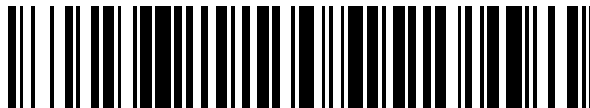


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 870**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2009 E 09707235 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2252312**

54 Título: **Procedimientos para prevenir o tratar la resistencia a la insulina**

30 Prioridad:

07.02.2008 US 26882 P

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

07.05.2014

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (50.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise, &
Commercialization, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US y
EAST CAROLINA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NEUFER, P. DARRELL;
ANDERSON, ETHAN J. y
SZETO, HAZEL H.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 458 870 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

Procedimientos para prevenir o tratar la resistencia a la insulina

5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 61/026.882, presentada el 07 de febrero de 2008, la totalidad de cuyos contenidos se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10

Derechos del gobierno

La presente invención se efectuó con financiación del Gobierno de Estados Unidos con la subvención del NIH DK073488 y DK056112 El Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

15

Campo de la técnica

La presente invención se refiere en general a péptidos para usar en la prevención o tratamiento de la resistencia a la insulina.

20

Antecedentes

La obesidad se ha convertido en una epidemia en todo el mundo, cuyas consecuencias representan un gran desafío para la salud humana en el siglo 21. Una disminución en la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina es una de las primeras enfermedades asociadas con la obesidad, y su persistencia es un factor de riesgo importante para la diabetes de tipo II y la enfermedad cardiovascular. La acumulación de lípidos en el músculo esquelético ha sido asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina, una respuesta de mala adaptación que se atribuye actualmente a la generación y acumulación intracelular de metabolitos lipídicos proinflamatorios (por ejemplo, acil-CoA grasos, diacilgliceroles y / o ceramidas) y la activación asociada de las serina / treonina quinasas sensibles al estrés que antagonizan la señalización de la insulina. El músculo esquelético de los individuos obesos también se caracteriza por profundas reducciones en la función mitocondrial, como se pone de manifiesto por la disminución de la expresión de genes metabólicos, disminución de la capacidad respiratoria y mitocondrias que son más pequeñas y menos abundantes, lo que conduce a la especulación de que una disminución en la capacidad de oxidar la grasa debido a insuficiencia mitocondrial adquirida o heredada puede ser una causa subyacente de la resistencia a la acumulación de lípidos y la insulina que se desarrolla en diferentes estados metabólicos.

25

30

35

Thomas et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2007, 18, pp 213-222 divulga que dirigir a las mitocondrias el péptido antioxidante SS-31 impide la despolarización mitocondrial, reduce la apoptosis de las células de los islotes, aumenta la producción de células de los islotes y mejora la función postrasplante.

40

En el documento US-A-2007/0129306 se divulga un procedimiento de reducción de la expresión de CD36 que comprende poner en contacto células con ciertos péptidos catiónicos aromáticos.

45

Sheu et al., Biochimica y Biophysica Acta, 2006, 1756, pp 256-265 divulgan estrategias para la liberación dirigida de antioxidantes en las mitocondria.

Szeto, AAPS Journal, 2006, vol 8, E277-E283 divulga antioxidantes peptídicos dirigidos a las mitocondrias y permeables a las células.

50 Resumen

La presente invención se puede usar para el tratamiento o prevención de la resistencia a la insulina en los tejidos del músculo esquelético a través de la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de péptidos catiónicos aromáticos a sujetos en necesidad del mismo. En particular, se puede usar un péptido catiónico aromático para tratar o prevenir resistencia a la insulina inducida por la dieta mediante la reducción de la aparición de disfunción mitocondrial en el músculo esquelético y el exceso de producción de especies reactivas del oxígeno.

55

En un aspecto, la invención proporciona un péptido D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir la resistencia a la insulina en un sujeto mamífero.

60

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un péptido D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de resistencia a la insulina en un sujeto mamífero.

65

En algunas formas de realización, el péptido catiónico aromático se usa para tratar o prevenir las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina en sujetos mamíferos, que incluyen, entre otras, hiperinsulinemia, diabetes de tipo II, metabolismo anormal de los lípidos, función endotelial vascular anormal, retinopatía, enfermedad

de las arterias coronarias, enfermedad cardiovascular, disfunción renal, hipertensión, hígado graso, neuropatía e hiperuricemia. Ejemplos específicos de enfermedad cardiovascular potencialmente causada por la resistencia a la insulina a largo plazo incluyen infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico (infarto cerebral).

5 El péptido catiónico aromático se puede administrar en una variedad de maneras. En algunas formas de realización, los péptidos se pueden administrar por vía oral, por vía tópica, por vía intranasal, por vía intravenosa, por vía subcutánea, o por vía transdérmica (por ejemplo, por iontoforesis).

10 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para prevenir y / o tratar la diabetes, la obesidad, hiperlipemia, arteriosclerosis, enfermedad cerebrovascular, hipertensión o cardiopatías, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de péptidos catiónicos aromáticos a sujetos que lo necesiten. En un modo de realización particular, el péptido catiónico aromático comprende D-Arg-2'6Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31).

15 Breve descripción de las figuras

La figura. 1 es una serie de gráficos que muestran el impacto del exceso de grasa de la dieta sobre la emisión de H₂O₂ mitocondrial del músculo esquelético. La figura. 1A es un trazo representante de comparación de las tasas de emisión de H₂O₂ mitocondrial de fibras musculares esqueléticas permeabilizadas preparadas de ratas alimentadas con comida estándar, comida rica en grasa durante 3 días, o la comida rica en grasas durante 3 semanas. La figura. 1B es un gráfico que muestra el potencial de emisión oxidante mitocondrial de miofibras esqueléticas permeabilizadas de rata en ratas de control alimentadas con una dieta normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas.

25 La figura. 2 es un gráfico que muestra emisión de H₂O₂ mitocondrial en presencia de antimicina A en las fibras musculares esqueléticas preparadas de ratas alimentadas con comida rica en grasa frente a comida control. La emisión de H₂O₂ mitocondrial en presencia de antimicina A se midió en ambos grupos con una titulación de piruvato y malato.

30 La figura. 3 es una serie de gráficos que muestran el efecto del péptido SS-31 de la invención sobre el estado de oxidación de los tejidos musculares. Los temas incluyen las ratas alimentadas con una dieta normal (CTL), una dieta rica en grasas (HF), o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31 (HF + SS-31). Las figuras. 3A y 3B son gráficos que muestran curvas de respuesta a la dosis de la actividad antioxidante *in vitro* de SS-31, respectivamente. Las figuras. 3C y 3D son gráficos que muestran el potencial de emisión oxidante mitocondrial de miofibras esqueléticas permeabilizadas de rata en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diario de SS-31 y analizadas para determinar la emisión de H₂O₂ tras estimulación con succinato (figura 3C) y la emisión de H₂O₂ tras estimulación con palmitoil-carnitin (Figura 3D). Las figuras. 3E y 3F son gráficos que muestran las tasas de respiración en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31. La respiración se midió con piruvato y malato (Figura 3E) o con palmitoil-carnitina y malato (Figura 3F) en estados respiratorios tanto basal (PM₄, PCM₄) como con estimulación máxima con ADP (PM₃, PCM₃). La figura. 3G es un gráfico que muestra el total de glutatión en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31. La figura 3H es un gráfico que muestra la relación de GSH / GSSG en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31. Los análisis se llevaron a cabo antes (-) o 1 h después de la (+) de la ingestión oral de glucosa. Los datos son representativos de la media ± SEM; n = 4-6, * P < 0,05 vs comida estándar control † P < 0,05 vs tratadas con SS-31.

50 La figura. 4 es una serie de gráficos que muestran el efecto del péptido SS-31 de la invención sobre la resistencia a la insulina en los tejidos musculares. La figura. 4A es un gráfico que muestra la tasa de aclaramiento de glucosa en plasma en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31. La figura. 4B es un gráfico que muestra los niveles de insulina plasmática en ayunas en los mismos sujetos experimentales. La figura. 4C es un gráfico que muestra el aumento de valoración del modelo homeostático (HOMA) y la fig. 4D es un gráfico que muestra una mayor área bajo la curva (AUC) de la glucosa y la insulina en ratas control alimentadas con comida estándar, una dieta rica en grasas, o una dieta rica en grasas con administración diaria de SS-31. Los datos son representativos de la media ± SEM; n = 9-10, * P < 0,05 frente a comida estándar control, † P < 0,05 frente a tratadas con SS31. La figura 4E es una inmunotransferencia de Akt fosforilada y Akt total en homogeneizados de músculo esquelético de rata en respuesta a la exposición a glucosa. La figura 4F es un gráfico que muestra la cuantificación de estas transferencias utilizando densitometría. Los datos son representativos de la media ± SEM; n = 4-5, ‡ P < 0,05 frente a animales no expuestos a glucosa.

65 La figura. 5 es una serie de gráficos que muestran el estado de oxidación de los tejidos musculares de sujetos humanos delgados y obesos. Las figuras 5A y 5B son gráficos que muestran la emisión mitocondrial de H₂O₂ de fibras permeabilizadas preparadas a partir de biopsias obtenidas del vasto lateral de varones humanos obesos y

delgados. Se midió la emisión de H₂O₂ tanto con soporte de succinato (figura 5A) como con soporte de palmitoil-carnitina (figura 5B). La figura 5C es un gráfico que muestra la relación de emisión de H₂O₂/ O₂ consumido en muestras DE obesos en comparación con los delgados. La figura. 5D es un gráfico que muestra la respiración en presencia de glutamato / malato (GM₄), ADP (GM₃), y palmitoyl-carnitina/malato en estado basal (PCM₄) o máximo (PCM₃). La figura. 5E es un gráfico que muestra el glutatiión total (GSH en el músculo esquelético obesos en comparación con delgados. La figura. 5F es un gráfico que muestra la relación de GSH / GSSG en el músculo esquelético de obesos en comparación con de delgados. Los datos son representativos de la media ± SEM; n = 4-5, * P <0,05 vs frente a varones delgados para dicho respectivo experimento.

10 Descripción detallada

Se ha de apreciar que ciertos aspectos, modos, realizaciones, variaciones y características de la invención se describen a continuación con varios niveles de detalle con el fin de proporcionar una comprensión sustancial de la presente invención.

En la práctica de la presente invención, se usan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed.. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Ed.. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I y II, Glover, Ed.. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, Ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames y Higgins, Eds. (1985); Transcription and Translation, Hames y Higgins, Eds. (1984); Animal Cell Culture, Freshney, Ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; la serie, Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1987); y Meth. Enzymol., Vols. 154 y 155, Wu y Grossman, y Wu, Eds., respectivamente. Procedimientos para detectar y medir los niveles de productos de expresión génica de polipéptidos (es decir, el nivel de traducción del gen) son bien conocidos en la técnica e incluyen los procedimientos de detección de polipéptidos de uso, tales como técnicas de detección y cuantificación de anticuerpos. (Ver también, Strachan y Read, Human Molecular Genetics, Segunda edición. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999)).

