

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 823**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 3/08** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10742073 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2459207**

54 Título: **Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la obesidad, diabetes o para aumentar la sensibilidad a la insulina**

30 Prioridad:

**31.07.2009 BR PI0902481**

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

**13.03.2014**

73 Titular/es:

**SOCIEDADE BENEFICENTE DE SENHORAS  
HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS (100.0%)  
Rua Dona Adma Jafet, 91, Cerqueira César  
01308-050 São Paulo, BR**

72 Inventor/es:

**STERMAN HEIMANN, ANDREA;  
SQUARZONI DALE, CAMILA y  
A. DEVI, LAKSHMI**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 447 823 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

Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la obesidad, diabetes o para aumentar la sensibilidad a la insulina

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende un ingrediente activo que actúa como antagonista o agonista inverso de un receptor acoplado a proteínas G y a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede ser utilizada para el tratamiento de la obesidad. Dicha composición farmacéutica puede ser utilizada también para el tratamiento de la diabetes.

Descripción de la técnica anterior

Las proteínas de guanina que se unen a nucleótidos, que se conocen de otro modo como proteínas G, están involucradas en la transmisión de señales químicas desde fuera de la célula al interior de la misma poniendo en marcha una serie de reacciones bioquímicas que finalmente llevan a cabo cambios fisiológicos dentro de la célula. Los receptores acoplados a las proteínas G son receptores transmembrana que detectan moléculas fuera de la célula y activan rutas de transducción de señal y respuestas intracelulares. Es bien sabido que los receptores acoplados a proteínas G están involucrados en la regulación de muchas enfermedades.

Los receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2, a los cuales se hará referencia a continuación como CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, son receptores acoplados a proteínas G que se encuentran en los tejidos de los mamíferos. Los receptores CB<sub>1</sub> son expresados principalmente por neuronas del sistema nervioso central y periférico, mientras que los receptores CB<sub>2</sub> se presentan centralmente y periféricamente, en especial, en células inmunes. Moléculas de señal, se pueden unir a los dos receptores cannabinoides fuera de la célula, provocando una cascada de reacciones bioquímicas dentro de la misma. Por ejemplo, los receptores CB<sub>1</sub> acoplados a través de proteínas G, inhiben la adenilil ciclasa y activan la proteína (MAP) quinasa, activada por mitógenos. Además, los receptores CB<sub>1</sub> inhiben los canales de calcio presinápticos de tipo N- y P/Q- y activan canales de potasio que rectifican hacia dentro. El efecto combinado de estos cambios bioquímicos, genera una serie de efectos fisiológicos, muchos de los cuales están todavía por descubrir.

El descubrimiento de que los tejidos de mamíferos expresan receptores cannabinoides, fue acompañado por el descubrimiento de ligandos endógenos con respecto a estos receptores, llamados endocannabinoides, que junto con CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> constituyen el sistema endocannabinoide. Se descubrió que ciertas alteraciones hacen que aumenten los niveles de endocannabinoides, la densidad de los receptores de cannabinoides y la eficiencia del acoplamiento de los receptores de cannabinoides. Se ha observado que esta regulación ascendente del sistema endocannabinoide suprime frecuentemente síntomas y señales no deseables, sugiriendo que el sistema endocannabinoide es autorregulador.

A efectos de comprender mejor el sistema endocannabinoide, los investigadores han estado desarrollando antagonistas y agonistas inversos con especificidad para CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>. Los agonistas son ligandos de receptores que no provocan respuesta biológica cuando se unen a un receptor, pero que bloquean o debilitan una respuesta mediada por agonista. Por otra parte, los agonistas inversos se unen al mismo receptor como agonista e invierten la actividad de los receptores, o en otras palabras, ejercen un efecto farmacológico opuesto al de un agonista de receptor. El descubrimiento de antagonistas y de agonistas inversos de receptores CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>, es extremadamente importante en el sector de la medicina, dado que existen muchos estados fisiológicos y patofisiológicos significativos en los que se ha demostrado que el sistema endocannabinoide juega un determinado papel. Estos estados comprenden enfermedades del sistema nervioso central, tal como Parkinson, Alzheimer y depresión, así como, enfermedades del sistema nerviosos periférico, tales como, dolores inflamatorios y neuropáticos, obesidad y otras alteraciones alimentarias.

A este respecto, existen diferentes estudios publicados que documentan la importancia de los agonistas o agonistas inversos de uno u otro de los receptores CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>, en el tratamiento profiláctico o combativo de las enfermedades antes mencionadas. Por ejemplo, el documento WO/2006/119260 se refiere a una composición farmacéutica de un antagonista del receptor CB<sub>1</sub> en asociación con un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, que actúa en el intestino para tratar la obesidad o alteraciones alimentarias. El documento WO/2006/100205 se refiere a nuevos moduladores de receptores de cannabinoides y su utilización para tratar enfermedades, tales como dolor, alteraciones neurodegenerativas y alteraciones alimentarias. El documento US/2005/101542 se refiere a otra composición farmacéutica, que comprende antagonistas de receptores de cannabinoides que combinados con otro agonista de proteína, pueden reducir el consumo de alimentos, alcohol o de otras sustancias que provocan apetito. Finalmente, la solicitud de patente de brasil P10114410-3 se refiere a la combinación farmacéutica del antagonista de CB<sub>1</sub> y el supresor de apetito sibutramina que es útil en el tratamiento de la obesidad.

Una característica subyacente de estos estudios publicados, es que demuestra la forma en la que un antagonista o agonista inverso de CB<sub>1</sub> puede tratar la obesidad. Los receptores CB<sub>1</sub> son objetivos para tratar la obesidad porque son altamente expresados en áreas del hipotálamo que están involucradas en el control central de la ingesta de

alimentos y, en el comportamiento de la alimentación. Estas regiones están también interconectadas con la ruta mesolímbica de la dopamina, el sistema llamado de “premio” (“reward”). Además, los receptores periféricos CB<sub>1</sub>, están situados en el tubo gastrointestinal, hígado y en tejidos adiposos. Estos hechos combinados indican fuertemente que el sistema endocannabinoide puede estar directamente involucrado en la regulación de la alimentación, control de grasas y regulación de la glucosa en la sangre. Por ejemplo, es conocido en la literatura que la administración de agonistas exógenos de CB<sub>1</sub>, tales como Δ<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol (THC), el ingrediente activo de *Cannabis sativa*, incrementa la ingesta alimenticia al incrementar los premios motivacionales. El antagonismo de CB<sub>1</sub> podría invertir potencialmente estos efectos al inhibir las propiedades de recompensa mediadas por dopamina de los alimentos e invertir el proceso de almacenamiento de grasas.

