmoc-AA-resina (piperidina al 20%/DMF);
- ③ Lavar con DMF;
- ④ Unir un aminoácido después de la activación (DIC/HOBt usado);
- 5 ⑤ Lavar con DMF;
- ⑥ Repetir las etapas ② a ⑤ para unir aminoácidos secuencialmente;
- ⑦ Retirar la resina sólo a partir del péptido sintetizado (TFA al 1,5%/DCM);
- ⑧ Unir etilamina al extremo amino terminal del péptido resultante (usando HCl de EDC/HOAt); y
- 10 ⑨ Realizar una escisión general de cadenas laterales protegidas a partir del péptido resultante (TFA al 92,5%/TIS al 2,5%/EDT al 2,5%/H₂O al 2,5%).

Según el método de preparación anterior, se prepararon derivados que tenían las secuencias descritas en la tabla 2. Se conjugó ácido láurico, ácido palmítico o ácido araquídico con el extremo amino terminal del derivado de GnRH obtenido, tal como se indica en la tabla 2. La conjugación de un ácido graso con el extremo amino terminal del derivado se llevó a cabo de la misma manera que la conjugación de aminoácidos generales. La síntesis de los derivados de GnRH de los ejemplos comparativos y los ejemplos fue encomendada a Anygen Co. Ltd.

(2) Purificación de péptidos de derivado de GnRH

Tras la escisión con TFA, se purificó el péptido usando una columna C18 en el sistema Shimadzu HPLC 10AVP en condiciones de HPLC (tampón A: TFA al 0,05%/H₂O, tampón B: TFA al 0,05%/acetonitrilo, velocidad de flujo: 1 ml/min, longitud de onda: 230 nm). Los resultados de purificación en cada ejemplo fueron encomendados a, y obtenidos de, Anygen Co. Ltd. y se muestran en la tabla 1. En la tabla 1, los derivados de GnRH del ejemplo 1 (L1), el ejemplo 3 (P1), el ejemplo 5 (P3) y el ejemplo 7 (A1) tienen glutamato como residuo de aminoácido en la posición 1, mientras que los derivados de GnRH del ejemplo 2 (L2), el ejemplo 4 (P2), el ejemplo 6 (P4) y el ejemplo 8 (A2) tienen glutamina como residuo de aminoácido en la posición 1 (véase la tabla 2).

TABLA 1

Derivado de GnRH	Pureza (%)	EM	
		Calc. (Da)	Hallada (Da)
Ejemplo 1 (L1)	98,4	1409,7	1409,6
Ejemplo 2 (L2)	99,0	1408,7	1409,0
Ejemplo 3 (P1)	98,2	1465,8	1465,7
Ejemplo 4 (P2)	98,2	1464,8	1464,9
Ejemplo 5 (P3)	98,1	1465,8	1465,5
Ejemplo 6 (P4)	98,3	1464,8	1464,0
Ejemplo 7 (A1)	98,9	1521,7	1521,1
Ejemplo 8 (A2)	98,8	1520,7	1520,9

25 El ácido láurico, el ácido palmítico y el ácido araquídico son ligeramente solubles en agua y existen como fases sólidas a temperatura ambiente con puntos de fusión respectivos de aproximadamente 43,8°C, aproximadamente 60°C y aproximadamente 75,5°C. Por tanto, dado que los derivados de GnRH conjugados con ácido graso pueden ser poco solubles en agua, se llevó a cabo adicionalmente una adición de sal. Los derivados de GnRH conjugados con ácido graso se sometieron a adición de sal con sal de sodio o acetato para preparar sales de derivado de GnRH conjugado con ácido graso de los ejemplos comparativos 1 a 3 y los ejemplos 1 a 8, tal como se muestra en la tabla 2 a continuación. Estos procedimientos fueron encomendados a Anygen Co. Ltd.

TABLA 2

Derivado	Secuencia de estructura principal/derivado y sal
Ejemplo comparativo 1 (GnRH)	piroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ sal de acetato (SEQ ID NO: 1)
Ejemplo comparativo 2 (leuprolida)	piroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 2)
Ejemplo comparativo 3 (triptorelina)	piroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ sal de acetato (SEQ ID NO: 3)
Ejemplo 1	Ácido láurico-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 4)
Ejemplo 2	Ácido láurico- <u>Gln</u> -His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 5)
Ejemplo 3	Ácido palmítico-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de sodio (SEQ ID NO: 6)
Ejemplo 4	Ácido palmítico- <u>Gln</u> -His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de sodio (SEQ ID NO: 7)
Ejemplo 5	Ácido palmítico-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 8)
Ejemplo 6	Ácido palmítico- <u>Gln</u> -His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 9)
Ejemplo 7	Ácido araquídico-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 10)
Ejemplo 8	Ácido araquídico- <u>Gln</u> -His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt sal de acetato (SEQ ID NO: 11)

EJEMPLO DE PREPARACIÓN 2: Preparación de composición farmacéutica que comprende complejo de inclusión de derivado de GnRH y ciclodextrina

Se disolvió polvo de metil- β -ciclodextrina (SigmaAldrich; n.º de lote: C4555; PM: 1303,311 g/mol) en las cantidades proporcionadas en la tabla 3 en 1 ml de agua destilada terciaria esterilizada.

Se añadieron los derivados de GnRH en las cantidades proporcionadas en la tabla 3 a tubos cónicos de 15 ml respectivos a los que después se les añadió 1 ml de la disolución acuosa de β -ciclodextrina correspondiente a las razones molares de la tabla 3 antes de mezclar durante la noche a temperatura ambiente con la ayuda de un dispositivo rotatorio de baja velocidad. Posteriormente, se recogieron las disoluciones contenidas en los tubos de 15 ml mediante una breve centrifugación y después se transfirieron a tubos de 1,5 ml, seguido de mezclado secundario durante la noche a temperatura ambiente mediante un dispositivo rotatorio de baja velocidad. Finalmente, se obtuvieron composiciones farmacéuticas que contenían, cada una, los principios activos a una concentración de aproximadamente 10 mM. Las composiciones se usaron en los siguientes ejemplos experimentales opcionalmente después de diluirse. Para los ejemplos comparativos 1 a 3, las composiciones se diluyeron hasta 20 mM en agua destilada terciaria.

TABLA 3

	Composición farmacéutica (mg/1 ml)										
				EJEMPLO							
				9	10	11	12	13	14	15	16
Derivado de GnRH	Ejemplo comp.			Ejemplo							
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8
	24 mg	24 mg	24 mg	14 mg	14 mg	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg
Metil- β -ciclodextrina	-	-	-	13 mg	13 mg	13 mg	65 mg	13 mg	65 mg	13 mg	13 mg
Razón molar (ciclodextrina:derivado de GnRH)	-	-	-	1:1	1:1	1:1	5:1	1:1	5:1	1:1	1:1

Se llevaron a cabo los siguientes ejemplos experimentales con las composiciones farmacéuticas.

[EJEMPLO EXPERIMENTAL 1] Evaluación de complejo de inclusión de derivado de GnRH conjugado con ácido graso y ciclodextrina

Para su uso como control, se preparó una disolución de 13 mg de polvo de metil- β -ciclodextrina en 1 ml de agua destilada terciaria estéril de la misma manera que en el ejemplo de preparación 2 en un tubo de 1,5 ml (concentración: 10 mM).

El control preparado, y las composiciones de los ejemplos 9 a 16 finalmente preparadas mediante mezclado en tubos de 1,5 ml, se observaron a simple vista. Se centrifugaron a 10.000 rpm durante de 40 segundos a 50 segundos (menos de 1 minuto) y se observaron de nuevo a simple vista para evaluar la solubilidad. Los resultados de los ejemplos 9, 10, 15 y 16 se representan en la figura 1 y los resultados de los ejemplos 11 a 14 se representan en la figura 2. Tal como puede observarse en la figura 1, se observó que las composiciones de los ejemplos 9 y 10 que contienen los derivados de GnRH conjugados con ácido láurico (ejemplos 1 y 2) y las composiciones de los ejemplos 15 y 16 que contienen los derivados de GnRH conjugados con ácido araquídico (ejemplos 7 y 8) existían como suspensiones en las que los principios activos (complejos de inclusión de derivados de GnRH y ciclodextrina) se dispersaron bien en el disolvente agua destilada estéril antes de la centrifugación. Este fenómeno también se observó en las composiciones después de la centrifugación.

Tal como se muestra en la figura 2, también se observó que las composiciones de los ejemplos 11 a 14 que contienen los derivados de GnRH conjugados con ácido palmítico (ejemplos 3 a 6) existían como suspensiones en las que los principios activos (complejos de inclusión de derivados de GnRH y ciclodextrina) se dispersaron bien en el disolvente agua destilada estéril antes y después de la centrifugación.