Las definiciones de ciertos términos como se usan en esta especificación se proporcionan a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que esta invención pertenece.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica, química analítica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos a continuación son los bien conocidos y habitualmente empleados en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la "administración" de un agente, fármaco o péptido a un sujeto incluye cualquier vía de introducción o la liberación en un sujeto de un compuesto para realizar su función prevista. La administración puede llevarse a cabo por cualquier vía adecuada, incluyendo las vías oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea) o tópica. La administración incluye autoadministración y de la administración por otro.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" significa el material muestra derivado de o en contacto con las células vivas. Con la expresión "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Las muestras biológicas de la invención incluyen, *por ejemplo*, entre otras, sangre completa, plasma, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, bucal, cutáneo, líquido cefalorraquídeo y cabello. Las muestras biológicas también pueden obtenerse a partir de biopsias de órganos internos o de cánceres. Las muestras biológicas se pueden obtener de sujetos para el diagnóstico o de investigación o pueden obtenerse a partir de individuos no enfermos, como controles o para investigación básica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos de origen natural y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono- α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *por ejemplo*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo ,norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química

general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos pueden citarse en el presente documento por cualquiera de sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

5

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y / o profiláctico deseado, *por ejemplo*, una cantidad que resulta en la prevención de, o una disminución de, los síntomas asociados con la resistencia a la insulina. La cantidad de una composición de la invención que se administra al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tal como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto en la materia será capaz de determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los procedimientos de la presente invención, los péptidos aromáticos catiónicos se pueden administrar a un sujeto que tiene uno o más signos de resistencia a la insulina causados por una enfermedad o afección. La administración de una cantidad eficaz de los péptidos catiónicos aromáticos puede mejorar al menos un signo o síntoma de la resistencia a la insulina en el sujeto, *por ejemplo*, el peso corporal, los niveles de ácidos grasos libres/glucosa en ayunas / insulina, la tolerancia a la glucosa (SOG), la sensibilidad a la insulina del músculo in vitro, los marcadores de la señalización de la insulina (*por ejemplo*, Akt-P, el IRS-P), la función mitocondrial (*por ejemplo*, la respiración o emisión de H₂O₂), los marcadores de estrés oxidativo intracelular (*por ejemplo*, la peroxidación de lípidos, la relación GSH / GSSG o la actividad de la aconitasa) y la actividad de la enzima mitocondrial. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los péptidos aromáticos catiónicos se entiende niveles en los que los efectos fisiológicos de la resistencia a la insulina son, como mínimo, mejores.

10

15

20

25

Un polipéptido o péptido "aislado" o "purificado" es sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la célula o fuente de tejido del que se deriva el agente, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, un péptido catiónico aromático aislado carecería materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del agente. Tales materiales que interfieren pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos.

30

Como se usa en el presente documento, el término "afección médica" incluye, entre otras, cualquier afección o enfermedad que se manifiesta como uno o más síntomas físicos y / o psicológicos para los cuales el tratamiento y / o prevención es deseable, e incluye enfermedades previamente y recientemente identificados y otros trastornos. Por ejemplo, una afección médica puede ser resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, diabetes tipo II, metabolismo anormal de los lípidos, función endotelial vascular anormal, enfermedad arterial coronaria, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, disfunción renal, hipertensión, hígado graso, neuropatía e hiperuricemia.

35

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente se refiere a péptidos, glicopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente denominadas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidos en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación.

45

50

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico específico. Un sujeto se "trata" con éxito por resistencia a la insulina si, después de recibir una cantidad terapéutica de los péptidos aromáticos catiónicos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el sujeto muestra una reducción observable y / o medible o ausencia de uno o más signos y síntomas de una enfermedad o afección particular. Por ejemplo, para la resistencia a la insulina, el tratamiento puede incluir una reducción de los niveles de glucosa en sangre en ayunas o los niveles de insulina, o las áreas bajo la curva para la glucosa y la insulina en respuesta a la exposición a la glucosa oral. También ha de apreciarse que con los diversos modos de tratamiento o prevención de afecciones médicas como se describe se pretende decir "sustancial", que incluye un tratamiento o prevención total o menos que total, y donde se logra algún resultado biológica o médicamente relevante.

55

60

Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, ciertos péptidos aromáticos catiónicos pueden prevenir o tratar la resistencia a la insulina en los tejidos de mamíferos; en particular, la resistencia a la insulina en los tejidos del músculo esquelético. En algunos casos, la resistencia a la insulina puede deberse a una dieta rica en grasas o, más en general, a sobrenutrición. Los péptidos de la invención son beneficiosos en el tratamiento de la resistencia a la insulina, pacientes diabéticos, prediabéticos o no diabéticos obesos. Sin pretender limitar la

65

invención a un mecanismo particular de acción, se cree que la pérdida de la integridad mitocondrial y la sensibilidad a la insulina de un trastorno metabólico común, es decir, estrés oxidativo. El exceso de nutrición, especialmente de las dietas ricas en grasas puede aumentar la emisión de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (ROS) y el estrés oxidativo general en el músculo esquelético, lo que lleva a la disfunción mitocondrial aguda y crónica y al desarrollo de resistencia a la insulina. Los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención mitigan estos efectos, y de este modo mejoran la función mitocondrial en los tejidos del músculo esquelético, de modo que mejoran la sensibilidad a la insulina. La invención también proporciona procedimientos de uso de los péptidos de la invención para prevenir o tratar la diabetes, la prediabetes, enfermedades metabólicas relacionadas, y las complicaciones derivadas de las mismas.

Los presentes inventores han encontrado que la resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasas / obesidad está relacionada con la bioenergética mitocondrial. La implicación es que el exceso de oferta de sustratos metabólicos hace que el sistema respiratorio mitocondrial esté más reducido, lo que genera un aumento de la emisión de ROS y un desplazamiento del entorno redox global a un estado más oxidado que, si se mantiene, conduce al desarrollo de resistencia a la insulina. La vinculación de la bioenergética mitocondrial con la etiología de la resistencia a la insulina tiene una serie de implicaciones clínicas. Se sabe que la atención estándar de la resistencia a la insulina (DMNIID) en los seres humanos a menudo tiene como resultado aumento de peso y, en individuos seleccionados, aumento de la variabilidad de azúcar en sangre con las consecuencias metabólicas y clínicas resultantes. Los ejemplos mostrados en el presente documento demuestran que el tratamiento de defecto mitocondrial con antioxidante dirigido a las mitocondrias (por ejemplo, un péptido catiónico aromático) proporciona un nuevo y sorprendente abordaje a la corrección metabólica de la resistencia a la insulina sin los efectos de crecimiento y metabólicos del aumento de la insulina.

La presente invención se refiere a la reducción de la resistencia a la insulina por ciertos péptidos catiónicos aromáticos. Los péptidos catiónicos aromáticos son hidrosolubles y altamente polares. A pesar de estas propiedades, los péptidos pueden penetrar fácilmente en las membranas celulares. Los péptidos catiónicos aromáticos útiles en la presente invención son aminoácidos e incluyen cuatro aminoácidos, unidos covalentemente por enlaces peptídicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se utiliza para hacer referencia a cualquier molécula orgánica que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo. Preferentemente, al menos un grupo amino está en la posición α con respecto a un grupo carboxilo. Los aminoácidos pueden ser de origen natural. Los aminoácidos de origen natural incluyen, por ejemplo, los veinte aminoácidos levógiros (L) más habituales que normalmente se encuentran en las proteínas de mamíferos, es decir, alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), y valina (Val). Otros aminoácidos de origen natural incluyen, por ejemplo, los aminoácidos que se sintetizan en los procesos metabólicos no asociados con la síntesis de proteínas. Por ejemplo, los aminoácidos ornitina y citrulina se sintetizan en el metabolismo de los mamíferos durante la producción de urea. Otro ejemplo de un aminoácido de origen natural incluyen hidroxiprolina (Hyp).

Los péptidos catiónicos aromáticos pueden contener opcionalmente uno o más aminoácidos de origen no natural. De manera óptima, el péptido no tiene los aminoácidos que se producen de forma natural. Los aminoácidos de origen no natural pueden ser levógiros (L-), dextrógiros (D-), o mezclas de los mismos. Los aminoácidos de origen no natural son aquellos aminoácidos que por lo general no se sintetizan en los procesos metabólicos normales en los organismos vivos, y no se producen de manera natural en las proteínas. Además, los aminoácidos de origen no natural útiles en la presente invención, preferentemente, tampoco son reconocidos por las proteasas habituales. El aminoácido de origen no natural puede estar presente en cualquier posición en el péptido. Por ejemplo, el aminoácido de origen no natural puede estar en el extremo N, en el extremo C, o en cualquier posición entre el extremo N y el extremo C.

Los aminoácidos no naturales pueden, por ejemplo, comprender alquilo, arilo o grupos alquilarilo que no se encuentran en los aminoácidos naturales. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales alquilo incluyen el ácido α -aminobutírico, ácido β -aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido δ -aminovalérico y ácido ϵ -aminocaproico. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales arilo incluyen ácido orto-, meta-, y para-aminobenzoico. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales alquilarilo incluyen ácidos orto-, meta-, y para-aminofenilacético, y γ -fenil- β -aminobutírico. Los aminoácidos de origen no natural incluyen derivados de aminoácidos de origen natural. Los derivados de aminoácidos de origen natural pueden, por ejemplo, incluir, la adición de uno o más grupos químicos al aminoácido de origen natural.

Por ejemplo, uno o más grupos químicos se pueden añadir a una o más de las posiciones 2', 3', 4', 5', o 6 del anillo aromático de un residuo de fenilalanina o tirosina, o las posiciones 4', 5', 6', 7' del anillo benzo de un residuo de triptófano. El grupo puede ser cualquier grupo químico que se puede añadir a un anillo aromático. Algunos ejemplos de tales grupos incluyen alquilo C₁-C₄ ramificado o no ramificado, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, o t-butilo, alquilo C₁-C₄ (es decir, alcoxi), amino, alquilamino C₁-C₄ y dialquilamino C₁-C₄ (por ejemplo, metilamino, dimetilamino), nitro, hidroxilo, halo (es decir, flúor, cloro, bromo, o yodo). Algunos ejemplos específicos de derivados de aminoácidos de origen no natural incluyen norvalina (Nva) y norleucina (Nle).

Otro ejemplo de una modificación de un aminoácido en un péptido es la derivatización de un grupo carboxilo de un ácido aspártico o un residuo de ácido glutámico del péptido. Un ejemplo de derivatización es la amidación con amoníaco o con una amina primaria o secundaria, por ejemplo, metilamina, etilamina, dimetilamina o dietilamina. Otro ejemplo de derivatización incluye esterificación con, por ejemplo, alcohol metílico o etílico. Otra de estas modificaciones incluye la derivatización de un grupo amino de un residuo de lisina, arginina o histidina. Por ejemplo, dichos grupos amino pueden acilarse. Algunos grupos acilo adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo benzoilo o un grupo alcanilo que comprende cualquiera de los grupos alquilo C₁-C₄ mencionados anteriormente, tales como un grupo acetilo o propionilo.