La obesidad es en la actualidad la alteración nutricional más común en los países industrializados. Definida como índice de masa corporal mayor de 30, la obesidad se produce por la acumulación de exceso de grasas en el cuerpo por un consumo excesivo de alimentos grasos. La prevalencia de la obesidad en Estados Unidos y Europa ha alcanzado niveles epidémicos. Datos de la organización Multinational MONICA (MONitoring of trends and determinants in Cardiovascular diseases) de la Organización Mundial de la Salud, muestran que en algunas partes de Europa, más del 70% de los hombres con edad de 55-64 años son clínicamente obesos o tienen sobrepeso y casi el 70% de las mujeres de este grupo de edad. Además, uno de cada cinco americanos son obesos y uno de tres presentan sobrepeso. Además, tasas crecientes de obesidad infantil probablemente podrían exacerbar la tendencia a un aumento de obesidad en adultos.

Además, las investigaciones indican que los individuos obesos están predispuestos a resistencia a la insulina y diabetes. (Ver Boden, Free fatty acids, a link between obesity and insulin resistance, 3 Front. Biosci. 169-75 (1998)). Los términos “resistencia a la insulina” se refieren al estado en el que las células del individuo han pasado a ser menos sensibles a los efectos de la insulina en el equilibrio de los niveles de glucosa en la sangre. La insulina es la hormona segregada por el páncreas que ayuda a la glucosa a entrar en las células donde es transformada en energía. Los individuos obesos tienen niveles elevados de ácidos grasos libres en su plasma sanguíneo. Los ácidos grasos libres conducen a una mayor resistencia a la insulina porque compiten con la insulina que inhibe la misma en cuanto a estimular la absorción de glucosa, lo cual conduce a niveles de glucosa incrementados en la sangre que potencialmente son un peligro para la vida. Por lo tanto, la disminución del nivel de ácidos grasos libres y el aumento de la sensibilidad a la insulina es básico para la prevención y tratamiento de la diabetes.

Las personas que experimentan resistencia a la insulina provocan que el páncreas trabaje de manera más exigente y liberan cantidades crecientes de insulina para conseguir un equilibrio saludable de la glucosa en la sangre. Esto puede conducir a dos problemas principales. En primer lugar, el páncreas se puede agotar y, por lo tanto, se puede ralentizar la producción de insulina a niveles anormalmente bajos. Esto provocaría el inicio de diabetes tipo II en adultos al incrementar los niveles de glucosa en la sangre. Un segundo problema potencial puede consistir, en que el paciente resistente a la insulina no desarrolla diabetes, pero puede sufrir niveles anormalmente altos de insulina en la sangre, que pueden provocar obesidad crónica, elevar la presión sanguínea, enfermedades cardíacas y posiblemente algunos tipos de cáncer.

No hay documentos de la técnica anterior que sugieran una composición farmacéutica de hemopresina, un agente mimético, derivado o fragmento de la misma para el tratamiento de la diabetes.

No obstante, un compuesto sintético, el rimonabant (SR141716A), ha demostrado comportarse como agonista inverso en el receptor CB<sub>1</sub> y consigue efectos reductores del peso durante períodos de tiempo prolongados en roedores y en humanos (ver Van Gaal y otros, Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients, 365 Lancet 1389-1397 (2005)) (efectos del rimonabant como bloqueador del receptor de cannabinoide-1 en la reducción de peso y en factores de riesgo cardiovasculares en pacientes con sobrepeso). La acción del rimonabant está limitada no obstante, dado que la Food and Drug Administration de Estados Unidos rechazó el rimonabant porque pruebas clínicas habían sugerido una mayor incidencia de depresión, ansiedad y tendencia al suicidio después de una administración prolongada (ver R. Christensen y otros, Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant, 370 Lancet 1706-1713 (2007)) (eficacia y seguridad del medicamento rimonabant para la pérdida de peso). Por lo tanto, en la actualidad se están realizando esfuerzos en la investigación para encontrar compuestos más seguros, que se comporten como antagonistas selectivos o agonistas inversos del receptor de CB<sub>1</sub>.

El péptido hemopresina puede ser un compuesto alternativo más seguro, que muestra selectividad para CB<sub>1</sub>. La hemopresina es un producto de la cadena de hemoglobina α descubierto en homogenados de cerebro de rata. Otros estudios han indicado que péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de la hemopresina se generan *in vivo*, sugiriendo ciertamente que la hemopresina puede ser una alternativa más segura que el rimonabant u otros agonistas inversos o antagonistas de CB<sub>1</sub>, a causa de su presencia potencial endógena.

Se descubrió inicialmente por Dale y otros que la hemopresina tenía efectos antinociceptivos no opioides (ver Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia, 25 Peptides 431-436 (2005)) (acción antinociceptiva de la hemopresina en hiperalgesia experimental). Otros estudios han demostrado que el péptido hemopresina actúa específicamente sobre el sistema carabinoide como agonista inverso del receptor de CB<sub>1</sub> y

puede interactuar con las rutas periférica y central del dolor *in vivo* (ver Heimann y otros, Hemopressin is an inverse agonist of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors, 104 PNAS 20588-593 (2007)) (hemopresina es un agonista inverso de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>). Este artículo demuestra también la forma en la que hemopresina es efectiva en el tratamiento de hiperalgesia cuando es administrada localmente o sistémicamente. Además, este artículo sugiere que basándose en la especificidad de la hemopresina para CB<sub>1</sub> puede tener un efecto en el peso corporal y en la ingesta de alimentos de la misma manera que el rimonabant.

Un artículo reciente publicado en el Journal of Neuroscience en 26 de mayo de 2010 por Garron T. Dodd y otros, titulado: The peptide hemopressin acts through CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice (el péptido hemopresina actúa a través de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> para reducir la ingesta alimenticia en ratas y ratones), demuestra la forma en la que la hemopresina actúa como agonista inverso sobre receptores de CB<sub>1</sub> y modula la actividad de las rutas del apetito en el cerebro de manera contraria a la forma en que THC, y otros agonistas de CB<sub>1</sub> modulan las rutas del apetito en el cerebro. De manera más específica, Dodd indica que la hemopresina puede actuar de la forma siguiente: 1) antagonizando la internalización inducida por el agonista de CB<sub>1</sub> del receptor CB<sub>1</sub> *in vitro*; 2) induciendo hipofagia *in vivo* cuando es administrado centralmente; 3) induciendo hipofagia *in vivo* cuando es administrado de manera sistémica; 4) superar fuertes impulsos orexigénicos en ratones en ayunas u obesos; y 5) reduce la alimentación de manera específica desde el punto de vista del comportamiento.

#### Objetivo de la invención

Teniendo en cuenta las preocupaciones crecientes en la salud pública con respecto a la obesidad y la diabetes, muchos investigadores en todo el mundo han intentado encontrar una composición farmacéutica que puede ser utilizada para el tratamiento de obesidad y diabetes.

El objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad sin provocar depresión, oxidando los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. Esta invención sugiere también una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la diabetes al incrementar la sensibilidad a la insulina.

El objetivo de la presente invención es conseguido por una composición farmacéutica que comprende hemopresina como ingrediente activo, incluyendo un agente mimético, derivado o fragmento del mismo, tal como se define por las reivindicaciones que puede actuar como agonista inverso o antagonista de receptores acoplados a proteínas G, particularmente CB<sub>1</sub>, y como vehículo farmacéuticamente aceptable.

#### Breve descripción de la invención

El objetivo de la invención se consigue mediante una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1. Se darán a conocer realizaciones preferentes de la misma en las reivindicaciones dependientes 2 a 11. Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización para la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la obesidad, diabetes o para aumentar la sensibilidad a la insulina. La presente invención que comprende la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo, un agente mimético, un derivado o fragmento del mismo, que se comporta como agonista inverso y/o antagonista de un receptor acoplado a proteínas G y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El receptor acoplado a proteínas G, que constituye el objetivo de esta invención, es un receptor cannabinoide y, en particular, el receptor de CB<sub>1</sub>. En la presente invención, el ingrediente activo es el péptido hemopresina con la siguiente secuencia de aminoácidos PVNFKFLSH (prolina-valina-asparagina-fenilalanina-lisina-fenilalanina-leucina-serina-histidina), o un agente mimético, derivado o fragmento del mismo, tal como se define en las reivindicaciones. El vehículo farmacéuticamente aceptable es preferentemente una solución isosmótica estéril, con la misma presión osmótica que una solución isotónica de sangre y que es compatible con el ingrediente activo.

La invención describe la forma en la que se puede utilizar dicha composición farmacéutica en el tratamiento de la obesidad al reducir el contenido de grasas y provocar síntomas de depresión al oxidar ácidos grasos en plasma sanguíneo en los músculos y en el hígado. La invención también da a conocer la forma en la que, dicha composición farmacéutica puede ser utilizada en la prevención y tratamiento de la diabetes al incrementar la sensibilidad a la insulina y disminuyendo, por lo tanto, la resistencia a la misma. Además, la presente invención demuestra que dicha composición farmacéutica puede conseguir efectivamente los mencionados resultados a través de cualquiera de las siguientes rutas de administración: oral, intraperitoneal, o intratecal.

La técnica anterior sugiere que la administración de hemopresina podría disminuir la ingesta de alimentos en ratones normales y obesos, tanto si se administra sistémicamente como localmente. No obstante, la presente invención demuestra que la administración local o sistémica de una composición farmacéutica de hemopresina, un agente mimético, derivado o fragmento del mismo, tal como se define por las reivindicaciones, disminuirá directamente el contenido de grasas y el peso corporal sin síntomas de depresión, al oxidar ácidos grasos en el plasma sanguíneo en los músculos y en el hígado.

El estado de la técnica no contiene, por lo tanto, mención o sugerencia alguna de la utilización específica de

hemopresina o de un agente mimético, derivado o fragmento del mismo, tal como se define por las reivindicaciones como parte de una composición farmacéutica que pueda ser utilizada en la prevención o tratamiento combativo de la obesidad al reducir el contenido de grasas y el peso corporal sin provocar síntomas de depresión por la oxidación de ácidos grasos en el plasma sanguíneo, en músculos y el hígado. El estado de la técnica tampoco da a conocer la forma en la que una composición farmacéutica de hemopresina, sus agentes mímicos, derivados en fragmentos, pueden impedir y tratar la diabetes al aumentar la sensibilidad a la insulina, reduciendo la resistencia a la insulina y, por lo tanto, equilibrando los niveles de la glucosa en la sangre.

Se han llevado a cabo experimentos sobre modelos genéticamente obesos y en modelos con obesidad inducida por la dieta, demostrando que una composición farmacéutica que contiene hemopresina, un agente mimético, un derivado o fragmento del mismo, tal como se define por las reivindicaciones puede reducir de manera efectiva, el contenido de grasas y el peso corporal en ratas después de administración intraperitoneal u oral actuando como agonistas inversos o como antagonistas del receptor CB<sub>1</sub>. Se han llevado a cabo experimentos para medir síntomas de depresión y ratas tratadas con una composición farmacéutica de hemopresina, agentes miméticos, derivados o fragmentos de los mismos, tal como se define en las reivindicaciones mostraban un comportamiento normal en una prueba de estrés normalizada.

De manera adicional, una composición farmacéutica de hemopresina, un agente mimético, derivado o fragmento del mismo, tal como se define por las reivindicaciones se puede administrar para la prevención y tratamiento de diabetes al aumentar la sensibilidad a la insulina y reducir, por lo tanto la resistencia a la insulina y mejorando de manera efectiva niveles peligrosamente altos de glucosa en la sangre. El proceso bioquímico afectado por unión agonística o antagonística a CB<sub>1</sub> pone en marcha una oxidación incrementada de ácidos grasos en el plasma sanguíneo, en los músculos y en el hígado, disminuyendo la cantidad de ácidos grasos libres y, por lo tanto, reduciendo la resistencia a la insulina. Tal como se ha mencionado anteriormente, los ácidos grasos libres compiten con la insulina e inhiben la misma en cuanto a la estimulación de la ingesta de glucosa, conduciendo, por lo tanto, a niveles de glucosa en la sangre incrementados y que son una amenaza potencial para la vida. Por lo tanto, la disminución de la cantidad de ácidos grasos libres y el aumento de la sensibilidad a la insulina es básico para la prevención y tratamiento de la diabetes.

Una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad que comprende la hemopresina como ingrediente activo como el agente mimético, derivado o fragmento de la misma, tal como se define por las reivindicaciones, que actúa como antagonista o agonista inverso de un receptor de cannabinoide de tipo 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, se caracteriza por el hecho de que la administración de dicha composición farmacéutica reduce el contenido de grasas del cuerpo al oxidar ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo.

Una composición farmacéutica que comprende hemopresina como ingrediente activo, un agente mimético, derivado o fragmento de la misma, tal como se define por las reivindicaciones, que actúa como antagonista o agonista inverso de receptores de cannabinoide de tipo 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se caracteriza por el hecho de que la administración de dicha composición farmacéutica mejora, previene y trata la diabetes por medio de la oxidación de ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo.