Tal como implican los resultados, las composiciones farmacéuticas que contienen derivados de GnRH y ciclodextrina según una realización de la presente invención existen como suspensiones en las que los principios se suspenden bien, logrando de ese modo los efectos y propósitos de agentes de liberación sostenida o de acción prolongada.

[EJEMPLO EXPERIMENTAL 2] Ensayo de viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata

Los derivados de GnRH se aplican clínicamente a la terapia de enfermedades incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, endometriosis, pubertad precoz central, y similares. Por tanto, diferentes líneas celulares de cáncer de próstata (líneas celulares DU-145, PC3 y LNCaP) se cultivaron cada una en un medio RPMI 1640 (que contenía FBS al 10%, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales al 1%) en un matraz T75 y se cultivaron a 37°C bajo una atmósfera del 5% de CO₂/el 95% de aire en una incubadora estéril. Se realizó un ensayo de viabilidad celular usando el kit de recuento de células 8 (CCK-8, fabricado por DOJINDO). Cada una de las líneas celulares se separó del matraz T75 mediante tripsinización y se transfirió a placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10⁴ células/ml para DU-145 y a una densidad de 1×10⁵ células/ml para PC3 y LNCaP, seguido de incubación durante una hora para la unión.

Posteriormente, cada línea celular se trató con 100 µM y 200 µM de cada uno de los derivados de los ejemplos comparativos 1 a 3 y los ejemplos 9 a 16 y el control. Brevemente, se usó metil-β-ciclodextrina al 1% como control negativo para la viabilidad celular, mientras que dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% sirvió como control positivo. Después de 48 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo existente y se aplicaron 100 µl de medio de cultivo nuevo y 10 µl de disolución de CCK-8 a cada línea celular. De nuevo, después de 48 horas de incubación, se reemplazó la disolución de medio por 100 µl de medio de cultivo nuevo y 10 µl de disolución de CCK-8. Las células se incubaron durante 4 horas y después se midió la absorbancia a 450 nm para evaluar la viabilidad celular. Los resultados de medición se proporcionan en las tablas 4 a 6 y en las figuras 3 a 5.

TABLA 4

Derivado	Conc. de tratamiento (µM)	Viabilidad de DU-145 con respecto al control negativo de metil-β-ciclodextrina al 1% (%)	Significación estadística
Ejemplo 9	100	50,00 ± 0,63	< 0,01
	200	30,80 ± 0,66	< 0,01
Ejemplo 10	100	36,40 ± 6,64	< 0,01
	200	25,40 ± 3,96	< 0,01
Ejemplo 11	100	47,25 ± 2,50	< 0,02
	200	35,25 ± 0,25	< 0,01
Ejemplo 12	100	36,75 ± 1,11	< 0,01
	200	33,50 ± 0,50	< 0,01
Ejemplo 13	100	81,50 ± 1,44	< 0,01
	200	41,75 ± 1,18	< 0,01
Ejemplo 14	100	38,50 ± 0,29	< 0,01
	200	32,00 ± 0,71	< 0,01
Ejemplo 15	100	68,25 ± 0,95	< 0,01
	200	51,25 ± 2,95	< 0,01
Ejemplo 16	100	50,25 ± 3,35	< 0,01
	200	39,00 ± 2,27	< 0,01

Ejemplo comp. 1	100	$107,50 \pm 2,56$	no significativo (N.S)
	200	$101,08 \pm 3,26$	N.S
Ejemplo comp. 2	100	$99,42 \pm 2,06$	N.S
	200	$100,17 \pm 3,07$	N.S
Ejemplo comp. 3	100	$100,92 \pm 2,98$	N.S
	200	$94,27 \pm 3,47$	N.S
Control positivo (SDS al 0,1%)		$18,18 \pm 2,32$	< 0,01

TABLA 5

Derivado	Conc. de tratamiento (μ M)	Viabilidad de PC3 con respecto al control negativo de metil- β -ciclodextrina al 1% (%)	Significación estadística
Ejemplo 9	100	$41,00 \pm 4,36$	< 0,02
	200	$39,00 \pm 4,73$	< 0,02
Ejemplo 10	100	$41,00 \pm 1,53$	< 0,02
	200	$23,00 \pm 5,51$	< 0,02
Ejemplo 11	100	$65,60 \pm 1,69$	< 0,01
	200	$29,80 \pm 2,54$	< 0,01
Ejemplo 12	100	$29,20 \pm 3,04$	< 0,01
	200	$19,20 \pm 1,93$	< 0,01
Ejemplo 13	100	$99,60 \pm 5,84$	N.S
	200	$104,60 \pm 3,52$	N.S
Ejemplo 14	100	$90,80 \pm 4,04$	N.S
	200	$54,80 \pm 3,93$	< 0,01
Ejemplo 15	100	$72,50 \pm 5,33$	< 0,02
	200	$63,75 \pm 5,56$	< 0,02
Ejemplo 16	100	$45,75 \pm 5,41$	< 0,02
	200	$41,33 \pm 3,38$	< 0,02
Ejemplo comp. 1	100	$105,44 \pm 1,76$	N.S
	200	$100,11 \pm 1,82$	N.S

Ejemplo comp. 2	100	104,22 ± 3,15	N.S
	200	104,11 ± 2,66	N.S
Ejemplo comp. 3	100	99,67 ± 3,17	N.S
	200	95,44 ± 4,03	N.S
Control positivo (SDS al 0,1%)		15,11 ± 1,72	< 0,01

TABLA 6

Derivado	Conc. de tratamiento (μM)	Viabilidad de LNCaP con respecto al control negativo de metil-β-ciclodextrina al 1% (%)	Significación estadística
Ejemplo 9	100	91,33 ± 10,73	N.S
	200	45,33 ± 5,61	< 0,02
Ejemplo 10	100	28,33 ± 3,18	< 0,02
	200	22,33 ± 2,33	< 0,02
Ejemplo 11	100	37,00 ± 0,58	< 0,02
	200	30,67 ± 0,67	< 0,02
Ejemplo 12	100	29,67 ± 1,20	< 0,02
	200	30,33 ± 0,88	< 0,02
Ejemplo 13	100	72,33 ± 5,84	< 0,02
	200	66,33 ± 5,24	< 0,02
Ejemplo 14	100	33,00 ± 1,53	< 0,02
	200	30,33 ± 0,67	< 0,02
Ejemplo 15	100	64,25 ± 3,52	< 0,02
	200	36,50 ± 1,94	< 0,02
Ejemplo 16	100	18,25 ± 0,63	< 0,02
	200	18,50 ± 0,50	< 0,02
Ejemplo comp. 1	100	105,64 ± 4,03	N.S
	200	93,64 ± 4,20	N.S
Ejemplo comp. 2	100	99,22 ± 6,11	N.S
	200	84,78 ± 6,16	N.S

Ejemplo comp. 3	100	92,89 ± 4,33	N.S
	200	90,22 ± 4,03	N.S
Control positivo (SDS al 0,1%)		20,45 ± 1,58	< 0,01

Con referencia a las tablas 4 a 6 y a las figuras 3 a 5, las composiciones farmacéuticas (ejemplos 9 a 16) que comprenden el derivado de GnRH conjugado con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 1 a 8) mostraron efectos impredeciblemente excelentes, en comparación con GnRH natural (ejemplo comparativo 1) y los derivados de GnRH disponibles comercialmente (ejemplos comparativos 2 y 3).

- 5 En detalle, la línea celular de próstata DU-145 sobrevivió a las composiciones de los ejemplos comparativos 1 a 3 sustancialmente a las mismas tasas que el control negativo. Sólo la composición del ejemplo comparativo 3 permitió una viabilidad de aproximadamente el 94% de las células. En cambio, las composiciones según una realización de la presente divulgación redujeron la viabilidad celular hasta al menos aproximadamente el 80% y hasta
- 10 aproximadamente el 25%, en comparación con el control negativo. Las viabilidades celulares notablemente reducidas por las composiciones según una realización de la presente divulgación fueron estadísticamente significativas.

- Para las células de cáncer de próstata PC3, las composiciones de los ejemplos comparativos 1 a 3 mostraron un ligero efecto reductor sobre la viabilidad celular. Sólo la triptorelina del ejemplo comparativo 3 permitió
- 15 aproximadamente el 95% de la viabilidad celular. En cambio, las composiciones según una realización de la presente divulgación mostraron una reducción muy significativa en la viabilidad celular. Entre otras, la composición del ejemplo 12 mostró una viabilidad celular muy reducida, en comparación con las de los ejemplos comparativos. Particularmente, la composición del ejemplo 12 redujo la viabilidad celular hasta un grado similar al que logró el control positivo.