Los aminoácidos de origen no natural pueden ser resistentes, y más preferentemente insensibles, a las proteasas habituales. Ejemplos de aminoácidos de origen no natural que son resistentes o insensibles a las proteasas incluyen la forma dextrógira (D-) forma de cualquiera de los L-aminoácidos de origen natural mencionados anteriormente, así como los aminoácidos L y / o D- de origen no natural. Los D-aminoácidos que normalmente no se producen en las proteínas, a pesar de que se encuentran en ciertos antibióticos peptídicos que son sintetizados por medios distintos a la maquinaria de síntesis de las proteínas ribosomales normal de la célula. Tal como se usa en el presente documento, los D-aminoácidos se consideran ser aminoácidos de origen no natural.

Con el fin de reducir al mínimo la sensibilidad de la proteasa, los péptidos catiónicos aromáticos deben tener menos de cinco, preferentemente menos de cuatro, más preferentemente menos de tres, y lo más preferentemente, menos de dos L-aminoácidos contiguos reconocidos por las proteasas habituales, independientemente de si los aminoácidos son de origen natural o no natural. De manera óptima, el péptido tiene sólo ácidos D-amino, y no hay L-aminoácidos. Si el péptido contiene secuencias de aminoácidos sensibles a la proteasa, al menos uno de los aminoácidos es preferentemente un D-aminoácido no natural, de modo que confiere modo resistencia a la proteasa. Un ejemplo de una secuencia sensible a proteasas incluye dos o más aminoácidos básicos contiguos que se escinden fácilmente por proteasas habituales, tales como endopeptidasas y tripsina. Los ejemplos de aminoácidos básicos incluyen arginina, lisina e histidina.

Los péptidos aromáticos catiónicos deben tener un número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico en comparación con el número total de residuos de aminoácidos en el péptido. El número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico se denominará a continuación (p_m), El número total de residuos de aminoácidos en el péptido se denominará a continuación (R). El número mínimo de cargas positivas netas que se mencionan a continuación están todas a pH fisiológico. La expresión "pH fisiológico" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al pH normal en las células de los tejidos y órganos del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo, el pH fisiológico de un ser humano es normalmente de aproximadamente 7,4, pero el pH fisiológico normal en los mamíferos puede ser cualquier pH desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,8.

"Carga neta" como se usa en el presente documento se refiere al equilibrio del número de cargas positivas y el número de cargas negativas portadas por los aminoácidos presentes en el péptido. En esta especificación, se entiende que las cargas netas se miden a pH fisiológico. Los aminoácidos de origen natural que están cargados positivamente a pH fisiológico incluyen L-lisina, L-arginina y L-histidina. Los aminoácidos de origen natural que están cargados negativamente a pH fisiológico incluyen el ácido L-aspártico y el ácido L glutámico.

Típicamente, un péptido tiene un grupo amino N-terminal cargado positivamente y un grupo carboxilo C-terminal cargado negativamente. Las cargas se anulan entre sí a pH fisiológico. Como un ejemplo de cálculo de la carga neta, el péptido Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg tiene un aminoácido cargado negativamente (*es decir*, Glu) y cuatro aminoácidos cargados positivamente (*es decir*, dos residuos de Arg, una Lys y una His). Por lo tanto, el péptido anterior tiene una carga neta positiva de tres.

También es importante que los péptidos catiónicos aromáticos tengan un número mínimo de grupos aromáticos en comparación con el número total de cargas positivas netas (p_i). El número mínimo de grupos aromáticos se denominará a continuación (a), los aminoácidos de origen natural que tienen un grupo aromático incluyen los aminoácidos histidina, triptófano, tirosina y fenilalanina. Por ejemplo, el hexapéptido Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp tiene una carga neta positiva de dos (aportada por los residuos de lisina y arginina) y tres grupos aromáticos (aportados por los residuos de tirosina, fenilalanina triptófano).

Los grupos carboxilo, especialmente el grupo carboxilo terminal de un aminoácido en C-terminal, están amidados preferentemente con, por ejemplo, amoníaco, para formar la amida en C-terminal. Como alternativa, el grupo carboxilo terminal del aminoácido C-terminal puede ser amidado con cualquier amina primaria o secundaria. La amina primaria o secundaria puede, por ejemplo, ser un grupo alquilo, especialmente un alquilo C₁-C₄ ramificado o no ramificado, o una arilamina. De acuerdo con lo anterior, el aminoácido en el extremo C-terminal del péptido puede convertirse en un grupo amido, N-metilamido, etilamido N-, N, N-dimetilamido, N, N-dietilamido, N-metil-N-etilamido, N- fenilamido o N-fenil-N-etilamido. Los grupos carboxilato libres de los residuos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico que no están en el extremo C-terminal de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención también pueden ser amidados dondequiera que estén dentro del péptido. La amidación en estas posiciones internas puede ser con amoníaco o con cualquiera de las aminas primarias o secundarias descritas anteriormente.

La actividad mu-opioide puede evaluarse mediante el ensayo de unión de radioligandos a los receptores mu-opioides clonados o mediante bioensayos con ileon de cobaya (Schiller et al., Eur. J. Med. Chem., 35:895-901, 2000; Zhao et al., J Pharmacol Exp Ther 307:947-954, 2003). La activación del receptor mu-opioide típicamente provoca un efecto analgésico.

Se prefiere un péptido catiónico aromático que no tiene actividad agonista del receptor opioide mu. Por ejemplo, durante el tratamiento a largo plazo, tales como en un estado de enfermedad o afección crónica, el uso de un péptido catiónico aromático que activa el receptor opioide mu puede estar contraindicado. En estos casos, los efectos potencialmente adversos o adictivos de la péptido catiónico aromático pueden impedir el uso de un péptido catiónico aromático que active el receptor opioide mu en el régimen de tratamiento de un paciente humano u otro mamífero. Los posibles efectos adversos pueden incluir sedación, estreñimiento y depresión respiratoria. En tales casos, una péptido catiónico aromático que no active el receptor opioide mu puede ser un tratamiento apropiado.

Los péptidos que no tienen actividad agonista del receptor mu-opioide generalmente no tienen un residuo de tirosina o un derivado de tirosina en el extremo N-terminal (es decir, la posición de aminoácido 1). El aminoácido en el extremo N-terminal puede ser cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural distinto de tirosina. En una forma de realización, el aminoácido en el extremo N-terminal es fenilalanina o sus derivados, a modo de ejemplo derivados de fenilalanina incluyen 2'-metilfenilalanina (MMP), 2', 6'-dimethylphenylalanine (DMP), N, 2', 6'-trimethylphenylalanine (TMP), y 2'-hidroxi-6'-metilfenilalanina (Hmp).

Un ejemplo de un péptido catiónico aromático que no tiene actividad agonista del receptor mu-opioide tiene la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (denominado en este documento "SS-20"). Como alternativa, la fenilalanina N-terminal puede ser un derivado de fenilalanina tal como 2', 6'-dimetilfenilalanina (2'6'Dmp). SS-01 que contiene 2', 6'-dimetilfenilalanina en la posición aminoacídica 1 tiene la fórmula 2', 6'-DMP-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En una realización, la secuencia de aminoácidos de SS-02 se reordena de tal manera que Dmt no está en el extremo N-terminal. Un ejemplo of este péptido catiónico aromático que no tiene actividad agonista del receptor mu-opioide tiene la fórmula D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31).

Síntesis de los péptidos

Los péptidos útiles en la presente invención pueden sintetizarse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados para la síntesis química de la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart and Young en Solid Phase Peptide Synthesis, Segunda Edición, Pierce Chemical Company (1984), y en Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, Nueva York (1997).

Usos profilácticos y terapéuticos de péptidos catiónicos aromáticos.

General. Los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención son útiles para prevenir o tratar la enfermedad. Específicamente, la invención proporciona procedimientos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina se asocia generalmente con la diabetes de tipo II, enfermedad de las arterias coronarias, disfunción renal, aterosclerosis, obesidad, hiperlipidemia e hipertensión esencial. La resistencia a la insulina también se asocia con el hígado graso, que puede progresar a inflamación crónica (EHNA; "esteatohepatitis no alcohólica"), fibrosis y cirrosis. Acumulativamente, los síndromes de resistencia a la insulina, incluyendo, entre otros, la diabetes, subyacen a muchas de las principales causas de la morbilidad y la muerte de las personas mayores de 40 años de edad. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona procedimientos para la prevención y / o tratamiento de la resistencia a la insulina y síndromes asociados en un sujeto que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido catiónico aromático a un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, se puede administrar un sujeto composiciones de péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención en un esfuerzo para mejorar la sensibilidad de los tejidos de músculo esquelético de mamíferos a la insulina. En una forma de realización, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención son útiles para prevenir la obesidad inducida por fármacos, la resistencia a la insulina, y / o la diabetes, cuando el péptido se administra con un fármaco que muestra un efecto secundario de causar una o más de estas afecciones (por ejemplo, olanzapina, Zyprexa®).

Determinación del efecto biológico del agente terapéutico a base de péptidos aromáticos catiónicos. En diversas formas de realización de la invención, se realizan ensayos adecuados *in vitro* o *in vivo* para determinar el efecto de un agente terapéutico basado en péptido catiónico aromático específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado en un sujeto. En diversas formas de realización, los ensayos *in vitro* se pueden realizar con células representativas del tipo (s) implicado en el trastorno del sujeto, para determinar si un agente terapéutico basado en péptido catiónico aromático dado ejerce el efecto deseado sobre el tipo (s) celular. Los compuestos para uso en terapia se pueden probar en sistemas de modelos animales adecuados que incluyen, pero no se limitan a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, y similares, antes de la prueba en sujetos humanos. Del mismo modo, para *in vivo* prueba, cualquiera de los sistema de modelo animal conocido en la técnica se puede utilizar antes de la administración a sujetos humanos. El aumento o disminución de la resistencia a la insulina o sensibilidad se puede detectar fácilmente mediante la cuantificación de peso corporal, ayuno / ácido graso libre de glucosa / insulina, tolerancia a la glucosa (PTOG), la sensibilidad a la insulina del músculo *in vitro*, los marcadores de la señalización

de la insulina (por ejemplo, Akt-P, el IRS-P), la función mitocondrial (por ejemplo, la respiración o las emisiones de H_2O_2), los marcadores de estrés oxidativo intracelular (por ejemplo, la peroxidación lipídica, la relación GSH / GSSG o actividad aconitasa) o la actividad de la enzima mitocondrial.

5 *Procedimientos profilácticos.* En un aspecto, la invención se puede usar para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con la resistencia a la insulina en los tejidos del músculo esquelético, por administración al sujeto de un péptido catiónico aromático que modula una o más síntomas o marcadores de resistencia a la insulina, *por ejemplo*, el peso corporal, los ácidos grasos de la glucosa en ayunas / insulina / free, tolerancia a la glucosa (SOG), *in vitro* sensibilidad a la insulina muscular, marcadores de señalización de la insulina (por ejemplo, Akt-P, el IRS-P), la función mitocondrial (*Por ejemplo*, la respiración o Emisiones de H_2O_2), los marcadores de estrés oxidativo intracelular (por ejemplo, la peroxidación lipídica, la relación GSH / GSSG o actividad aconitasa) o la actividad de la enzima mitocondrial.