#### Breve descripción de las figuras

Se hará referencia a continuación a las figuras adjuntas para mejor comprensión de la descripción detallada de la invención:

La figura 1A - muestra hemopresina como modulador péptido del receptor CB<sub>1</sub>;

La figura 1B - muestra que la hemopresina actúa de manera similar al rimonabant;

La figura 2A - muestra que la hemopresina es capaz de desplazar el ligando de alta afinidad rimonabant del receptor CB<sub>1</sub>;

La figura 2B - muestra que la hemopresina es capaz de bloquear el incremento de GTPγS, medido con respecto al agonista HU-210;

La figura 2C - muestra que la hemopresina es capaz de impedir disminuciones en niveles de cAMP, según medición con respecto al agonista HU-210;

La figura 2D - muestra que la hemopresina es capaz de bloquear la fosforilación de ERK1 y ERK2, según medición con respecto al agonista HU-210;

La figura 3A - muestra que la hemopresina actúa como agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub> al provocar disminución de señalización, según medición por unión al ligando GTPγS;

La figura 3B - muestra que la hemopresina actúa como agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub>, al provocar disminuciones en la señalización, según medición de la actividad del catalizador de ciclase adenilato;

La figura 3C muestra que la hemopresina actúa como agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub>, provocando la disminución en la señalización, según medición por fosforilación de MAP quinasa;

La figura 3D muestra que la hemopresina bloquea eficazmente el crecimiento de neuritas en células neurales 2A, según medición con respecto a agonistas;

La figura 4A-J muestra la inmunohistoquímica en el cerebro de ratas, demostrando que la hemopresina es un péptido que se presenta de forma natural in vivo;

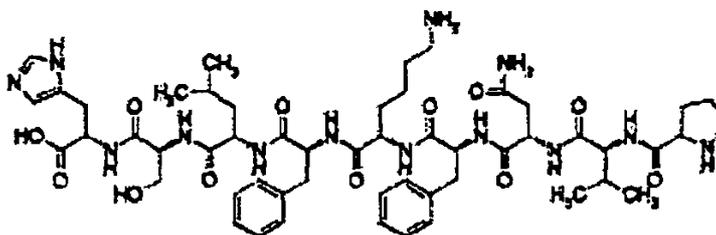
La figura 5 muestra que el tratamiento con hemopresina no provoca depresión en ratas, en comparación con el tratamiento con rimonabant;

La figura 6 muestra la forma en la que el tratamiento de hemopresina en modelos de obesidad inducidos por la dieta mejora la sensibilidad a la insulina.

#### Descripción detallada de la invención

La composición farmacéutica que se reivindica es útil para el tratamiento de la obesidad y para la prevención y tratamiento de diabetes.

La presente invención demuestra que la hemopresina, fragmento de alfa hemoglobina, originalmente identificado en extractos de cerebro de rata utilizando una técnica de captación de enzimas y definida por la secuencia de aminoácidos PVNFKFLSH (prolina-valina-asparagina-fenilalanina-lisina-fenilalanina-leucina-serina-histidina), es un agonista péptido inverso de receptores CB<sub>1</sub>. La estructura molecular de la hemopresina se muestra continuación:



La identificación de la hemopresina como péptido modulador del receptor CB<sub>1</sub> se puede apreciar en la figura 1A, en la que se ha descubierto que, entre todos los péptidos comprobados, solamente la hemopresina ha sido capaz de reducir el reconocimiento de un anticuerpo específico de CB<sub>1</sub>. El estudio mostrado en la figura 1B muestra que el incremento inducido por el agonista de CB<sub>1</sub> HU-210 en el reconocimiento del anticuerpo, se puede bloquear de manera significativa, tanto por la hemopresina como por rimonabant, sugiriendo que la hemopresina se comporta de manera similar a rimonabant.

A continuación, se examinó la selectividad de la hemopresina para receptores CB<sub>1</sub> utilizando anticuerpos sensibles a las conformaciones mu y delta de receptores opioides, receptores adrenérgicos alfa-2A y beta-2, así como receptores de angiotensina II de tipo 1 y 2. En la tabla siguiente es posible identificar la especificidad del péptido hemopresina para el receptor CB<sub>1</sub>. La hemopresina actúa solamente sobre el receptor CB<sub>1</sub>, por lo que se muestra que la hemopresina es altamente selectiva para receptores CB<sub>1</sub>. Los siguientes datos presentan el porcentaje de actividad en comparación con el grupo de control:

	Agonista	Hemopresina (HP)	Agonista y HP
CB <sub>1</sub>	130,02 ± 5,91	72,30 ± 3,32	102,06 ± 5,91
opioide mu	140,09 ± 6,01	105,62 ± 1,09	141,09 ± 6,46
opioide delta	133,99 ± 10,16	100,65 ± 4,29	131,08 ± 3,35
alfa-2 A	125,43 ± 7,34	102,72 ± 2,00	130,05 ± 7,06
beta-2	150,44 ± 3,35	103,85 ± 9,29	157,40 ± 8,15
AT1	143,01 ± 4,26	109,65 ± 1,31	140,01 ± 1,21
AT2	134,01 ± 2,17	99,65 ± 4,71	137,10 ± 1,91

A la vista de estos resultados, se examinó si la hemopresina funcionaba desplazando el ligando de alta afinidad rimonabant de los receptores CB<sub>1</sub>. Tal como se puede apreciar en la figura 2A, la hemopresina es capaz de desplazar el rimonabant de los receptores CB<sub>1</sub>. Se diseñó a continuación una prueba, cuyos resultados se muestran en la figura 2B para determinar si la hemopresina podría bloquear la señalización del receptor CB<sub>1</sub>. Se descubrió que la hemopresina es capaz de bloquear el incremento de GTPgammaS, según medición con respecto al agonista HU-210 del receptor CB<sub>1</sub>. La hemopresina se descubrió que bloqueaba las disminuciones en niveles de cAMP con eficiencia similar a las del rimonabant, según medición con respecto a agonistas, tal como se puede apreciar en la figura 2C. Finalmente, se diseñó una prueba para medir si la hemopresina es capaz de bloquear el incremento de niveles de ERK1 y ERK2 fosforilados. La hemopresina se descubrió que se comportaba de manera similar al rimonabant en esta prueba también, tal como se muestra en la figura 2D. El análisis comparado de las figuras 2A-2D demuestra que la hemopresina se une a receptores CB<sub>1</sub> y se comporta de manera similar al agonista de receptor CB<sub>1</sub> sintético rimonabant, altamente selectivo.

También se determinó que la hemopresina no actuaba solamente como antagonista, sino también como agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub>. Esto fue explorado adicionalmente mediante el estudio de la unión de GTPgammaS, la actividad de adenilato ciclasa y fosforilación de MAP quinasa. En todos los casos, fue posible observar que la hemopresina, similar al rimonabant, provoca disminuciones en la señalización por debajo de los niveles basales.

Esto se puede apreciar claramente en las figuras 3A-C. Además, la activación de receptores CB<sub>1</sub>, particularmente por el agonista HU-210 de CB<sub>1</sub>, conduce a la inducción del crecimiento de neuritas en células neurales 2A. Se descubrió que, igual que el rimonabant, la hemopresina bloquea de manera eficiente el crecimiento de neuritas, según medición con respecto a agonistas en células neurales 2A y que la hemopresina sola es capaz de disminuir el crecimiento basal de neuritas, tal como se puede observar en la figura 3D. Estos experimentos adicionales indican que la hemopresina se comporta no solamente como antagonista de receptores CB<sub>1</sub> sino también como agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub> similar al compuesto sintético altamente selectivo rimonabant.