- 20 Cuando se aplicaron a una concentración de 200 µM a células LNCaP, las composiciones de los ejemplos comparativos 1, 2 y 3 permitieron viabilidades celulares de aproximadamente el 93%, aproximadamente el 85% y aproximadamente el 90%, respectivamente. Sin embargo, las composiciones según una realización de la presente divulgación mostraron efectos de muerte celular muy altos, en comparación con las composiciones de los ejemplos comparativos. Particularmente, se halló que el efecto de muerte celular era similar entre la composición del ejemplo 10 y el control positivo y mayor en la composición del ejemplo 16 que el control positivo.

- 25 Según los datos experimentales de las tres líneas celulares de cáncer de próstata diferentes, las composiciones de los ejemplos 10, 12, 14 y 16 que comprenden los derivados de los ejemplos 2, 4, 6 y 8 en los que el aminoácido en la posición 1 se sustituye de ácido glutámico a glutamina fueron superiores en cuanto a efecto de muerte celular que las de los ejemplos 9, 11, 13 y 15 que comprenden los derivados de los ejemplos 1, 3, 5 y 7 en los que el aminoácido en la posición 1 permanece intacto. Estos datos indican que los derivados de GnRH caracterizados por
- 30 sustitución de aminoácido en la posición 1, conjugación con ácido graso y conversión en sal según una realización de la presente divulgación muestran un efecto de muerte celular de cáncer de próstata impredeciblemente excelente.

[EJEMPLO EXPERIMENTAL 3] Ensayo de cambio morfológico en ovario

- 35 Se llevaron a cabo experimentos para examinar si los derivados de GnRH conjugados con ácido graso mantienen o no las características funcionales y provoquen en un cambio morfológico en el ovario.

Las composiciones farmacéuticas de los ejemplos 9, 10, 13, 14, 15 y 16 se inyectaron cada una por vía subcutánea a una dosis única de 12,5 mg/kg una vez en la parte posterior del cuello de ratas hembra de 9 semanas de edad. Las ratas a las que no se les administraron fármacos se usaron como control sin tratar, mientras que se inyectó una disolución acuosa de 3 mg de metil-β-ciclodextrina a un control negativo. Cada grupo consistía en 3 ratas.

- 40 El día 28 después de la inyección, las ratas se sometieron a una autopsia para extirpar los ovarios que después se tiñeron con hematoxilina-eosina (tinte H&E). Se observaron los ovarios teñidos para determinar el cambio histológico y la anomalía patógena.

Brevemente, los ovarios se tiñeron con H&E y se observaron de la siguiente manera.

- 45 1. Inmediatamente después de la autopsia, se fijó el tejido (ovario) extirpado durante 12 horas en una disolución de fijación.
2. Se lavó el tejido suficientemente fijado con agua para retirar el reactivo de fijación.
3. Para su uso en la incrustación en parafina, se deshidrató el tejido de ovario con alcoholes graduados. La

deshidratación se llevó a cabo en una serie de alcoholes gradualmente graduados comenzando desde una baja concentración hasta concentraciones más altas y finalmente con benceno y alcohol puro al 100%.

4. Se permitió que una disolución de parafina en benceno se infiltrara en el tejido de ovario deshidratado que después se trató con parafina pura en estado líquido a una alta temperatura (60°C) para la infiltración completa de la parafina en el tejido.
5. Se cortó el tejido incrustado en parafina para dar bloques de tamaños adecuados y después se cortaron a un grosor de 4 µm con un microtomo.
6. Se montó el tejido cortado en un portaobjetos de vidrio y se desparafinizó con un disolvente orgánico tal como xileno.
7. Se hidrató el portaobjetos que tenía el tejido unido al mismo mediante tratamiento con una serie de alcoholes desde altas hasta bajas concentraciones.
8. Se aplicó en primer lugar una disolución acuosa de hematoxilina para teñir de azul el núcleo y otras estructuras ácidas (estructuras ricas en ARN, etc.).
9. En segundo lugar se tiñeron de rojo diversas sustancias y orgánulos en el citoplasma y la matriz extracelular con eosina.
10. Después de completarse la tinción, se deshidrató la muestra con alcoholes graduados y después se cubrió con un cubreobjetos usando un adhesivo tal como una resina (bálsamo o una resina sintética). Este procedimiento se denomina montaje.
11. Después de terminar los procedimientos anteriores, se escanearon los portaobjetos con muestra usando un escáner de portaobjetos ScanScope® AT (Aperio) y se analizaron las imágenes así almacenadas usando el programa ImageScope (Aperio). Las imágenes escaneadas se representan en las figuras 6 a 9.

Resultados

En ratas hembra, un ciclo estral de diestro, proestro, estro y metestro dura de aproximadamente 4 a 5 días, cambiando los morfológicos del ovario en función de las fases estrales.

- 25 Se sabe que, cuando se administra a ratas, un agonista de GnRH reduce la formación de folículos secundarios y folículos de Graaf (véase: Mohammadbeigi *et al.*, Short-term Administration of Gonadotropin-releasing Hormone Agonist (Buserelin) Induces Apoptosis in Rat Ovarian Developmental Follicles, julio de 2016). En este experimento, los folículos secundarios y de Graaf en las imágenes de ovario en cada grupo de tratamiento se indicaron mediante flechas para examinar si el número de folículos se reduce o no.
- 30 Haciendo referencia a la figura 6, había presentes muchos folículos secundarios o de Graaf en el grupo sin tratar y en el grupo al que se le inyectó metil-β-ciclodextrina tal como se indica mediante las flechas. En cambio, tal como se muestra en las figuras 7 a 9, los números de folículos secundarios o de Graaf disminuyeron en los grupos de ratas a los que se les administraron los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación (ejemplos 1, 2, 5, 6, 7 y 8). En el grupo al que se le administraron los derivados de los ejemplos, se halló abundante cuerpo lúteo y no se formaron muchos folículos primordiales o folículos primarios multilaminares.
- 35 A partir de los datos, se entiende que los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación tienen un efecto ventajoso, específicamente, un efecto de impedir la maduración sexual en ratas.
- 40 Además, la observación de una reducción en el número de folículos secundarios o de Graaf incluso 28 días después de la dosis única indica que los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación o los complejos de inclusión de los derivados y ciclodextrina muestran una liberación sostenida y, como tal, pueden usarse como formulaciones de acción prolongada.

[EJEMPLO EXPERIMENTAL 4] Medición de la tasa de aumento de la semivida *in vivo*

- 45 El presente inventor llevó a cabo experimentos con animales (ratas SD hembra, de nueve semanas de edad) para examinar las semividas *in vivo* aumentadas de los derivados de GnRH conjugados con ácido graso preparados. Brevemente, se administraron por vía subcutánea formulación de leuprolida para administración de un día (n=6), formulación de depósito de acetato de leuprolida para administración de un mes (3,75 mg/mes; n=7) y el derivado del ejemplo 4 (n=6) o el derivado del ejemplo 6 (n=6) una vez a una dosis de 12,5 mg/kg a ratas de cada grupo,
- 50 seguido de la monitorización de las concentraciones en sangre a lo largo del tiempo. Se usó DMSO (dimetilsulfóxido) como disolvente según fuera necesario. Antes de la administración y a las 0,5, 1, 2 y 6 horas y en los días 1, 3, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la administración, se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola de las ratas y se midieron las concentraciones en sangre de leuprolida y de los derivados de los ejemplos, usando CL/EMEM. Si la

concentración alcanzaba aproximadamente 4 ng/ml en un punto de tiempo específico, no se realizaron mediciones adicionales para el siguiente punto de tiempo.

Los resultados experimentales se resumen tal como sigue. En la siguiente tabla, la unidad numérica es ng/ml.