15 Los sujetos en riesgo de una enfermedad que es causada o contribuyó a la función mitocondrial aberrante o resistencia a la insulina se pueden identificar por, *por ejemplo*., Cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico como se describe aquí. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos de péptidos catiónicos aromáticos se administran a un sujeto susceptible a, o de otra manera en riesgo de una enfermedad o afección en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo bioquímicos, histológicos y / o los síntomas conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que presentan durante el desarrollo de la enfermedad. La administración de un aromático-catiónico profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, de tal manera que una enfermedad o trastorno se evita o, Como alternativa, retrasa en su progresión. Dependiendo del tipo de aberración, *por ejemplo*, un péptido catiónico aromático que actúa para aumentar o mejorar la función mitocondrial se puede utilizar para tratar el sujeto. El compuesto apropiado puede determinarse basándose en ensayos de selección descritos en el presente documento.

30 *Procedimientos terapéuticos.* En otro aspecto, la invención puede utilizarse para modular la resistencia a la insulina o sensibilidad en un sujeto con fines terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un sujeto que se sospecha de, o que ya sufre de una enfermedad como en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y / o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Estos procedimientos moduladores se pueden realizar *in vitro* (*por ejemplo*, cultivando la célula con el péptido catiónico aromático) o, Como alternativa, *in vivo* (*por ejemplo*, mediante la administración del péptido catiónico aromático a un sujeto). Como tal, la invención proporciona procedimientos de tratamiento de un individuo aquejado de una enfermedad asociada a la resistencia a la insulina o trastorno.

Modos de Administración y Dosis eficaces

40 Cualquier procedimiento conocido por los en la técnica para poner en contacto una célula, órgano o tejido con un péptido se puede emplear. Los procedimientos adecuados incluyen *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* procedimientos. Los procedimientos *in vivo* incluyen típicamente la administración de un péptido catiónico aromático, tales como los descritos más arriba, a un mamífero, preferentemente un ser humano. Cuando se usa *in vivo* para la terapia, los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención se administran al sujeto en cantidades eficaces (*es decir*., Cantidades que han deseado efecto terapéutico). Por lo general se administran por vía parenteral o por vía oral. La dosis y el régimen de dosificación dependerá del grado de la enfermedad relacionada con la resistencia a la insulina o trastorno, las características de la péptido catiónico aromático particular utilizado, *por ejemplo*, su índice terapéutico, el sujeto, y la historia del sujeto.

50 La cantidad eficaz puede determinarse durante los ensayos preclínicos y ensayos clínicos mediante procedimientos familiares para los médicos y los clínicos. Una cantidad eficaz de un péptido útil en los procedimientos de la presente invención, preferentemente en una composición farmacéutica, se puede administrar a un mamífero en necesidad del mismo por cualquiera de un número de procedimientos bien conocidos para la administración de compuestos farmacéuticos. El péptido se puede administrar sistémicamente o localmente.

60 Los péptidos catiónicos aromáticos descritos en este documento pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas para la administración, por separado o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno descrito en la presente memoria. Tales composiciones incluyen típicamente el agente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

65 Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de rutas de administración incluyen parenteral (*por ejemplo*., Intravenosa, intradérmica,

intraperitoneal o subcutánea), oral, por inhalación, transdérmica (tópica), la administración transmucosa. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. Para conveniencia del paciente o el tratamiento médico, la formulación de dosificación se puede proporcionar en un kit que contiene todo el equipo necesario (*por ejemplo*, viales de medicamentos, viales de diluyente, jeringas y agujas) para un curso de tratamiento (*por ejemplo*, 7 días de tratamiento).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (donde soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, una composición para la administración parenteral debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de péptidos catiónicos aromáticos pueden incluir un portador, que puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y adecuado mezclas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, thiomerasol, y similares. El glutatión y otros antioxidantes pueden ser incluidos para evitar la oxidación. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos típicos de preparación incluyen secado al vacío y secado por congelación, que puede producir un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, *por ejemplo*, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y / o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propelente adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales procedimientos incluyen los descritos en La patente de EE.UU. N° 6,468,798.

La administración sistémica de un compuesto terapéutico como se describe en el presente documento también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para transmucosa o transdérmica, penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de aerosoles nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica. En una forma de realización, la administración transdérmica puede realizarse mi

iontoforesis.

Una proteína o péptido terapéutico se pueden formular en un sistema portador. El vehículo puede ser un sistema coloidal. El sistema coloidal puede ser un liposoma, un vehículo bicapa de fosfolípidos. En una realización, la proteína terapéutica está encapsulado en un liposoma, mientras que el mantenimiento de la integridad de la proteína. Como un experto en la técnica apreciará, hay una variedad de procedimientos para preparar liposomas. (VerLichtenberg et al., *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988);Anselem et al., *Liposomas Tecnología*, CRC Press (1993)). Formulaciones de liposomas pueden retrasar aclaramiento y aumentar la captación celular (Ver Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8) :915-923 (2000)).

El portador también puede ser un polímero, por ejemplo, una matriz de polímero biodegradable, biocompatible. En una realización, la proteína terapéutica puede ser embebido en la matriz de polímero, mientras que el mantenimiento de la integridad de la proteína. El polímero puede ser natural, tales como polipéptidos, proteínas o polisacáridos, o sintético, tales como los ácidos α -hidroxi poli. Los ejemplos incluyen portadores hechos de, por ejemplo, colágeno, fibronectina, elastina, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, polisacáridos, fibrina, gelatina, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización, el polímero es el ácido poli-láctico (PLA) o copoli láctico / ácido glicólico (PGLA). Las matrices poliméricas pueden ser preparados y aislados en una variedad de formas y tamaños, incluyendo microesferas y nanoesferas. Formulaciones de polímeros pueden conducir a la prolongada duración del efecto terapéutico. (Ver Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8) :915-923 (2000)). Una formulación de polímero para la hormona de crecimiento humana (hGH) se ha usado en ensayos clínicos. (Ver Kozarich y Rich, *Biología Química*, 2:548-552 (1998)).

Ejemplos de formulaciones de liberación sostenida de microesferas de polímero se describen en PCT publication WO 99/15154 (Tracy et al.), Las patentes de EE.UU. N° 5,674,534y 5,716,644 (both to Zale et al.), PCT publication WO 96/40073 (Zale et al.), Y PCT publication WO 00/38651 (Shah et al.). Las patentes de EE.UU. N° 5,674,534y 5,716,644y PCT publication WO 96/40073describir una matriz polimérica que contiene partículas de eritropoyetina que se estabilizan contra la agregación con una sal.

En algunas formas de realización, los compuestos terapéuticos se preparan con vehículos que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido polyacetic. Tales formulaciones se pueden preparar usando técnicas conocidas. Los materiales también se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células específicas con anticuerpos monoclonales a antígenos específicos de células) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4,522,811.

Los compuestos terapéuticos se pueden formular también para mejorar la administración intracelular. Por ejemplo, los sistemas de suministro de liposomas se conocen en la técnica, véase, *por ejemplo*, Chonn y Cullis, "Avances recientes en sistemas de liberación de liposomas," *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708 (1995); Weiner, "Los liposomas para la proteína de entrega: Selección de fabricación y desarrollo procesos" *Immunomethods* 4 (3) 201-9 (1994); y Gregoriadis, "Los liposomas Ingeniería de entrega de la droga: Progreso y problemas," *Trends Biotechnol.* 13 (12) :527-37 (1995). Mizguchi et al., *Cancer Lett.* 100:63-69 (1996), Describe el uso de liposomas fusogénicos para entregar una proteína a las células tanto *in vivo* y *in vitro*.

Dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Aunque los compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos pueden utilizarse, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la CI50 (*es decir*, La concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media-máxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de

alta resolución.

Típicamente, una cantidad eficaz de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención, suficientes para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, intervalo de aproximadamente 0.000001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal por día. Preferentemente, los intervalos de dosificación son desde aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg / kg de peso corporal o 10 mg / kg de peso corporal cada día, cada dos días o cada tres días o dentro del rango de 1 a 10 mg / kg cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. En una forma de realización, una única dosis de péptido oscila entre 0.1-10,000 microgramos por kg de peso corporal. En una forma de realización, las concentraciones de péptido-aromáticos catiónico en una gama portadora 0,2 a 2.000 microgramos por mililitro entregado. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez al día o una vez a la semana. Intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de glucosa o insulina en el sujeto y ajustar la dosificación o administración en consecuencia. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una glucemia en ayunas deseada o la concentración de insulina en ayunas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces es necesario hasta la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el sujeto muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, el paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido catiónico aromático puede ser definida como una concentración de péptido en el tejido diana de 10^{-11} a 10^{-6} molar, por ejemplo, aproximadamente 10^{-7} molar. Esta concentración puede ser entregado por dosis sistémicas de 0,01 a 100 mg / kg o dosis equivalente por área de superficie corporal. El calendario de dosis sería optimizado para mantener la concentración terapéutica en el tejido diana, lo más preferentemente mediante la administración diaria o semanal única, pero también incluyendo la administración continua (por ejemplo, la infusión parenteral o aplicación transdérmica).

El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyendo, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y / o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

El mamífero tratado de acuerdo con la invención puede ser cualquier mamífero, incluyendo, por ejemplo, animales de granja, tales como ovejas, cerdos, vacas y caballos; animales de compañía, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, tales como ratas, ratones y conejos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Péptidos catiónicos aromáticos marcados y Procedimientos de Diagnóstico

En el presente documento se describen procedimientos que comprenden proporcionar un péptido catiónico aromático marcado a una célula o un sujeto, en el que el péptido tiene un marcador detectable conjugado a un péptido. En una forma de realización, una combinación específica de una etiqueta en particular con un péptido particular permite la detección de la localización del péptido dentro de una célula.

Péptidos catiónicos aromáticos marcados. En una forma de realización, los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención están acoplados con un resto de El marcador, es decir, grupo detectable. El grupo marcador o detectable particular, conjugado con el péptido catiónico aromático de la invención no es un aspecto crítico de la invención, con tal de que no interfiera significativamente con la actividad específica del péptido catiónico aromático de la presente invención. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables han sido bien desarrollados en el campo de los inmunoensayos y de formación de imágenes, en general, la mayoría de cualquier etiqueta útil en tales procedimientos puede aplicarse a la presente invención. Por lo tanto, una etiqueta es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, medios eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (*por ejemplo*, Dynabeads™), tintes fluorescentes (*por ejemplo*, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (*por ejemplo*, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{112}En , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), otros agentes de imagen, tales como microburbujas (para imágenes de ultrasonido), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , (para tomografía por emisión de positrones), $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}En (para tomografía por emisión de fotón único), enzimas (*por ejemplo*, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras habitualmente utilizado en un ELISA), y las etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o de plástico (*por ejemplo*, poliestireno, polipropileno, látex, y similares) cuentas. Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen Las patentes de EE.UU. N° 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; y 4,366,241, Cada uno incorporado en este documento por referencia en su totalidad y para todos los propósitos. Consulte Manual de Fluorescent Probes y productos químicos de investigación (6ª Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.)..