Además del análisis antes mencionado, se llevaron a cabo estudios de unión de las partes más importantes de la secuencia de aminoácidos de la hemopresina con respecto a los receptores CB<sub>1</sub>. Se determinó que las dos fenilalaninas de la secuencia de hemopresina debían tener características de grupos hidrofóbico y aromático, y la parte de leucina de la secuencia de hemopresina debía tener características de grupo hidrofóbico. Por lo tanto, mímicos, fragmentos o derivados de los mismos con grupos hidrofóbicos y aromáticos, la región de fenilalanina y grupos hidrofóbicos en la región de leucina se demostró que se unían satisfactoriamente a los receptores CB<sub>1</sub>.

De manera adicional, se llevaron a cabo estudios in vivo demostrando la forma en la que la hemopresina, sus mímicos, derivados y fragmentos, tal como se define en las reivindicaciones, se pueden utilizar para tratar la obesidad. Los resultados de estos experimentos llegan a la conclusión de que la hemopresina, sus mímicos, sus derivados y fragmentos, reducen el contenido de grasas, sin provocar síntomas de depresión. Esta es una mejora significativa con respecto a la técnica anterior porque la técnica anterior simplemente se refiere a un tratamiento utilizando la hemopresina para reducir la ingesta de alimentos, mientras que la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que contiene hemopresina, un mímico, derivado o fragmento de la misma, tal como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de la obesidad por oxidación directa de ácidos grasos en el plasma sanguíneo en músculos y en el hígado, sin provocar el habitual efecto secundario de depresión.

Se llevaron a cabo experimentos demostrando que la administración de la hemopresina o su derivado HPW2, teniendo la secuencia de aminoácidos PVNFKWLSH, en la que el triptófano sustituye la fenilalanina terminal-C a ratas macho *Wistar* que habían estado sometidas a una dieta *ad libitum* de 63 días, una vez al día durante tres días tuvo como resultado una reducción significativa en el contenido periepididimal y visceral de grasas, en comparación con el grupo de control al que se administró solamente una solución salina.

Tratamiento	Peso corporal (% de Control)	Peso de tejido adiposo periepididimal (g)	Peso de tejido adiposo retroperitoneal (g)	Peso de tejido adiposo visceral (g)
solución salina (n=6)	95,97±8,20	5,66±1,19	6,14±1,56	3,72±0,59
hemopresina (HP) (n=8)	98,62±13,33	4,77±1,06	6,12±2,09	2,77±0,58
HPW2 (n=6)	95,47±15,44	4,01±0,33	5,37±1,11	2,63±0,94

También se realizaron experimentos con ratas genéticamente obesas e inducidas por dieta de otras especies. Se mantuvieron ratas macho Zucker en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Las ratas fueron divididas en dos grupos, que recibían una vez al día, durante tres días, administración o bien intraperitoneal de 50 microgramos/Kg de peso corporal o solución salina HPW2. Después de tres días de administración, la administración intraperitoneal de HPW2 tuvo como resultado una reducción significativa del contenido retroperitoneal de grasa.

A continuación, la administración oral de hemopresina y HPW2 se demostró que reducía significativamente el peso corporal total y periepididimal, pero no el contenido visceral de grasa. El contenido retroperitoneal de grasa se redujo significativamente solamente por hemopresina. La administración oral de rimonabant tuvo efectos similares en la reducción del contenido de grasa. Inversamente, la administración oral del péptido no cannabinoide VDPENFRLGNM no tuvo efectos en el contenido de grasas de ratas.

Tratamiento	Peso corporal (% de Control)	Peso de tejido adiposo periepididimal (g)	Peso de tejido adiposo retroperitoneal (g)	Peso de tejido adiposo visceral (g)
solución salina (n=6)	95,97±8,20	5,66±1,19	6,14±1,56	3,72±0,59
hemopresina (HP) (n=8)	98,62±13,33	4,77±1,06	6,12±2,09	2,77±0,58
HPW2 (n=6)	95,47±15,44	4,01±0,33	5,37±1,11	2,63±0,94
rimonabant (n=10)	98,92±0,95	5,57±1,03	6,89±1,31	3,91±0,78
péptido no cannabinoide (n=8)	100,65±8,07	9,38±0,95	8,80±1,15	4,81±1,25

A efectos de asegurar que la hemopresina, sus mímicos, fragmentos o derivados no tendrán efectos secundarios no deseados tales como el rimonabant, se llevaron a cabo estudios para ayudar a determinar si la hemopresina existe

como péptido in vivo. Se llevó a cabo un análisis espectrométrico en las fracciones de masa de cerebro de rata, obtenido por microondas para minimizar la proteólisis post-mortem no específica. Fue posible identificar a partir de este experimento tres nuevos péptidos que contenían hemopresina: VDPVNFKFLSH, RVDPVNFKFLSH, y RVDPVNFKFL. La inmunohistoquímica en cerebros de ratas sugirió que la hemopresina se puede presentar también de manera natural en las neuronas de diferentes áreas de los cerebros de ratas. Estos estudios adicionales demostraron que, péptidos conteniendo la secuencia de aminoácidos de la hemopresina, se generan ciertamente in vivo. Ver figura 4A-J.

En realidad, mientras que el rimonabant provocó la depresión esperada de los animales durante las pruebas, los animales que recibían 1 mg/kg de hemopresina no mostraron estos síntomas observados mediante una prueba estándar de natación. Ver los resultados mostrados en la figura 5.

Por lo tanto, esta invención demuestra que la hemopresina, sus mímicos, derivados y fragmentos, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden reducir de manera efectiva el contenido de grasas sin provocar depresión en dos modelos distintivos de animales.

Finalmente, se ha demostrado que la administración de hemopresina, un mímico, derivado o fragmento de la misma, tal como se define por las reivindicaciones, mejora la sensibilidad a la insulina y se puede utilizar, por lo tanto, para la prevención y tratamiento de diabetes.

Se comprende de manera general que los individuos obesos tienen una mayor predisposición a sufrir diabetes. Este desorden se caracteriza por un alto contenido de glucosa en la sangre en el contexto de resistencia a la insulina y relativa deficiencia de insulina. La resistencia a la insulina es un estado fisiológico en el que la hormona natural, insulina, pasa a ser menos eficaz en reducir los contenidos de azúcar en la sangre. El incremento resultante en glucosa de la sangre puede aumentar los niveles fuera del rango normal y provocar efectos adversos en la salud. Ciertos tipos de células, particularmente células de grasa, requieren insulina para adsorber glucosa. Cuando estas células no responden adecuadamente a la insulina circulante, los niveles de glucosa en la sangre aumentan.