TABLA 7

Tiempo	Ejemplo comp. 1 (formulación de 1 día de acetato de leuprolida)		Ejemplo comp. 4 (formulación de 1 mes de acetato de leuprolida (3,75 mg))		Ejemplo 4 (P2; Pal_[Q1]GnRH)		Ejemplo 6 (P4; Pal_[Q1] GnRH_AcOH)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 h	1020	177	133	54,1	11,8	4,362	6,51	2,30
1 h	769	572	164	89,1	16,9	3,16	9,22	2,57
2 h	228	267	93,0	51,5	29,1	4,97	18,6	2,83
6 h	2,88	4,09	19,6	7,04	52,2	14,1	45,7	12,0
1 día	-	-	19,0	7,49	45,0	6,07	23,2	6,75
3 días	-	-	7,47	3,45	21,4	2,73	9,60	1,58
7 días	-	-	5,24	1,72	11,9	2,86	7,20	1,79
10 días	-	-	10,8	2,89	8,18	2,83	8,20	3,80
14 días	-	-	15,1	5,01	4,35	1,67	4,58	1,88
21 días	-	-	4,73	4,15	-	-	1,26	0,72
28 días	-	-	1,47	1,77	-	-	-	-

- 5 Los resultados de medición se representan gráficamente en las figuras 10 a 12. Basándose en los resultados, se llevó a cabo un análisis farmacocinético calculando la semivida ($t_{1/2}$), la tasa de aclaramiento (CL), el volumen de distribución (Vd), el tiempo hasta alcanzar la concentración máxima tras la administración de fármaco ($T_{m\acute{a}x}$), la concentración máxima tras la administración de fármaco ($C_{m\acute{a}x}$) y la exposición sistémica al fármaco (AUCt). Los resultados de análisis son los siguientes.

TABLA 8

	Ejemplo comp. 1	Ejemplo comp. 4	Ejemplo 4	Ejemplo 6
$t_{1/2}$ [día]	0,03	4,17	4,80	4,03
CL [(mg/kg)/(ng/ml)/día]	0,180	0,049	0,051	0,075
Vd [(mg/kg)/(ng/ml)]	0,007	0,296	0,351	0,436
$T_{m\acute{a}x}$ [día]	0,02	0,04	0,25	0,25
$C_{m\acute{a}x}$ [ng/ml]	1020,0	164,0	52,2	45,7
AUCt [ng/ml*d]	69,21	245,22	216,24	159,51

Tal como puede entenderse a partir de los datos, los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación son significativamente superiores a la leuprolida (ejemplo comparativo 1) en cuanto a semivida *in vivo*, tasa de aclaramiento, volumen de distribución y exposición sistémica (AUCt). Además, se halló que los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación tenían niveles similares de semivida, tasa de aclaramiento y exposición sistémica (AUCt) a los de la formulación de leuprolida existente para administración de un mes que contiene un polímero biodegradable físicamente mezclado y particularmente presentaban un volumen de distribución superior, un tiempo retardado hasta alcanzar la concentración máxima tras la administración de fármaco y una concentración máxima reducida durante un periodo de tiempo prolongado, en comparación con el producto disponible comercialmente. En conjunto, los datos demuestran que los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación permiten que GnRH mantenga una concentración adecuada durante un periodo de tiempo prolongado *in vivo*.

A la luz de las excelentes propiedades de los mismos, los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación pueden usarse a un volumen notablemente reducido, en comparación con los productos existentes en los que se mezclan polímeros biodegradables con derivados de GnRH para lograr una liberación sostenida y, por tanto, pueden superar la desventaja del dolor y excluyen el efecto secundario de que el polímero biodegradable permanezca *in vivo* durante un largo periodo de tiempo. Estas propiedades son ventajosas particularmente para niños. Además, al tener una excelente sostenibilidad de liberación, los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación pueden mostrar excelentes efectos de destruir las células de cáncer de próstata así como de impedir la maduración sexual reduciendo los números de folículos secundarios o de Graaf en el ovario, tal como se identifica en los ejemplos experimentales 2 y 3.

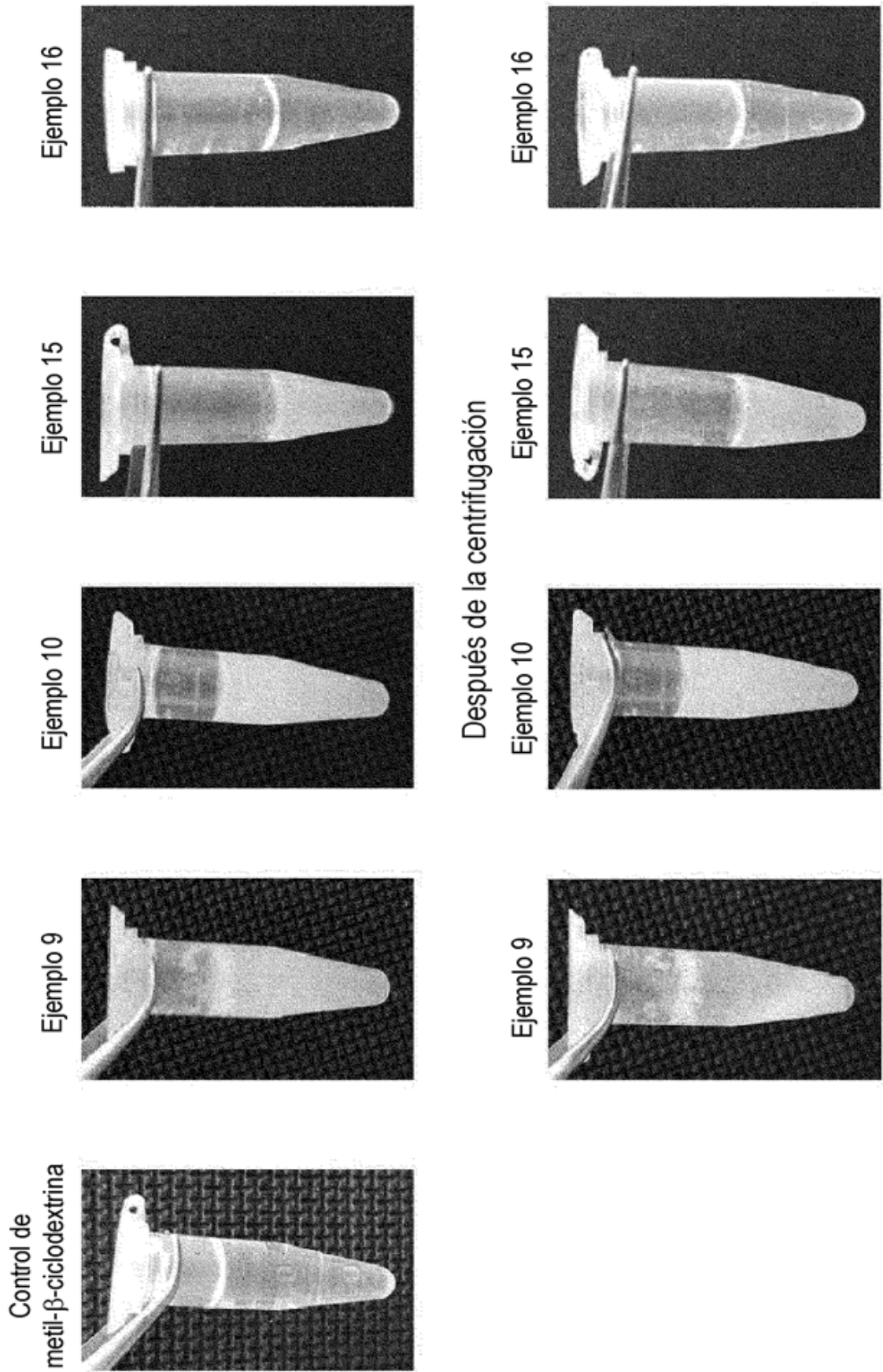
Mientras tanto, cuando los derivados de GnRH conjugados con ácido graso según una realización de la presente divulgación se usaron en combinación con el polímero biodegradable usado en los productos convencionales, la semivida aumenta notablemente, en comparación con fármacos convencionales tales como la leuprolida, hasta llegar a ser tan larga como la de los fármacos usados en métodos invasivos (cirugía), tal como para implantes (de varios meses a un año).

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad dependiente de hormonas sexuales, en la que la composición farmacéutica que comprende:
 - 5 un derivado de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) conjugado con ácido graso de acción prolongada en la que el derivado de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se conjuga con un ácido graso, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo; y
 - ciclodextrina,
 - 10 en la que un grupo carboxilo del ácido graso del derivado de GnRH se conjuga a través de un enlace peptídico con el extremo amino terminal de la porción peptídica del derivado de GnRH,
 - 15 en la que el derivado de GnRH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y las SEQ ID NO: 4 a 11, preferiblemente, el derivado de GnRH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 11, más preferiblemente el derivado de GnRH comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5 u 11,
 - en la que el derivado de GnRH conjugado con ácido graso y la ciclodextrina existen juntos como complejo de inclusión,
 - preferiblemente la enfermedad dependiente de hormonas sexuales se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, endometriosis, fibroma uterino, poliquistosis ovárica, pubertad precoz central, hipertricosis, adenoma hipofisario gonadotrópico, apnea del sueño, síndrome del intestino irritable, síndrome premenstrual, hiperplasia prostática benigna y anticoncepción,
 - 20 opcionalmente la composición farmacéutica comprende además un polímero biodegradable.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el ácido graso es un ácido graso C6 a C30,
 - 25 preferiblemente el ácido graso se selecciona del grupo que consiste en ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecilico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido linolénico, ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido linoleico, ácido gamma-linoleico, ácido dihomo-gamma-linoleico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido vacénico, ácido elaídico, ácido eicosanoico, ácido erúcico y ácido nervónico,
 - 30 más preferiblemente el ácido graso es lineal, y ácido láurico, ácido palmítico o ácido araquídico.
3. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, sales de amonio, sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos,
 - 35 preferiblemente la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato, bromhidrato, fosfato, metafosfato, nitrato, sulfato, acetato, sulfonato, benzoato, citrato, etanosulfonato, furmarato, lactato, maleato, malato, succinato, tartrato, sal de sodio, sal de calcio, sal de potasio y sal de magnesio.
4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la ciclodextrina es metil-β-ciclodextrina.
- 40 5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la ciclodextrina y el derivado de GnRH conjugado con ácido graso se usan a una razón molar de 7:1 a 1:1.