El marcador puede estar acoplado directamente o indirectamente al componente deseado de un ensayo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, una amplia variedad de etiquetas

se puede utilizar, con la elección del marcador dependiendo de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible, y las disposiciones de eliminación.

Los marcadores no radiactivos a menudo se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se une a un anti-ligando (*por ejemplo*, Estreptavidina) molécula que es inherentemente detectable o unido covalentemente a un sistema señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Un número de ligandos y anti-ligandos se puede utilizar. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina, y cortisol, puede ser utilizado en conjunción con los marcados, de origen natural anti-ligandos.

Las moléculas también se pueden conjugar directamente con compuestos generadores de señal, *por ejemplo*, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como etiquetas serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, estererasas y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes útiles como restos de marcaje, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, y similares. Los compuestos quimioluminiscentes útiles como restos de marcaje, incluyen, pero no se limitan a, *por ejemplo*, luciferina, y 2,3-dihidroftalazinedionas, *por ejemplo*, luminol. Para una revisión de diversos etiquetado o sistemas que producen la señal que se puede utilizar, ver, la patente de EE.UU. N° 4,391,904.

Los medios para detectar marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, donde el marcador es un marcador radiactivo, medios para la detección incluyen un contador de centelleo o película fotográfica como en autorradiografía. Cuando El marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente marcadores colorimétricos simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado con El marcador. Por lo tanto, en diversos ensayos de tira reactiva, el oro conjugado aparece a menudo rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Aplicaciones diagnósticas de péptidos aromáticos catiónicos marcados

En una realización, el procedimiento comprende administrar el péptido catiónico aromático marcado a una célula o un sujeto y el logro de una localización deseada. En una forma de realización de la invención, el procedimiento comprende administrar el péptido catiónico aromático marcado a una célula humana y el logro de una localización deseada. Una localización deseada se refiere a un péptido catiónico aromático marcado está secuestrado específicamente en un componente celular deseada, por ejemplo, la mitocondria. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier número de péptidos catiónicos aromáticos marcados de la presente invención puede ser entregado a una célula y el procedimiento permanece dentro del espíritu y alcance de la presente invención. Además, los expertos en la técnica reconocerán que las imágenes celular diversos tipos de células de diversos tipos de fuentes se encuentran dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

Los péptidos catiónicos aromáticos marcados de la invención se pueden usar *in vitro* y / o *in vivo* para detectar moléculas diana de interés. En muchos casos, los péptidos catiónicos aromáticos marcados simplemente se pueden agregar a las muestras de ensayo en un ensayo homogéneo, no requiere la adición de múltiples reactivos y / o etapas de lavado antes de la detección de la diana. Los péptidos catiónicos aromáticos marcados de la invención pueden ponerse en contacto con moléculas diana o compartimentos celulares *in vitro* por simple adición a una muestra de ensayo que contiene las moléculas diana o células. Las muestras de prueba para *in vitro* ensayos pueden ser, *por ejemplo*, bibliotecas moleculares, lisados de células, eluidos de análisis de columnas cromatográficas, y similares. La *in vitro* ensayo a menudo tiene lugar en una cámara, tal como, *por ejemplo*, un pocillo de una placa de múltiples pocillos, un tubo de ensayo, un tubo Eppendorf, una celda del espectrofotómetro, el conducto de un sistema analítico, canales de un sistema de microfluidos, una matriz abierta, y similares.

Cuando se administran péptidos aromáticos catiónicos marcados de la invención a las células vivas, la unión puede tener lugar con los objetivos de la superficie celular o dentro de la propia célula, por ejemplo, el péptido catiónico aromático marcado se transfiere a la célula para entrar en contacto con una molécula diana intracelular. En algunos casos, el péptido catiónico aromático marcado puede penetrar en una célula sospechosa de contener una diana seleccionada de forma pasiva por la simple exposición de la célula a un medio que contiene los péptidos catiónicos aromáticos marcados. En otras formas de realización, el péptido catiónico aromático marcado se transfiere activamente en la célula mediante mecanismos conocidos en la técnica, tales como, *por ejemplo*, poración, inyección, transducción junto con péptidos de transferencia, y similares.

Después del contacto de las células con los péptidos catiónicos aromáticos marcados, los procedimientos pueden comprender la irradiación de la célula con una fuente de energía. En una forma de realización, la fuente de energía es una fuente de luz. En una forma de realización, el agente de formación de imágenes de la péptido catiónico aromático marcado es activado por la fuente de energía. En una forma de realización, el agente de formación de

imágenes de la péptido catiónico aromático marcado emite una señal detectable cuando es iluminado por la fuente de energía. En una forma de realización de la invención, el agente de formación de imágenes emite una fluorescencia detectable en respuesta a la fuente de energía.

5 En una forma de realización de la invención, la fluorescencia emitida por el agente de formación de imágenes en respuesta a la fuente de luz puede observarse y medirse. En una forma de realización de la invención, se observa la fluorescencia y se mide con un microscopio confocal. Los expertos en la técnica reconocerán que los diversos dispositivos utilizados para observar y medir la fluorescencia están dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

10

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes en modo alguno.

15

Ejemplo 1 - Disfunción mitocondrial en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas

Para determinar el impacto potencial de la obesidad inducida por la dieta en el control del equilibrio redox celular en el músculo esquelético, se desarrolló un nuevo enfoque para medir la tasa de emisión de H_2O_2 de la mitocondria en haces de fibras de músculo esquelético permeabilizadas. Ver Anderson et al., J. Clin Invest (Doi: 10.1172/JCI37048). Durante la respiración basal (estado 4) soportada por los sustratos del complejo unidos a NADH, la tasa de formación de superóxido es baja, lo que representa del 0,1 al 0,5% del total de uso de O_2 (Anderson & Neuffer, Am J Physiol Cell Physiol 290, C844-851 (2006); St-Pierre et al., J Biol Chem 277, 44784-44.790 (2.002)). Sin embargo, la respiración soportada exclusivamente por succinato, un sustrato del complejo II unido a FDH_2 , provoca altos índices de producción de superóxido mediante la generación de electrones que fluye de regreso a los complejos I (Anderson & Neuffer, Am J Physiol Cell Physiol 290, C844-851 (2006); St-Pierre et al., J Biol Chem 277, 44784-44.790 (2.002); Liu et al., J Neurochem 80, 780-787 (2002); Turrens et al., Biochem J 191, 421-427 (1980)). Este ejemplo describe los procedimientos para medir la función mitocondrial en los tejidos musculares permeabilizados y examina los efectos de una dieta rica en grasas sobre la función mitocondrial.

30

Animales y reactivos. Treinta ratas Sprague-Dawley se obtuvieron del Charles River Laboratory (Wilmington, MA) y se alojaron en una temperatura (22 ° C) y una sala de luz controlada y libre acceso a comida y agua. Veinte de las treinta ratas originales se mantuvieron con una dieta rica en grasas (60%) ((Research Dyets, Bethlehem, PA). El músculo esquelético se obtuvo a partir de animales anestesiados (100 mg / kg ip de ketamina-xilazina). Después de la cirugía, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical con anestesia. El reactivo Ultra Amplex Red se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). La estigmatelina y la peroxidasa de rábano (HRP) se obtuvieron de Fluka Biochemika (Buchs, Suiza), y todos los demás productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de East Carolina University Institutional Animal Care and Use Committee.

40

Preparación de haces de fibras musculares permeabilizadas. Brevemente, pequeñas porciones (25 mg) del músculo sóleo, RG, y WG se diseccionaron y se colocaron en tampón enfriado con hielo X, que contiene 60 mM de K-MES, 35 mM de KCl, 7,23 mM de K_2EGTA , CaK 2,77 mM M_2EGTA , imidazol 20 mM, DTT 0,5 mM, taurina 20 mM, 5,7 mM de ATP, 15 mM de PCR, y 6,56 mM de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (pH 7,1, 295 mOsm / kg H_2O). El músculo se cortó del tejido conjuntivo y se cortaron haces de fibras (2 x 7 mm, 4-8 mg de peso húmedo). Con un par de pinzas de punta de aguja bajo un microscopio de disección, las fibras se separaron suavemente una de otra para maximizar el área de superficie del haz de fibras, dejando sólo pequeñas regiones de contacto. Para la permeabilización de las miofibras, cada haz de fibras se colocó en tampón enfriado con hielo X que contiene 50 g / ml de saponina y se incubó en un agitador rotatorio durante 30 min a 4 ° C. Tras la permeabilización, los haces de las fibras permeabilizadas (PmFBs) se lavaron en Tampón A en hielo Z que contiene (en mM) 110 K-MES, 35 de KCl, 1 EGTA, 10 K_2HPO_4 , 3 de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 mg / ml de BSA, 0,1 glutamato y malato 0,05 (pH 7,4, 295 mOsm) y se mantuvieron en tampón Z en un rotador a 4 ° C hasta su análisis (<2 h).

50

Mediciones de la respiración mitocondrial y emisión de H_2O_2 . Las mediciones respirométricas de alta resolución se realizaron a 30 ° C en tampón Z utilizando Oroboros O_2K Oxygraph (Innsbruck, Austria). La emisión de H_2O_2 de la mitocondria se midió a 30 ° C durante el estado 4 de la respiración en Tampón Z (10 μg / ml de oligomicina) al controlar continuamente la oxidación de Amplex Red usando un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Ltd.) con control de temperatura y agitación magnética a > 1000 rpm. El reactivo Amplex Red reacciona con H_2O_2 en una estequiometría 1:1 catalizada por HRP para dar el compuesto fluorescente resorufina y equivalente molar de O_2 . La resorufina tiene características de excitación / emisión a 563 nm/587 nm y es extremadamente estable una vez formada. Después de establecer la fluorescencia basal (sólo reactivos), la reacción se inició por adición de un haz de fibras permeabilizada a 300 μl de tampón Z que contiene 5 μM de Amplex Red y 0,5 U / ml de HRP, con succinato a 37 ° C. Para los experimentos de succinato, el haz de fibras se lavó brevemente en tampón Z sin sustrato para eliminar el piruvato residual y el malato del lavado. Cuando se indique, se incluyeron 10 μg / ml oligomicina se incluyó en el tampón de reacción para bloquear la ATP sintasa y garantizar respiración de estado 4. A la conclusión de cada experimento, las PmFB se lavaron en ddH_2O para eliminar las sales y se liofilizó en un liofilizador

65

(Labconco). La tasa de respiración se expresa como $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso seco y la emisión de H_2O_2 de la mitocondria expresa como $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

5 *Análisis estadísticos.* Los datos se presentan como medias \pm SE. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un ANOVA de una vía con el procedimiento de Student-Newman-Keuls para el análisis de la significación entre los grupos. El nivel de significación se fijó en $P < 0,05$.