La resistencia a la insulina en células de grasa reduce los efectos normales de la insulina en los lípidos y resulta en una ingesta reducida de lípidos circulantes. La movilización incrementada de los lípidos almacenados eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. Las concentraciones elevadas de ácidos grasos en la sangre contribuyen a niveles elevados de glucosa en la sangre.

La hemopresina, además de tratar la obesidad, puede ser utilizada en el tratamiento profiláctico de diabetes al incrementar la sensibilidad a la insulina, disminuyendo con ello la resistencia a la insulina por oxidación de los ácidos grasos en el plasma sanguíneo de músculos y del hígado. Esto ha sido demostrado en un experimento en ratas obesas inducidas por dieta que fueron tratadas con una solución salina, 50 microgramos/kg de hemopresina, HPW2, rimonabant, y 1 mg/kg de hemopresina. El tratamiento de ratas con obesidad inducida por la dieta con hemopresina mejoró significativamente la sensibilidad a la insulina, así como al derivado HPW2. El tratamiento con el antagonista sintético rimonabant y la solución de control salina estándar no produjo resultados similares. Ver figura 6.

En conclusión, la presente invención demuestra que la administración sistémica o local de hemopresina, sus mímicos, derivados o fragmentos de la misma, tal como se definen en las reivindicaciones, forman un potente candidato para una nueva terapia para el tratamiento de la obesidad al reducir directamente el contenido corporal de grasas, sin los efectos colaterales habituales de depresión. Además, la invención sugiere que este tratamiento podría reducir también el riesgo de diabetes y tratar pacientes que sufren de diabetes al incrementar la sensibilidad a la insulina, y reduciendo de manera efectiva las concentraciones de glucosa en la sangre.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de un sujeto afectado de obesidad, diabetes o afectado de un estado caracterizado por baja sensibilidad a la insulina o resistencia incrementada a la insulina, que comprende como ingrediente activo hemopresina y un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener la reducción de grasas del cuerpo.
- 10 2. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, para obtener la reducción de grasas corporales en tejidos adiposos retroperitoneales, periepididimales y viscerales.
3. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, para obtener una mayor sensibilidad a la insulina.
- 15 4. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ingrediente activo comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
ID SEC NO 1: Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-Ser-His
- 20 5. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ingrediente activo comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
ID SEC NO 2: Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-Ser-His
- 25 6. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ingrediente activo comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
ID SEC NO 3: Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-Ser-His
- 30 7. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ingrediente activo comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
ID SEC NO 4: Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu
- 35 8. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ingrediente activo comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:  
ID SEC NO 5: Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Trp-Leu-Ser-His
- 40 9. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para administración intraperitoneal, intratecal, u oral.
- 45 10. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, preparada para administración de hemopresina con una dosis comprendida entre 0,05 microgramos por kilo de peso corporal hasta 1 miligramo por kilo de peso corporal, preferentemente de 0,05 microgramos por kilo de peso corporal a 50 microgramos por kilo de peso corporal.
- 50 11. Composición farmacéutica para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución estéril iso-osmótica, que tiene opcionalmente una presión iso-osmótica isotónica con sangre.
- 55 12. Utilización de hemopresina, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para preparar una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la obesidad.
13. Utilización de hemopresina, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para preparar una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de diabetes.
- 60 14. Utilización de hemopresina, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para preparar una composición farmacéutica para incrementar la sensibilidad a la insulina.