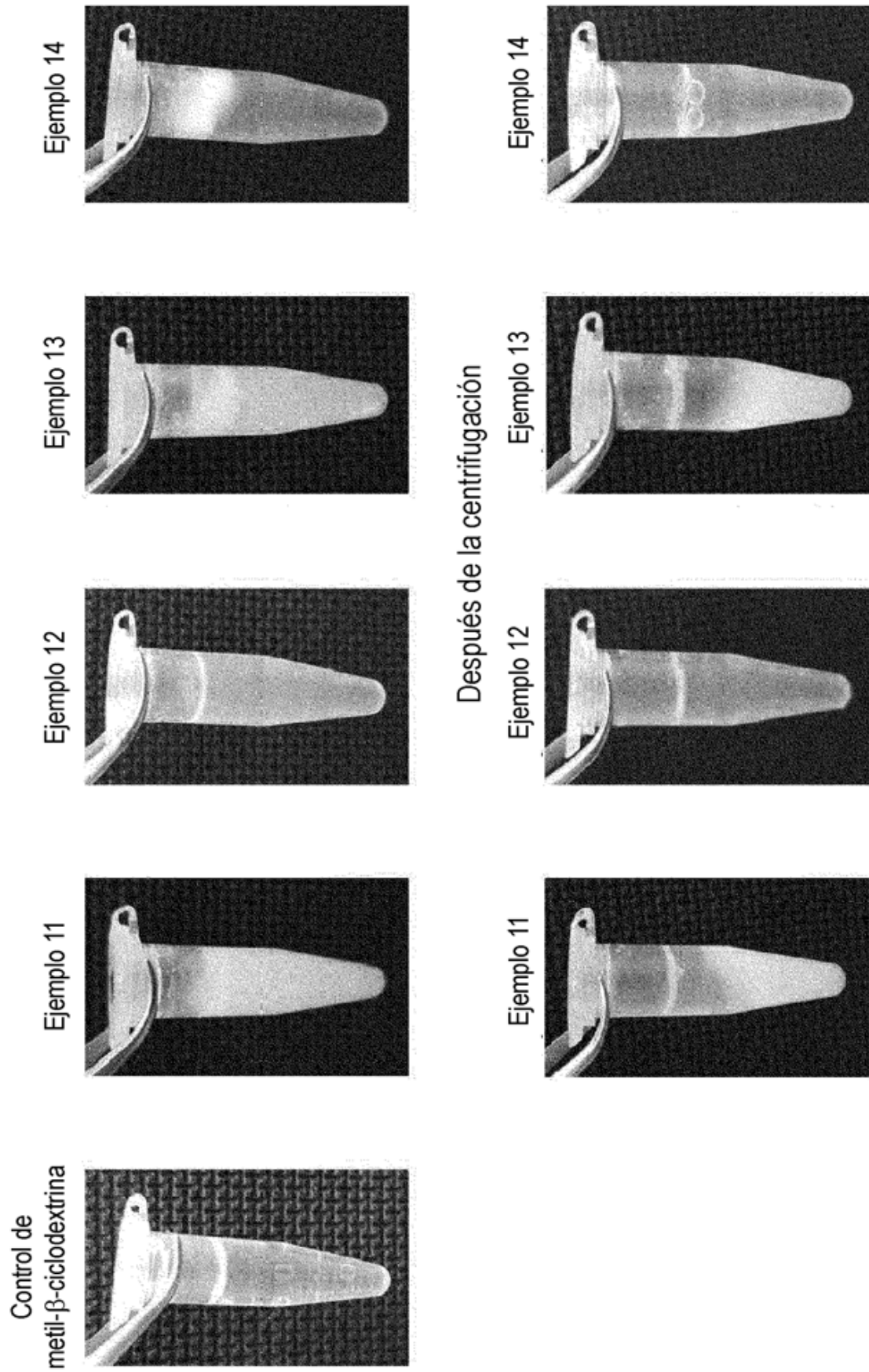
[Figura 1]

FIG. 1

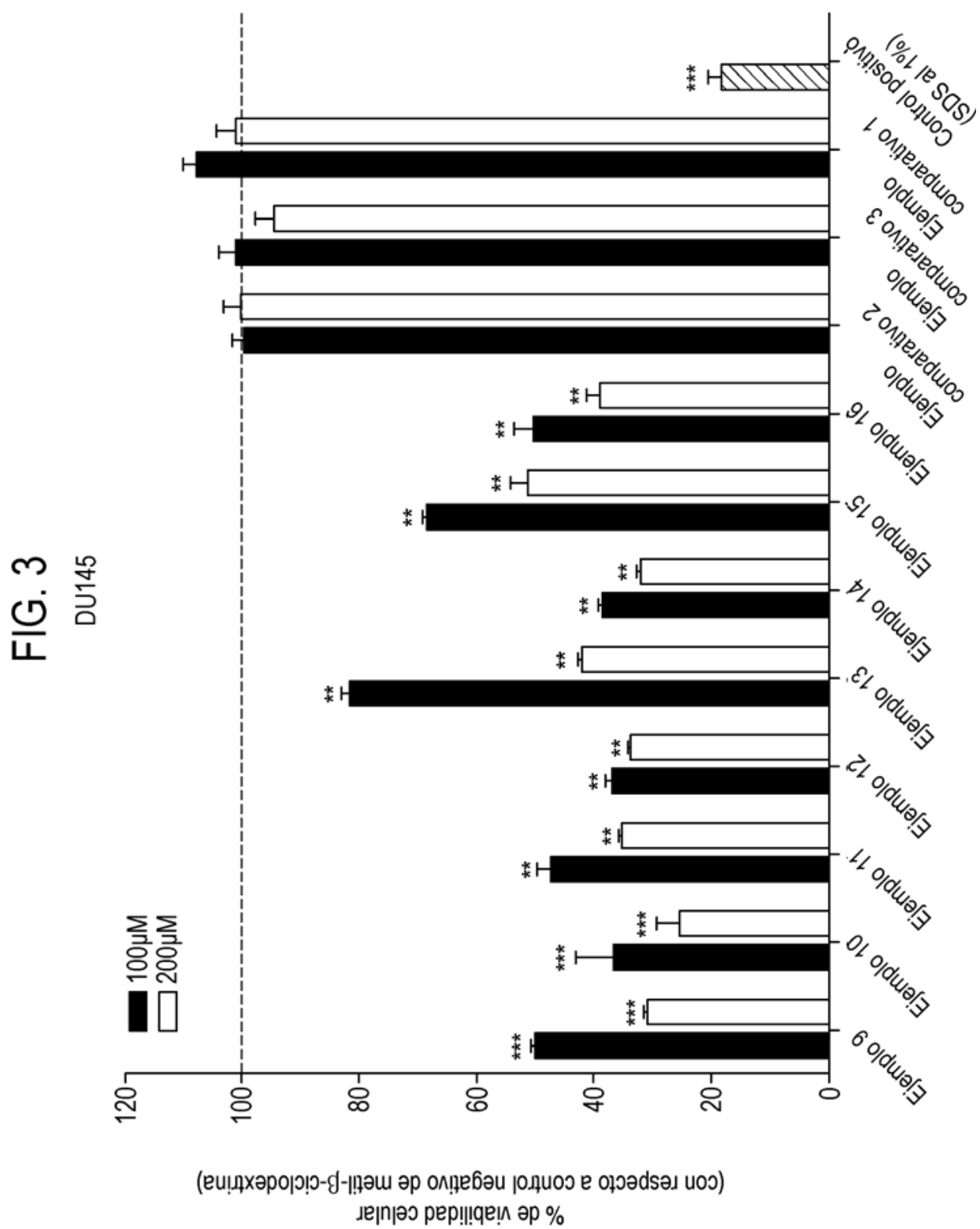


[Figura 2]