10 *Resultados.* Para proporcionar una mejor medida del potencial del sistema respiratorio para generar y / o emitir H_2O_2 en relación con el progresivamente creciente flujo metabólico (sin un cambio en la demanda de ATP), los cambios en emisión de H_2O_2 en respuesta a la titulación de succinato en la respiración el estado 4 con el apoyo de los sustratos del complejo I piruvato y malato se monitorizaron continuamente. Por el trazado de la tasa de H_2O_2 de emisión frente a la concentración de succinato, se razonó que un desplazamiento hacia la izquierda en la curva indicaría un aumento, mientras que un desplazamiento hacia la derecha indicaría una disminución, en el potencial emisor oxidante del sistema respiratorio. Las figuras 1A muestran una traza representativa de comparación de las

15 tasas de emisión de H_2O_2 de la mitocondria de fibras musculares esqueléticas permeabilizadas preparadas a partir de las ratas alimentadas con comida estándar, grasa durante 3 días o comida alta en grasa durante 3 semanas. El experimento se inició mediante la adición de una pequeña cantidad de glutamato y malato de (g / m) a un haz de fibras desenergizado (FB), y seguido por el aumento de las concentraciones sucesivamente (en mM) de succinato.

20 Sorprendentemente, el cambio de las ratas con una dieta estándar rica en hidratos de carbono a 100% de grasa (manteca de cerdo) durante 3 días o una dieta con alto contenido en grasas 60% durante 3 semanas indujo un notable aumento de 3 a 4 veces en la tasa máxima de emisiones de H_2O_2 de la mitocondria con poco o ningún cambio en la sensibilidad (1A y Fig. 1B). La adición de rotenona a la conclusión de la titulación del succinato eliminó emisión de H_2O_2 (no mostrado), lo que confirma el complejo I como la fuente de la producción de superóxido a partir

25 tanto de ratas control como alimentadas con comida rica en grasas. El potencial emisor oxidante de las mitocondrias también se midió por titulación de piruvato / malato en presencia de antimicina (inhibidor del complejo III), de nuevo revelando una tasa máxima de emisión de $\text{H}_2\text{O}_2 > 2$ veces mayor en ratas alimentadas con comida con alto contenido en grasas (Figura 2). Estos hallazgos demuestran que el potencial emisor oxidante mitocondrial en el músculo esquelético se incrementa notablemente en un plazo de solo tres días después de la transición a una dieta

30 rica en grasas.

Ejemplo 2 - Efectos de la péptidos aromáticos catiónicos sobre la producción de ROS en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas

35 La producción de superóxido es mayor durante la respiración basal apoyado por el ácido graso en comparación con el metabolismo de hidratos de carbono, aumentando la posibilidad de que el aumento de potencial emisor oxidante de las mitocondrias inducido por una dieta con alto contenido en grasas puede desencadenarse por una elevación persistente en la producción de oxidantes (es decir, por un mecanismo de liberación de ROS inducida por ROS). Para comprobar esta hipótesis, se examinaron los efectos de el péptido aromático catiónico SS-31 sobre la función

40 mitocondrial en ratas alimentadas con alto contenido graso. SS-31 es único en cuando a que se localiza específicamente dentro de la membrana mitocondrial interna donde secuestra ROS sin afectar al potencial de membrana o al control respiratorio. Este pequeño péptido antioxidante se ha demostrado que reduce eficazmente los ROS en corazones sometidos a aturdimiento miocárdico (Zhao et al., J Biol Chem. 279, 34682-34690 (2004)). En las células de los islotes pancreáticos después del trasplante (Thomas et al., Journal of the American Society of

45 Nephrology 16 16, TH-FC067 (2005)), y en modelos animales de enfermedad de Parkinson y de esclerosis lateral amiotrófica (Petri et al., JNeurochem 98, 1141-1148 (2006); Szeto et al., AAPS J 8, E521-531 (2006)).

50 Diez ratas del grupo alimentado con dieta con alto contenido de grasa recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de SS-31 disuelto en solución salina tamponada con fosfato (1.5 mg / kg). Se establecieron curvas de respuesta a la dosis para SS-31 *in vitro* (Figura 3A) e *in vivo* (Figura 3B). La función mitocondrial se midió de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Ambas curvas de respuesta a la dosis revelaron una reducción superior al 50% en las emisiones de H_2O_2 mitocondriales durante la respiración soportada por succinato.

55 A continuación, se administró a las ratas una dieta con alto contenido en grasas (60%) durante seis semanas, con o sin la administración diaria de SS-31. Los experimentos de titulación de succinato realizados en fibras permeabilizadas de nuevo revelaron un notable aumento de 3 veces la tasa máxima de emisiones de H_2O_2 en las ratas alimentadas con dietas ricas en grasas (Figura 3C). Las fibras permeabilizadas de las ratas alimentadas con dietas con alto contenido en grasas también generaron una tasa de emisión de H_2O_2 casi 2 veces mayor durante la respiración basal con el apoyo de palmitoil-carnitina (figura 3D). Sin embargo, en las ratas alimentadas con alto contenido de grasa tratadas con SS-31, el aumento de potencial emisor oxidante mitocondrial durante la respiración con soporte de succinato y de palmitoil-carnitina se impidió por completo (Fig. 3C y 3D). La respiración basal con soporte de piruvato / malato se incrementó ligeramente en fibras de ratas alimentadas con dietas de alto contenido en grasas, lo que sugiere un cierto grado de desacoplamiento (Figura 3E). Sin embargo, en las ratas alimentadas con dietas de alto contenido en grasas, las tasas basales de respiración con soporte de

65 piruvato/malato o de palmitoil-carnitina no se vieron afectadas por el tratamiento con SS-31 (Fig. 3E y 3F), lo que indica que la normalización de las emisiones de H_2O_2 con el tratamiento SS-31 no estaban mediadas por un

aumento de la pérdida de protones. El tratamiento con SS-31 tampoco afectó a la ganancia de peso en ratas alimentadas con alto contenido de grasa (datos no presentados). Colectivamente, estos hallazgos demuestran que la administración de un antioxidante específico para la mitocondria, tales como los péptidos catiónicos aromáticos de la invención, es suficiente para prevenir o compensar el aumento del potencial emisor oxidante de las mitocondrias inducido por una dieta rica en grasas. Como tal, la administración de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención es útil en procedimientos de prevención o tratamiento de resistencia a la insulina causada por la disfunción mitocondrial en sujetos mamíferos.

Se reconoce cada vez más que la localización intracelular y la actividad de muchas proteínas (por ejemplo, receptores, quinasas / fosfatasa, factores de transcripción, etc) se controla de forma reversible por el estado de oxidación de residuos que contienen tioles (-SH) específicos, lo que lleva al concepto que los cambios en el medio ambiente redox intracelular afectan a la situación biológica global de la célula (Schafer y Buettner, Free Radic Biol Med 30, 1191-1212 (2001)). El glutatión (GSH), el tampón redox más abundante en las células, se oxida de forma reversible a GSSG mediante la glutatión peroxidasa en presencia de H_2O_2 , y se reduce de nuevo a GSH por la glutatión reductasa con electrones donados por NADPH. La relación de GSH / GSSG es muy dinámica, lo que refleja en gran medida el medio ambiente global redox de la célula.

Homogeneizados de proteína se prepararon por homogeneización de 100 mg de músculo congelado en un tampón que contenía en mM: 10 de Tris, 1 EDTA, EGTA 1, 2 Ortovanadato Na, 2 Pirofosfato Na, 5 de NaF, cóctel inhibidor de proteasa (Complete) a pH 7,2. Después de la homogeneización, se añadió 1% de Triton X-100 a la suspensión de proteína, se agitó y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los residuos insolubles. Para la medición de GSSG, el tejido se homogeneizó en una solución que contiene metil-2-vinilpiridinio triflato 20 mM para secuestrar todos los tioles reducidos en la muestra. Después, se midieron los niveles de GSH total y de GSSG utilizando los reactivos y el equipo de calibración proporcionado por el ensayo de GSH / GSSG (Oxis Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones, según sea necesario.

Sorprendentemente, se encontró que la alimentación con un alto contenido en grasa resultó en un ~ 30% de reducción en el contenido total de glutatión celular (GSH_t) Independientemente del tratamiento con SS31 (Figura 3G), lo que demuestra que el consumo de niveles altos de grasa compromete la capacidad tampón redox mediada por GSH en el músculo esquelético. Para establecer un vínculo entre el aumento de las emisiones de oxidante mitocondrial provocadas por la dieta con alto contenido en grasas y su efecto sobre el medio ambiente global redox del músculo esquelético, se midieron tanto GSH como GSSG en el músculo esquelético de ratas alimentadas con comida estándar y rica en grasas con dos condiciones; después de 10 h de ayuno y 1 h después de la administración de una carga de glucosa estándar (sonda oral, 10 h en ayunas). En los controles alimentados con comida, la ingesta de glucosa provocó una reducción de ~ 50% en la relación GSH / GSSG (normalizada con respecto a GSH_t , figura 3H), presumiblemente refleja un cambio agudo a un estado más oxidado en respuesta al aumento en el metabolismo de la glucosa estimulada por la insulina. En ratas alimentadas con dietas ricas en grasas, la relación GSH / GSSG ya se redujo en un ~ 50% de las 10 h de ayuno estado relativo al comida controles alimentados y volvió a disminuir en respuesta a la ingesta de glucosa. El tratamiento con SS-31, sin embargo, conserva la relación GSH / GSSG cerca de los niveles control, incluso en respuesta a la ingestión de glucosa. Estos hallazgos demuestran que una dieta rica en grasas desplaza el ambiente redox intracelular en el músculo esquelético a un estado más oxidado. El tratamiento con SS-31 fue capaz de conservar el estado redox intracelular en el músculo esquelético, presumiblemente por secuestro de oxidantes primarios y, de ese modo, compensa la reducción de la capacidad tampón redox mediada por GSH total inducida por una dieta rica en grasas. Así, la administración de un antioxidante dirigido a la mitocondria, tales como los péptidos catiónicos aromáticos de la invención, o bien impide o bien compensa la disfunción metabólica que se desarrolla en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas. Como tal, la administración de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención es útil en procedimientos de prevención o tratamiento de esta disfunción metabólica en sujetos mamíferos.

Ejemplo 3 - Pruebas de tolerancia oral a la glucosa

Para determinar si los cambios derivados de las mitocondriales en el medio ambiente redox intracelular pueden estar relacionados con la etiología de la resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasas, se realizaron pruebas de tolerancia oral a la glucosa en ratas después de la dieta rica en grasas durante seis semanas. El día de los experimentos, la comida se retiró 10 horas antes de la administración de una solución de glucosa de 2 g / kg por sonda nasogástrica. Los niveles de glucosa se determinaron en muestras de sangre entera (Lifescan, Milpitas, CA). Los niveles de insulina en suero se determinaron mediante un kit de ELISA de rata / ratón (Linco Research, St. Charles, MO). Los datos de ayuno se utilizaron para determinar la evaluación del modelo homeostático (HOMA), calculado como la insulina en ayunas (mU / ml) x glucosa en ayunas (mM) / 22,5.