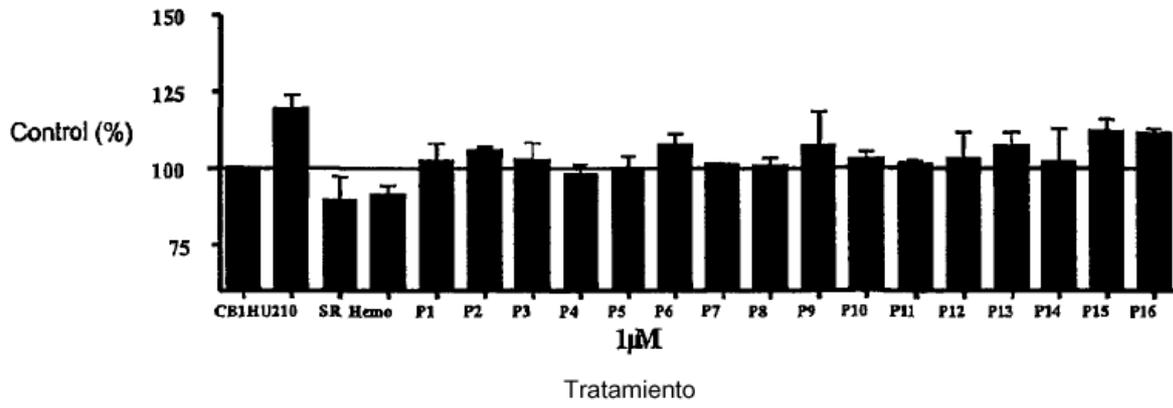


Fig. 1A

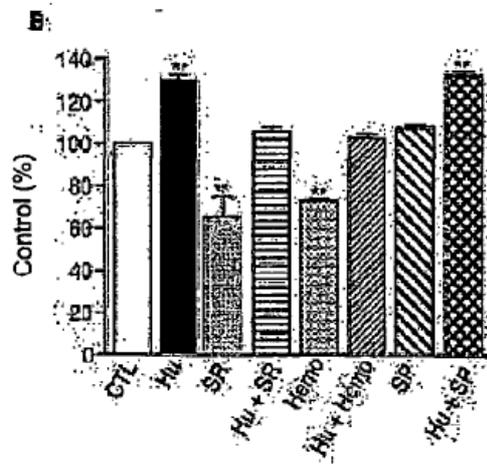


Fig. 1B

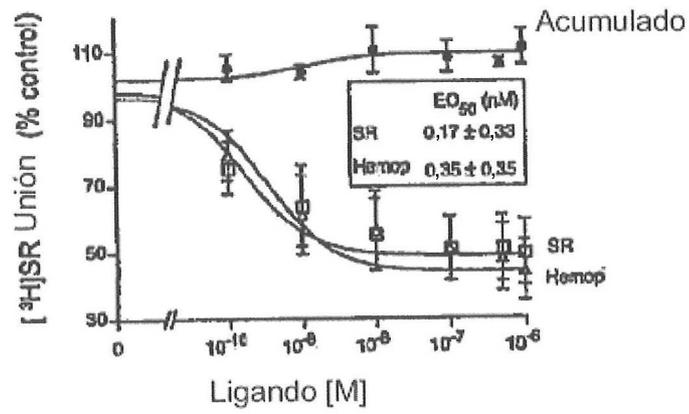


Fig. 2A

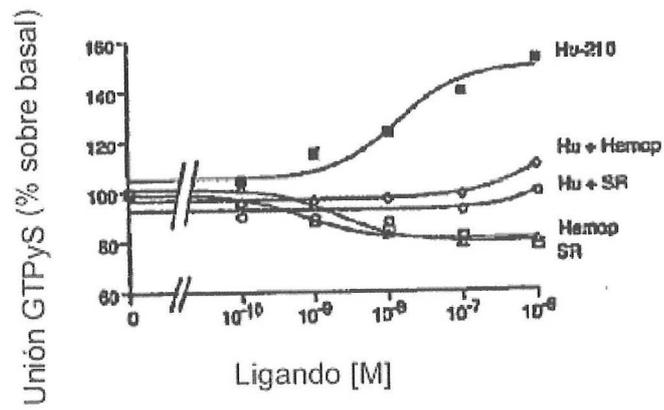


Fig. 2B

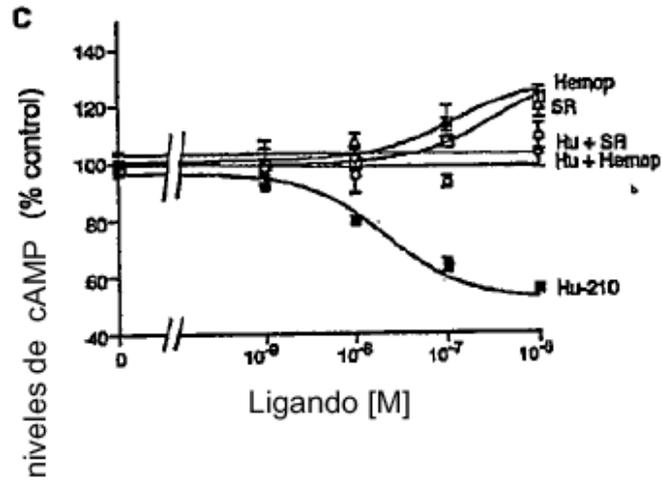


Fig. 2C

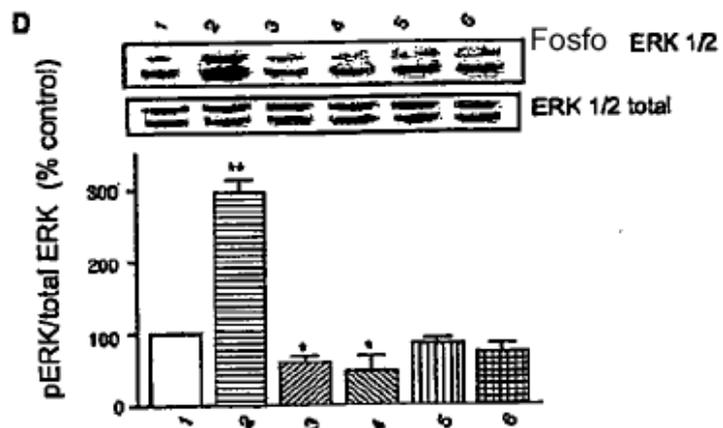


Fig. 2D

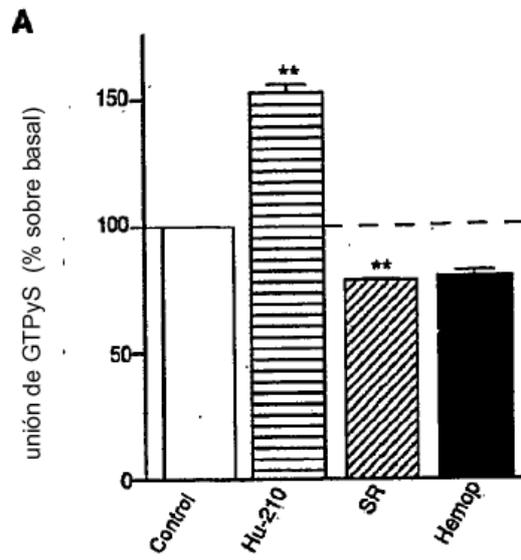