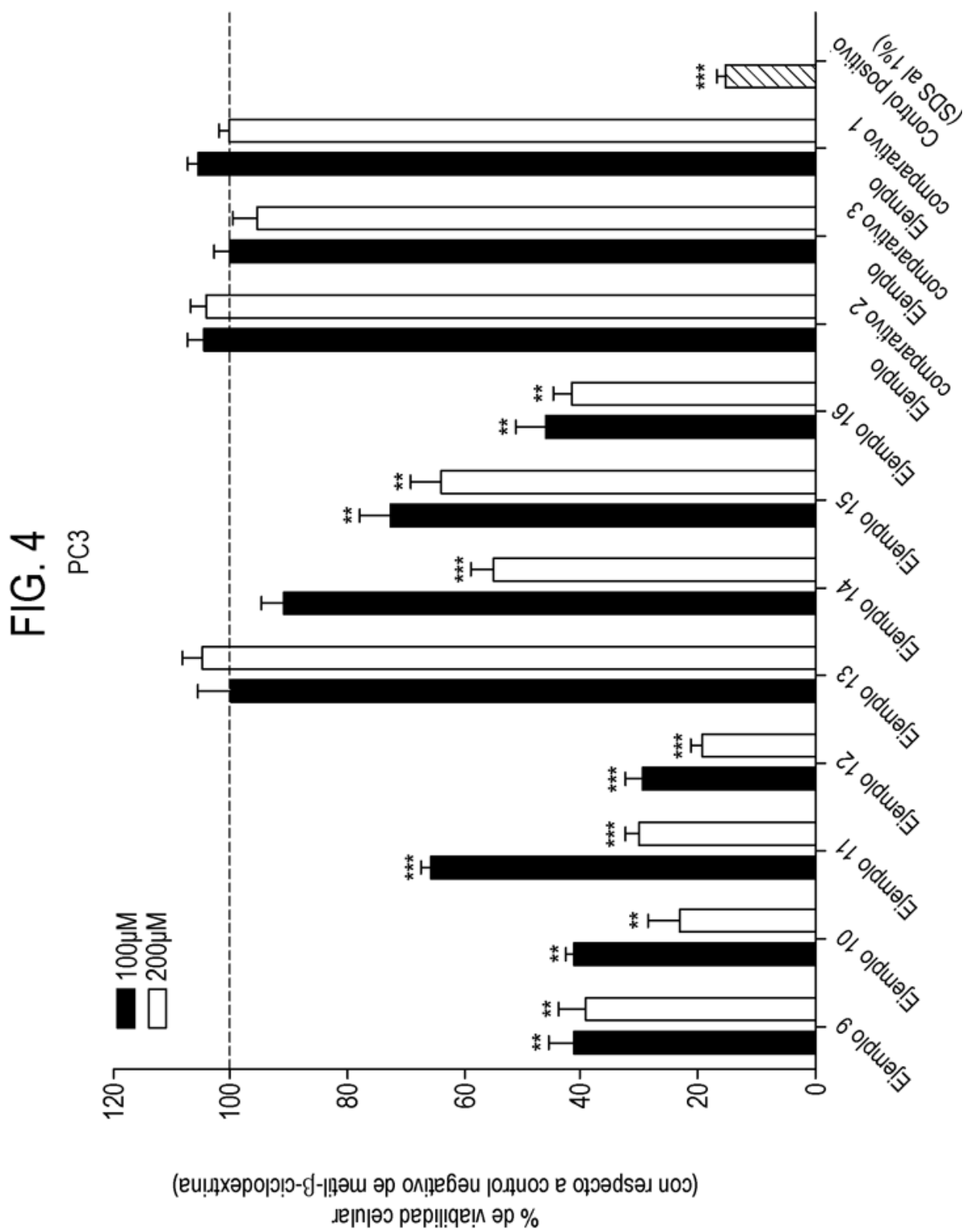
FIG. 2



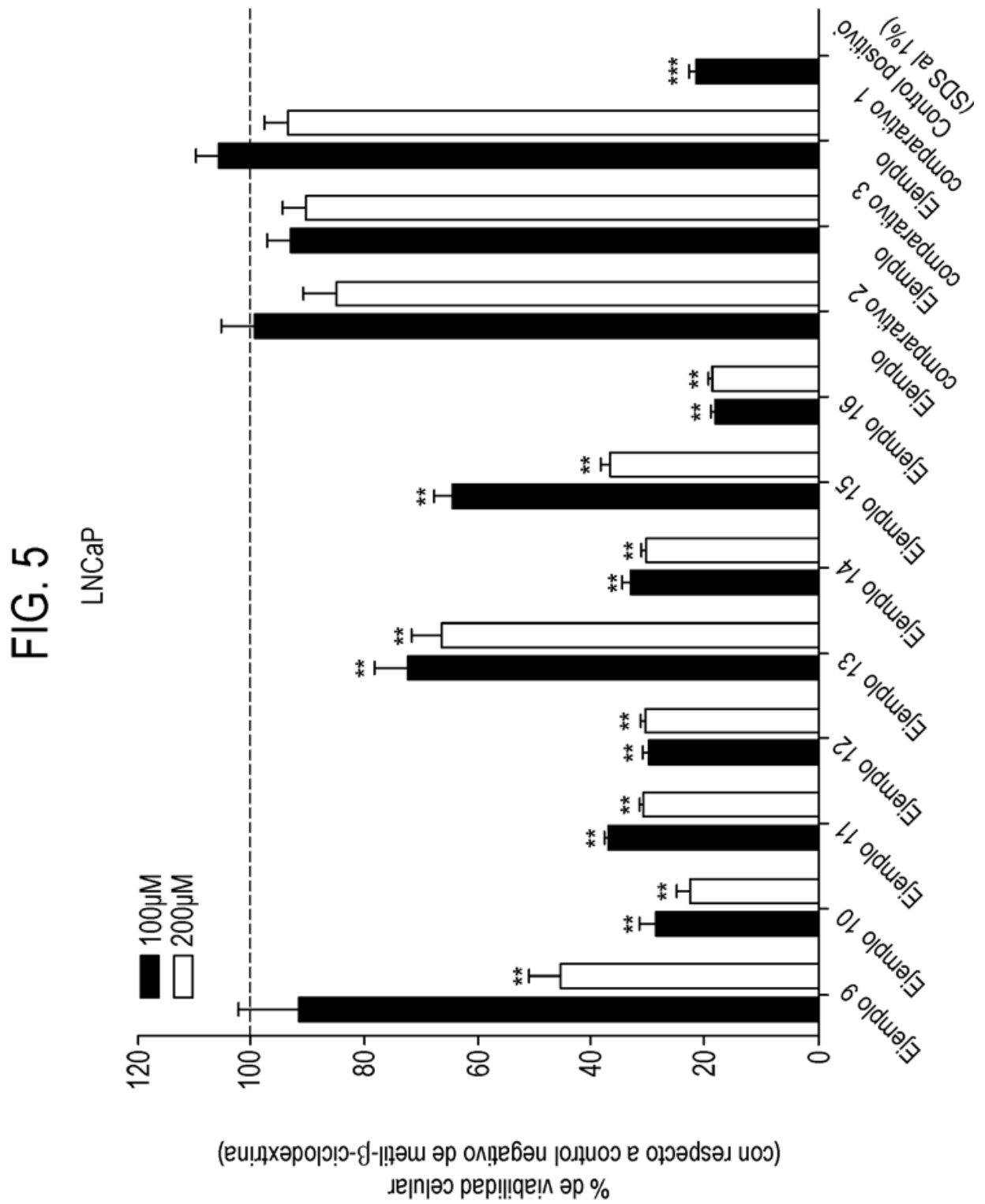
[Figura 3]



[Figura 4]