Las respuestas de la glucosa en la sangre (Fig. 4A) y la insulina (Fig. 4B) a la provocación con glucosa oral fueron más elevadas y sostenidas en las ratas alimentadas con comida rica en grasas en comparación con las ratas alimentadas con comida estándar. El tratamiento de las ratas alimentadas con comida rica en grasas con SS-31 normalizó las respuestas de la glucosa en sangre y de la insulina a la provocación de glucosa oral.

El incremento de la evaluación del modelo homeostático (HOMA, figura 4C), y una mayor área bajo las curvas para tanto la glucosa en sangre como la insulina (figura 4D) confirmaron el desarrollo de resistencia a la insulina en ratas alimentadas con alto contenido en grasa. El tratamiento de ratas alimentadas con comida rica en grasas con SS-31 bloqueó completamente el desarrollo de la resistencia a la insulina (Figuras 4C y 4D). A fin de evaluar adicionalmente la sensibilidad a la insulina, el estado de fosforilación de la proteína Akt de señalización de la insulina en el músculo esquelético de los animales se midió después de 10 horas de ayuno o 1 h después de recibir una carga oral de glucosa. En respuesta a la ingestión de glucosa, la fosforilación de Akt aumentó ~ 5 veces en el músculo esquelético de los controles alimentados con comida normal pero se mantuvo sin cambios en las ratas alimentadas con comida con alto contenido en grasa (Figuras 4E y 4F), lo que confirma la presencia de resistencia a la insulina a nivel de señalización de la insulina. El tratamiento de ratas alimentadas con comida rica en grasas con SS-31 conservó completamente la fosforilación de Akt en respuesta a la ingestión de glucosa (Figuras 4E y 4F), lo que indica de nuevo la conservación de sensibilidad a la insulina. Así, la administración de un antioxidante dirigido a la mitocondria, tales como los péptidos catiónicos aromáticos de la invención, impide resistencia a la insulina que se desarrolla en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas. Como tal, la administración de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención es útil en procedimientos de prevención o tratamiento de resistencia a la insulina en sujetos mamíferos.

Ejemplo 4 - Disfunción mitocondrial en sujetos humanos

Para fortalecer el vínculo entre los cambios derivados de la mitocondria en el medio ambiente redox intracelular y la resistencia a la insulina y para ver si el mismo fenómeno se puede trasladar a los seres humanos, se midió el control de emisiones de H₂O₂ de la mitocondria y la respiración en haces de miofibras esqueléticas permeabilizadas obtenidas por biopsia muscular de sujetos varones humanos delgados sensibles a insulina (IMC = 21,6 ± 1,2 kg · m⁻², HOMA = 1,2 ± 0,4) y obesos resistentes a la insulina (IMC = 43,0 ± 4,1 kg · m⁻², HOMA = 2,5 ± 0,7, P <0,05).

Ocho hombres sanos (edades 18-31 y) de razas mixtas se reclutaron para participar en esta investigación: cinco se clasificaron como delgados (IMC ≤ 24,9 kg / m²) y tres se clasificaron como obesos mórbidos (IMC ≥ 35 kg / m²). Todos los participantes eran fumadores sin antecedentes de enfermedad metabólica. Ninguno de los sujetos tenía alguna enfermedad o estaba tomando algún medicamento que se sabe que altere el metabolismo. En el día del experimento, los sujetos acudieron al laboratorio después de ayunar durante la noche (aproximadamente 12 h). Se obtuvo una muestra de sangre en ayunas para la determinación de los niveles de glucosa y de insulina (Labcorps). Se registraron la altura y el peso corporal y se realizaron biopsias de músculo esquelético de la cara lateral del vasto lateral mediante la técnica de biopsia percutánea con aguja con anestesia local subcutánea (lidocaína al 1%). Una parte de las muestras de biopsia se congeló en N₂ líquido para el análisis de proteínas, y otra parte se utilizó para preparar haces de fibras permeabilizadas.

Resultados. Emisión de H₂O₂ de la mitocondria fue de ~ 2 veces mayor en los obesos frente a los delgados en respuesta a la titulación de succinato (figura 5A) y casi 4 veces mayor durante la respiración basal con el apoyo de los ácidos grasos (Figura 5B). A pesar de la diferencia en Emisión de H₂O₂, el uso basal de O₂ fue similar entre los sujetos delgados y obesos (figura 5C); en consecuencia, la tasa de pérdida de radicales libres mitocondriales fue ~ 2 veces más alta durante la respiración basal con soporte de glutamato / malato / succinato y >4 veces con soporte de palmitoil-carnitina (Fig. 5D). El consumo máximo de I₂ estimulado por ADP fue ~ 35% más baja en LAS miofibras permeabilizadas de los sujetos obesos durante la respiración soportados por los sustratos del complejo I glutamato / malato (figura 5C), consistente con la capacidad respiratoria global del músculo esquelético reducida asociada con la obesidad. Por último, al igual que las ratas alimentadas con una dieta rica en grasas, tanto el contenido de GSH celular total como la relación GSH / GSSG fueron ~ 50% más baja en el músculo esquelético de los seres humanos obesos (Figuras 5E y 5F), lo que indica una capacidad total tampón de redox menor y un ambiente redox intracelular decididamente más oxidado.

En resumen, estos hallazgos establecen colectivamente mitocondrial la emisión de ROS por la mitocondria y el desplazamiento resultante a un ambiente redox en el músculo esquelético más oxidado como una causa subyacente de la alta resistencia a la insulina inducida por la dieta rica en grasas. Un aumento en el potencial emisor de H₂O₂ de las mitocondrias parece ser un factor primario que contribuye a este cambio en el entorno redox. Así, la administración de un antioxidante dirigido a las mitocondrias, tales como los péptidos catiónicos aromáticos de la invención, o bien impide o compensa la disfunción metabólica que se desarrolla con la sobrenutrición. Como tal, la administración de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención es útil en procedimientos de prevención o tratamiento de resistencia a la insulina en sujetos humanos.

Ejemplo 5 - Prevención y tratamiento de la resistencia a la insulina por péptidos catiónicos aromáticos de la invención en el modelo de rata Zucker

Para demostrar aún más la prevención de la resistencia a la insulina, por una parte, y el tratamiento de resistencia a la insulina por otro, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención se analizaron en la rata obesa (fa / fa) Zucker, un modelo de resistencia a la insulina inducida por la dieta. En comparación con el modelo de rata Sprague-Dawley alimentada durante 6 semanas con una dieta de alto contenido en grasas (tal como se utiliza en los Ejemplos 1-3), las ratas Zucker obesas desarrollan un grado mucho mayor de obesidad y de resistencia a la insulina. Al igual que en

las ratas alimentadas con dieta con alto contenido de grasa, la disfunción mitocondrial (aumento de la emisión de potencial oxidante) es también evidente en fibras permeabilizadas de ratas Zucker obesas.

5 En primer lugar, para examinar los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención sobre la prevención de la resistencia a la insulina, jóvenes ratas Zucker (~ 3-4 semanas de edad) se administra SS-31 durante aproximadamente 6 semanas. Como estas ratas jóvenes todavía no presentan signos o síntomas de resistencia a la insulina, que proporcionan un modelo útil para evaluar la eficacia de los procedimientos de prevención de la resistencia a la insulina. SS-31 (1,0-5,0 mg / kg de peso corporal) se administra a las ratas mediante administración i.p. u oral (es decir, agua de bebida o por sonda nasogástrica).

10 Se prevé que la administración de SS-31 atenúe o prevenga el desarrollo de resistencia a la insulina e todo el cuerpo y en músculo que normalmente se desarrolla en la rata obesa (fa / fa) Zucker. Los resultados medidos incluyen el peso corporal, los niveles de glucosa en ayunas / insulina / ácido graso libre, tolerancia a la glucosa (SOG), sensibilidad a la insulina *In vitro* en el músculo (incubación), marcadores de la señalización de la insulina (Akt-P, el IRS-P), estudios de la función mitocondrial en fibras permeabilizadas (respiración, emisiones de H₂O₂), los marcadores de estrés oxidativo intracelular (peroxidación lipídica, la relación GSH / GSSG, la actividad aconitasa) y la actividad de la enzima mitocondrial. Se hace una comparación entre las ratas control y las ratas fa / fa a las que se administra SS-31. Los controles incluyen ratas salvajes y fa / fa a las que no se administra SS-31. El éxito de la prevención de la resistencia a la insulina mediante los péptidos catiónicos aromáticos de la invención viene indicado por una reducción en uno o más de los marcadores asociados con la resistencia a la insulina o la disfunción mitocondrial enumerados anteriormente.

25 En segundo lugar, para examinar los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en el tratamiento de la resistencia a la insulina, se administra a las ratas Zucker (~ 12 semanas de edad) SS-31 durante aproximadamente 6 semanas. Como estas ratas muestran signos de la obesidad y de resistencia a la insulina, que proporcionan un modelo útil para evaluar la eficacia de los procedimientos de tratamiento de la resistencia a la insulina. Se administra SS-31 (1,0-5,0 mg / kg de peso corporal) a las ratas mediante administración i.p. u oral (es decir, agua de bebida o por sonda nasogástrica).

30 Se predice que la administración de SS-31 mejore o reduzca la resistencia a la insulina en todo el cuerpo y muscular que normalmente se desarrolla en estas ratas obesas mayores (fa / fa) Zucker. Los resultados medidos incluyen el peso corporal, los niveles de glucosa en ayunas / insulina / ácidos grasos libres, la tolerancia a la glucosa (TTOG), la sensibilidad *in vitro* a la insulina muscular (incubación), marcadores de la señalización de la insulina (Akt-P, IRS-P), estudios de la función mitocondrial en fibras permeabilizadas (respiración, emisión de H₂O₂), los marcadores de estrés oxidativo intracelular (peroxidación lipídica, la relación GSH / GSSG, la actividad aconitasa) y la actividad de la enzima mitocondrial. Se hace una comparación entre ratas control y ratas fa / fa a las que se administra SS-31. Los controles incluyen ratas salvajes y fa / fa a las que no administra SS-31. El éxito del tratamiento de la resistencia a la insulina por los péptidos catiónicos aromáticos de la invención viene indicada por una reducción en uno o más de los marcadores asociados con resistencia a la insulina o la disfunción mitocondrial enumerados anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir la resistencia a la insulina en un sujeto mamífero.
- 5 2. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sujeto es un ser humano.
3. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el sujeto sufre resistencia a la insulina inducida por la dieta.
- 10 4. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la resistencia a la insulina está asociada con la diabetes de tipo II.
5. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la resistencia a la insulina se asocia con la obesidad.
- 15 6. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la resistencia a la insulina se asocia con enfermedad de las arterias coronarias, disfunción renal, aterosclerosis, hiperlipidemia, hipertensión esencial o hígado graso.
- 20 7. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el péptido se administra antes de la aparición de la diabetes de tipo II.
8. Un péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el péptido se administra por vía oral, por vía tópica, por vía sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intramuscular.
- 25 9. Uso de un péptido D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina en un sujeto mamífero.