Fig. 3A

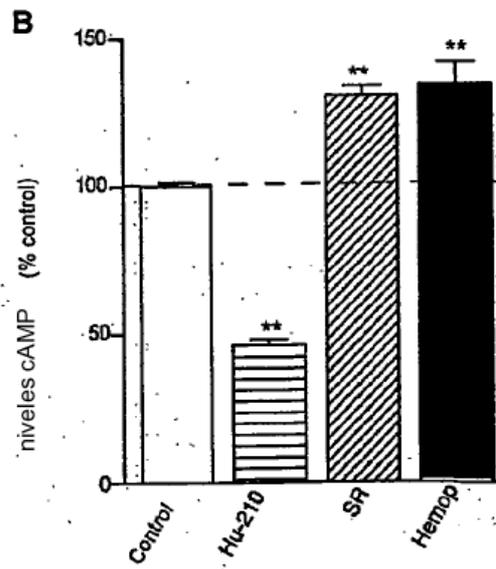


Fig. 3B

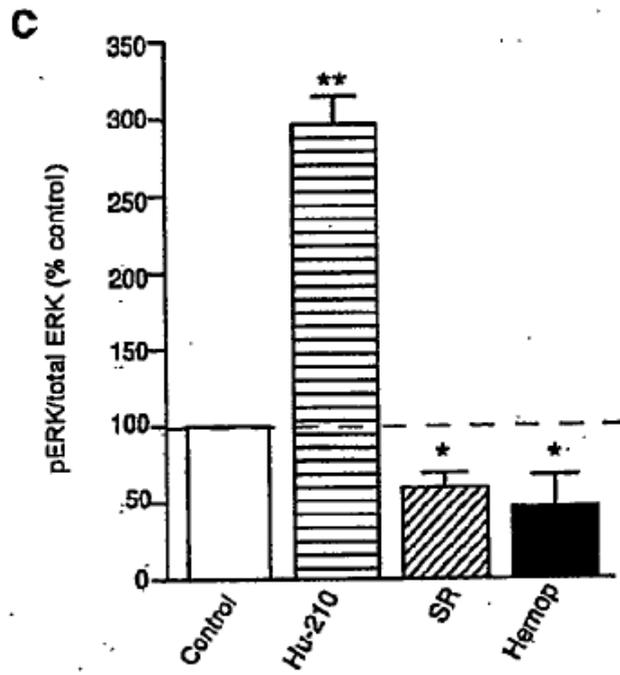


Fig. 3C

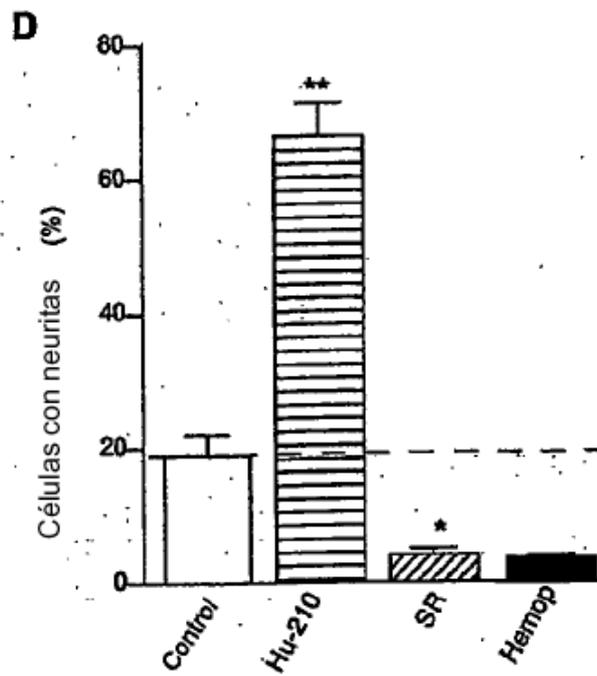


Fig. 3D

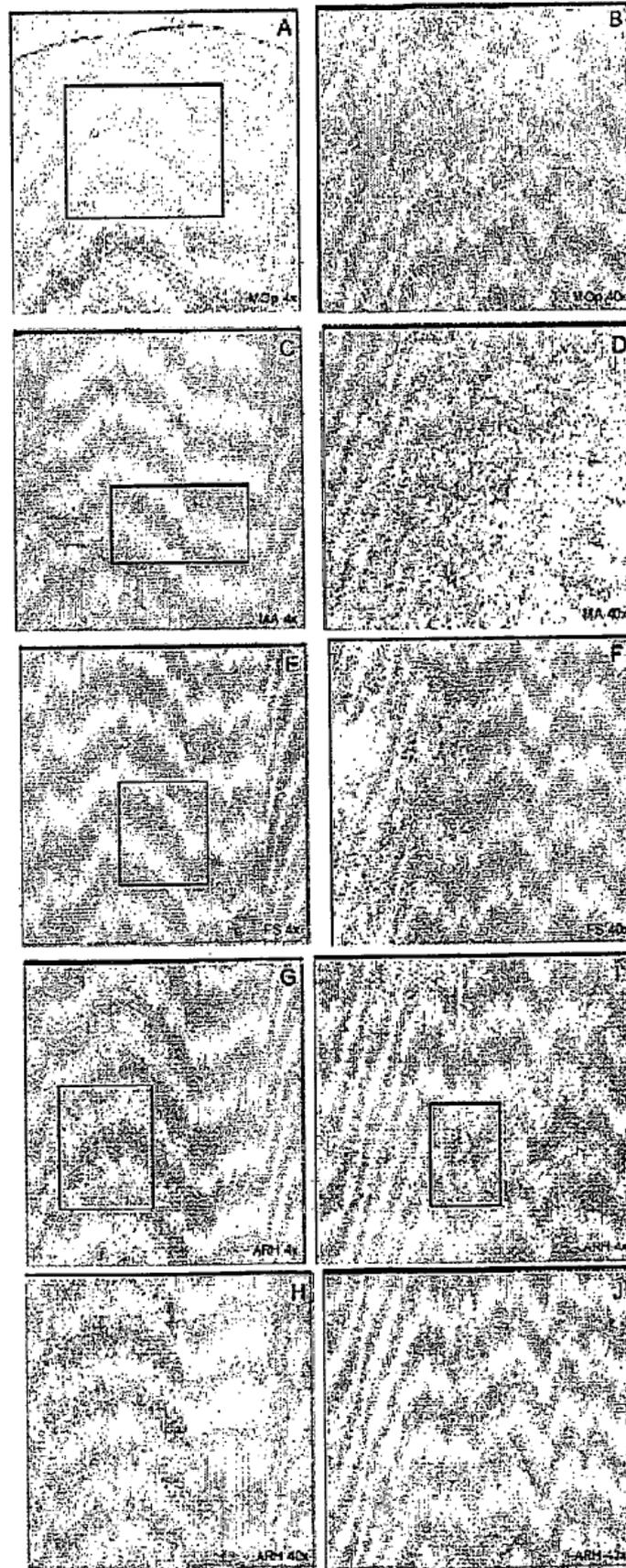


Fig.4

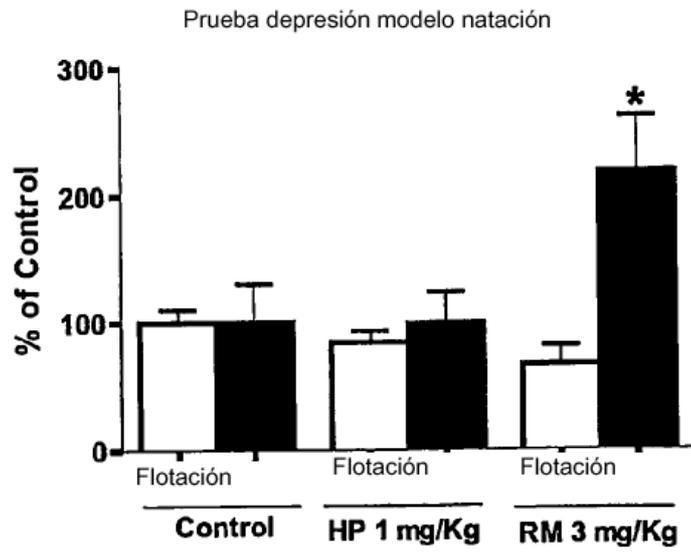


Fig.5

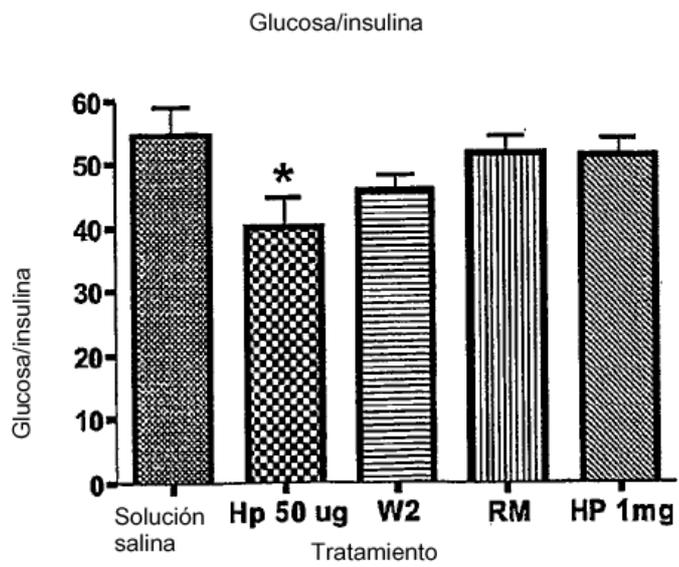


Fig.6