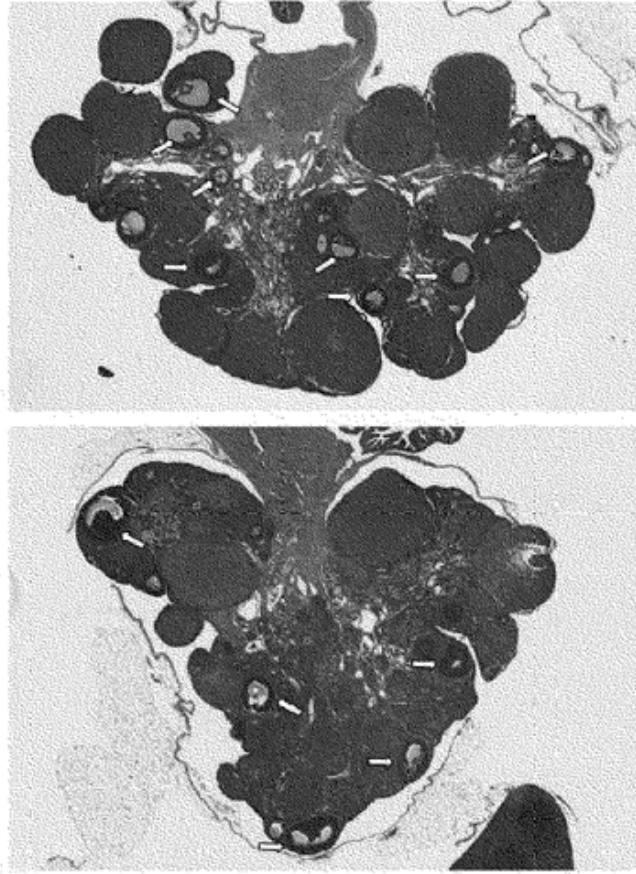
[Figura 5]



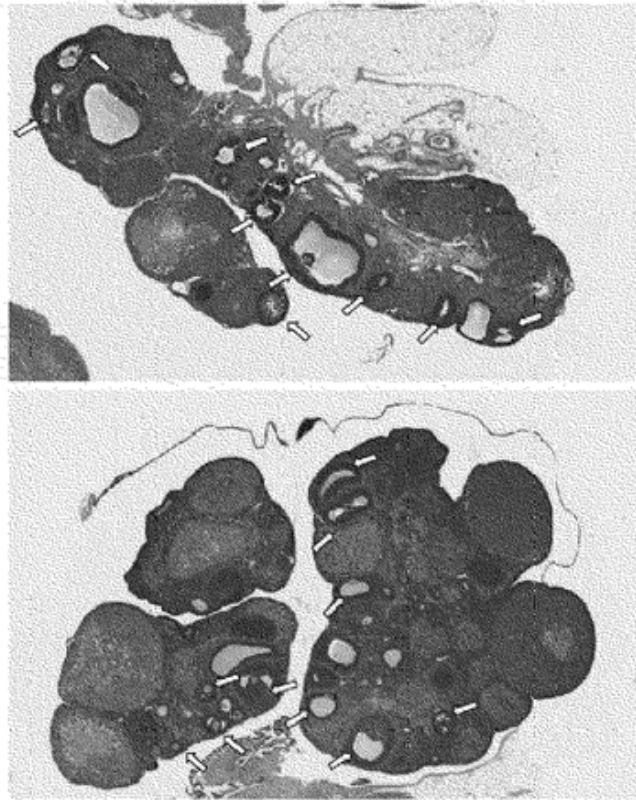
[Figura 6]

FIG. 6

Control al que se le administra metil- β -ciclodextrina



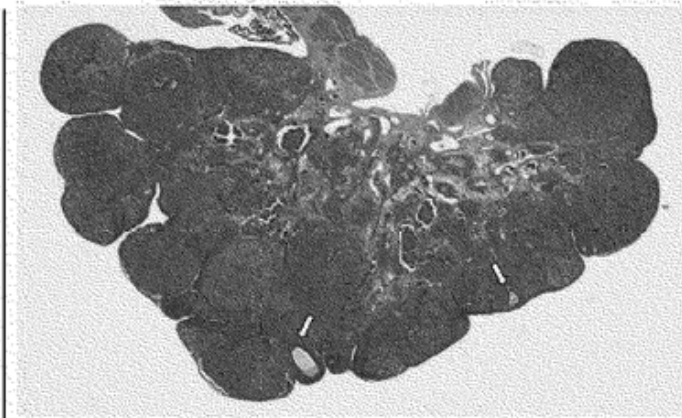
Control sin tratar



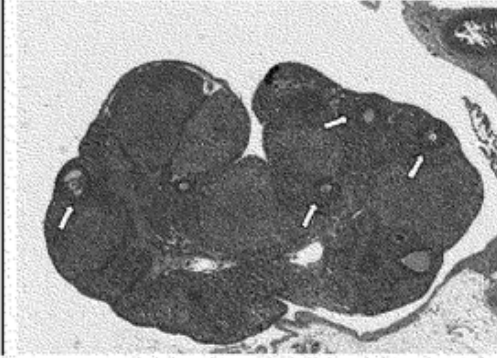
[Figura 7]

FIG. 7

Grupo al que se le administra ejemplo 9



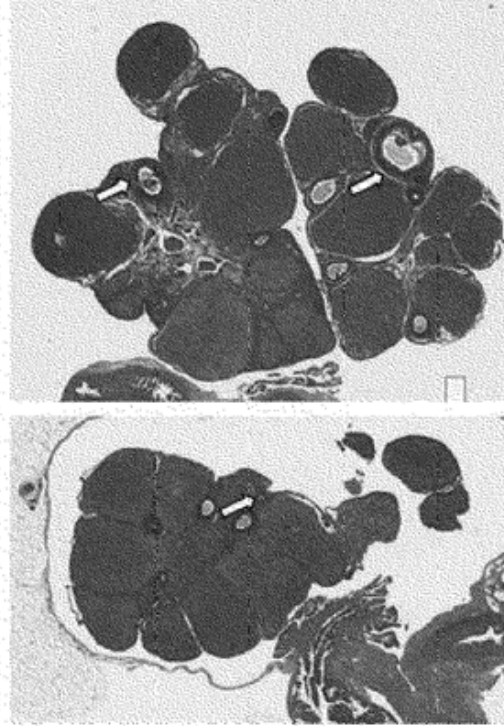
Grupo al que se le administra ejemplo 10



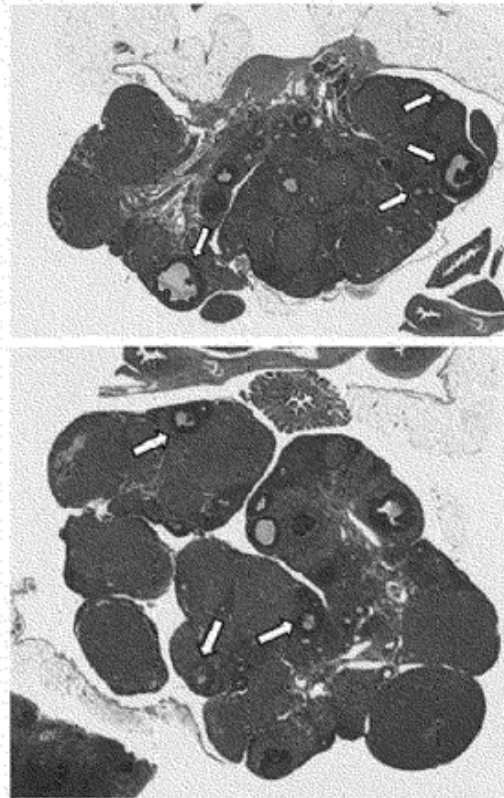
[Figura 8]

FIG. 8

Grupo al que se le administra ejemplo 14



Grupo al que se le administra ejemplo 13

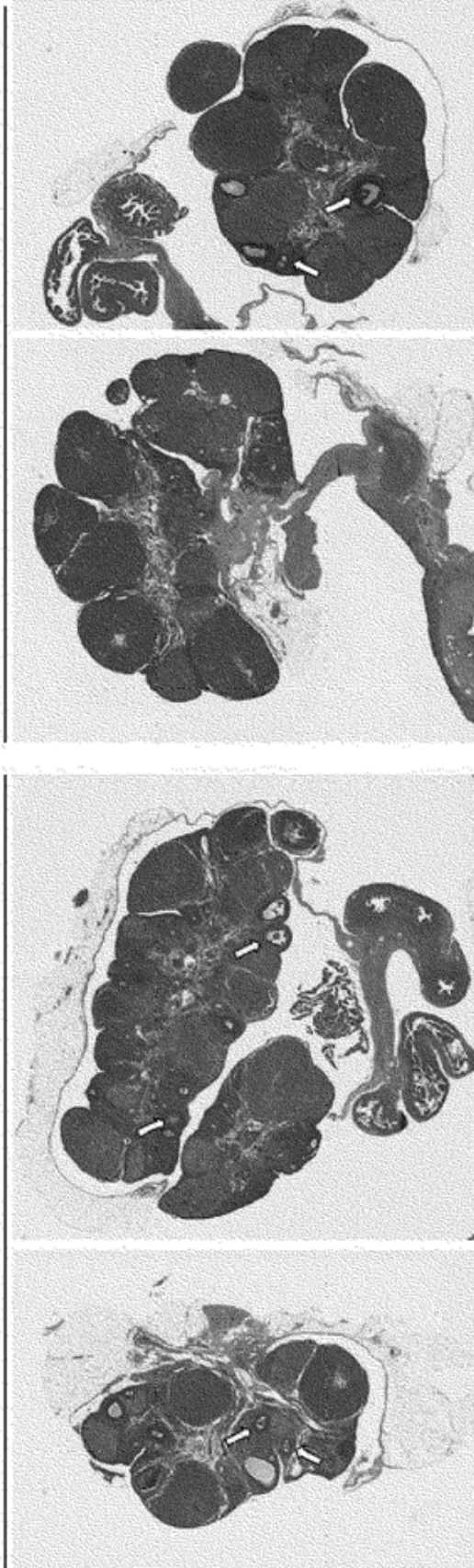


[Figura 9]

FIG. 9

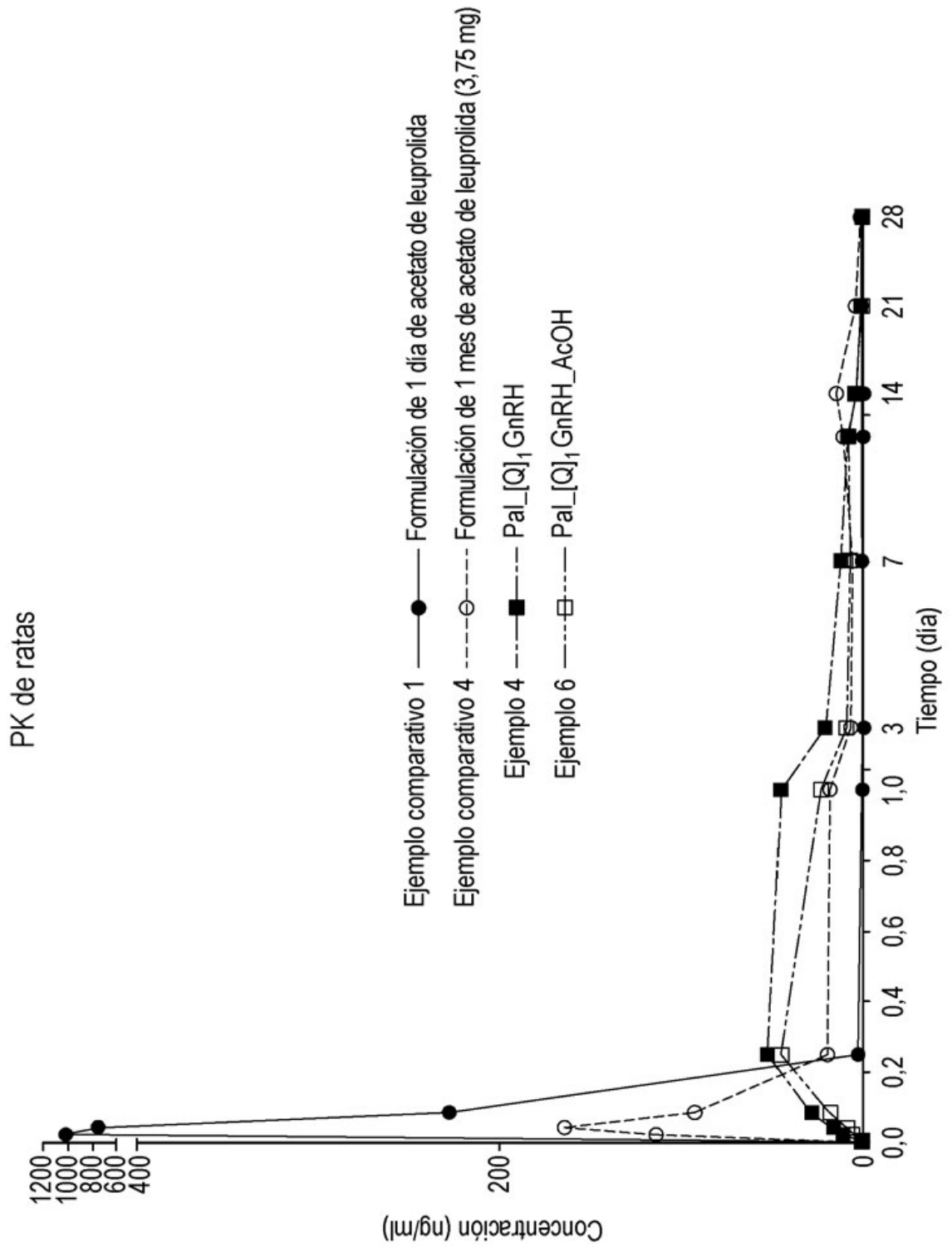
Grupo al que se le administra ejemplo 15

Grupo al que se le administra ejemplo 16



[Figura 10]

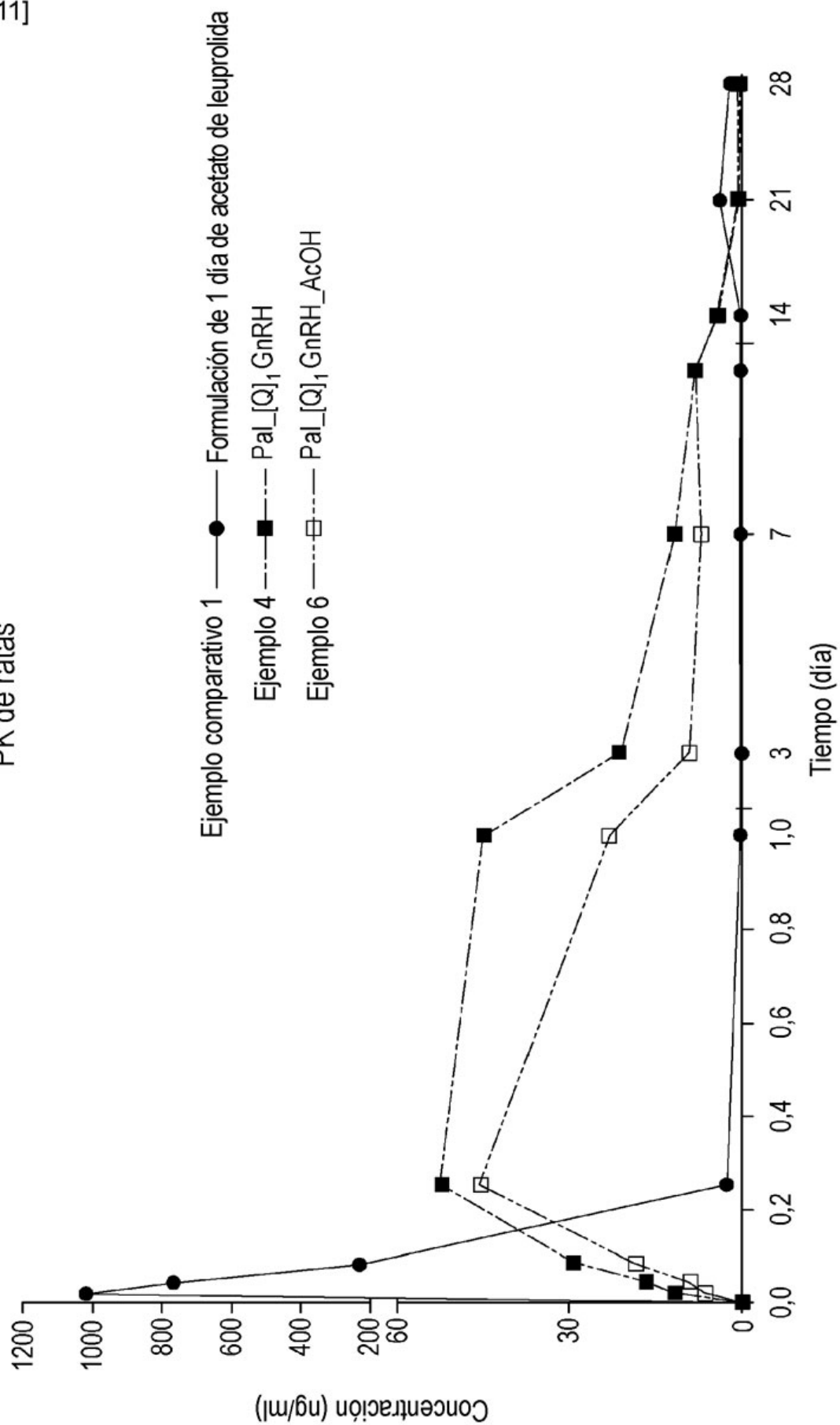
FIG. 10



[Figura 11]

FIG. 11

PK de ratas



[Figura 12]

FIG. 12