FIG. 1B

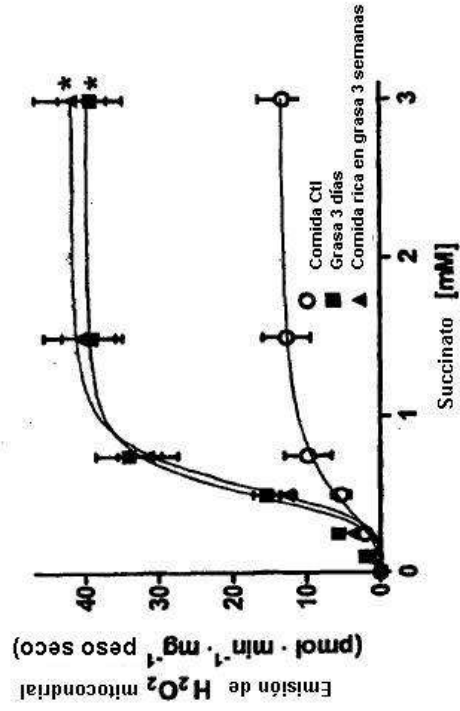


FIG. 1A

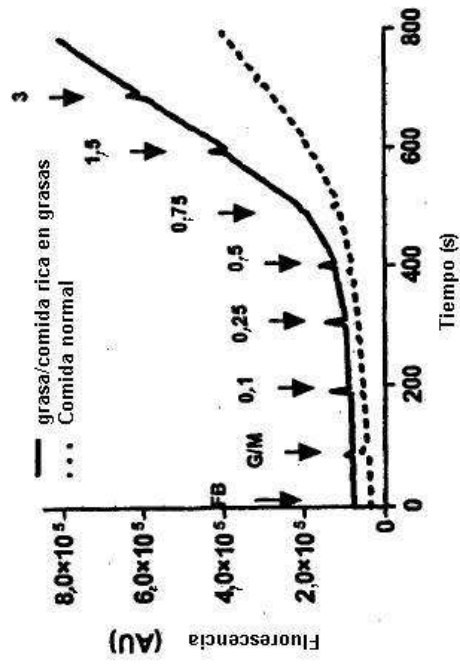


FIG. 2

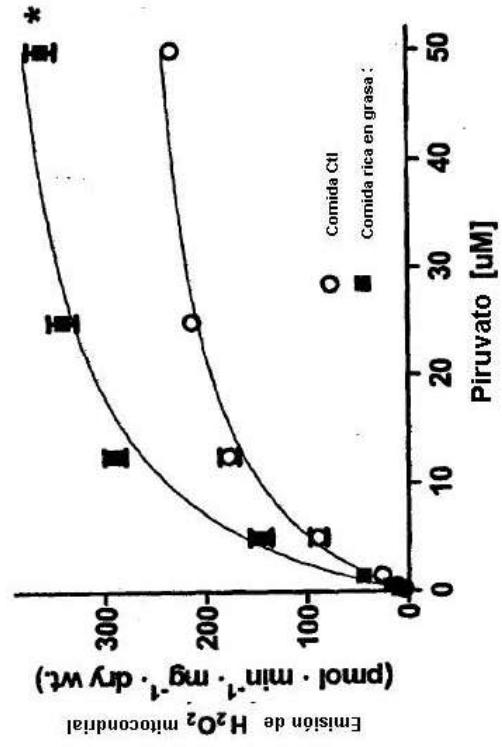


FIG. 3B

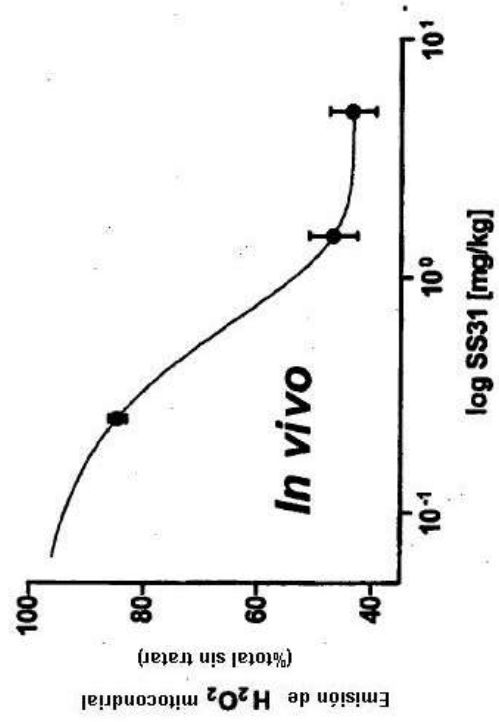


FIG. 3A

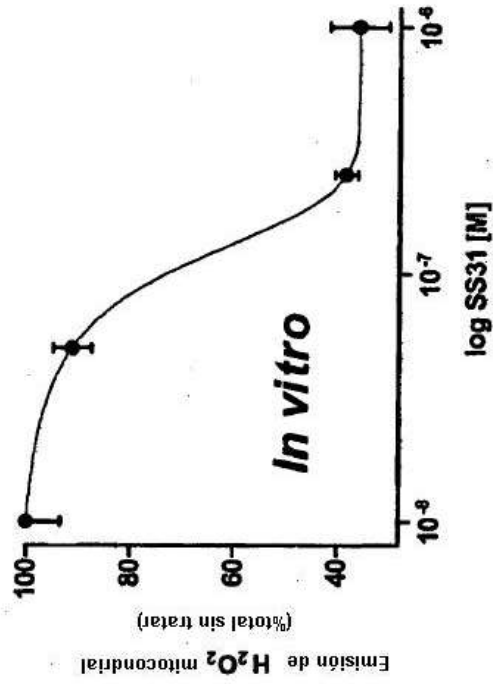


FIG. 3C

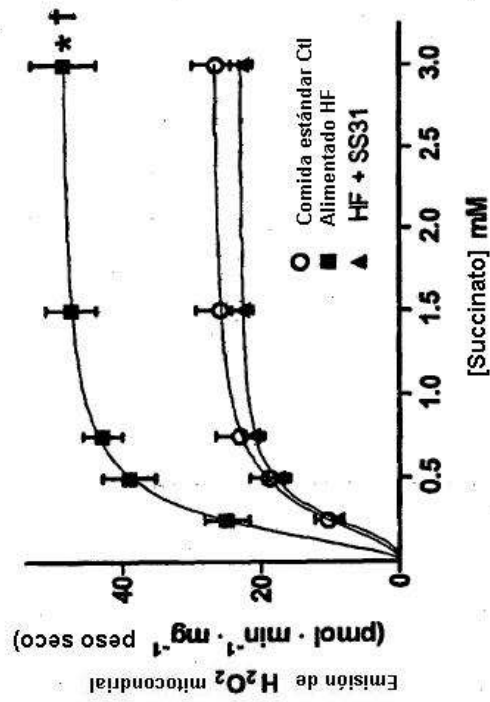


FIG. 3D

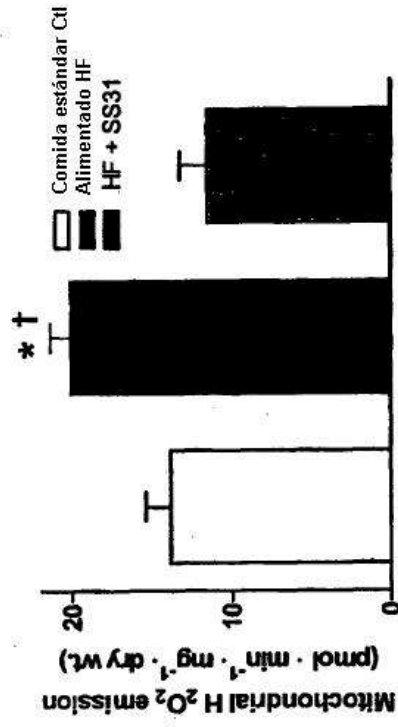


FIG. 3F

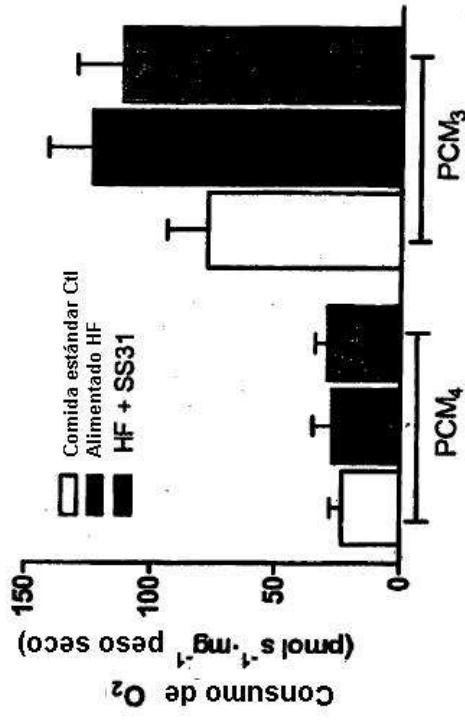


FIG. 3E

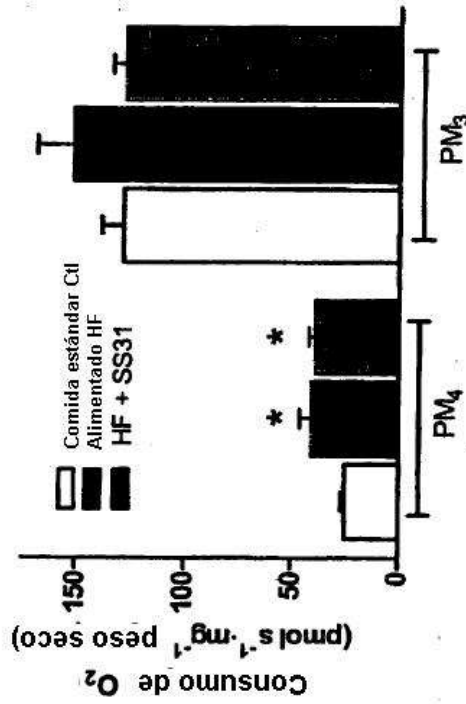


FIG. 3H

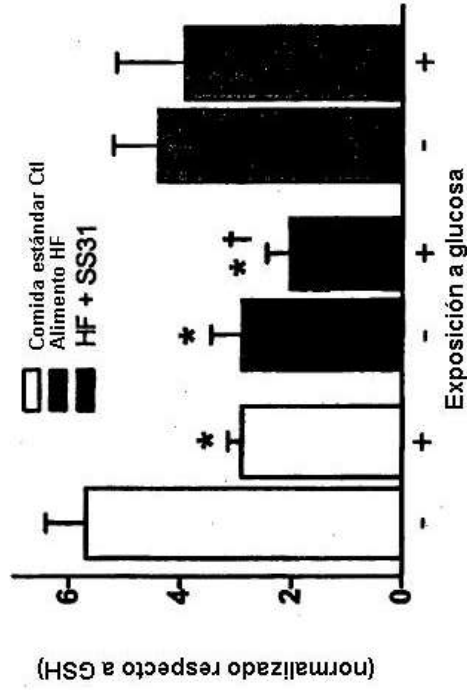


FIG. 3G

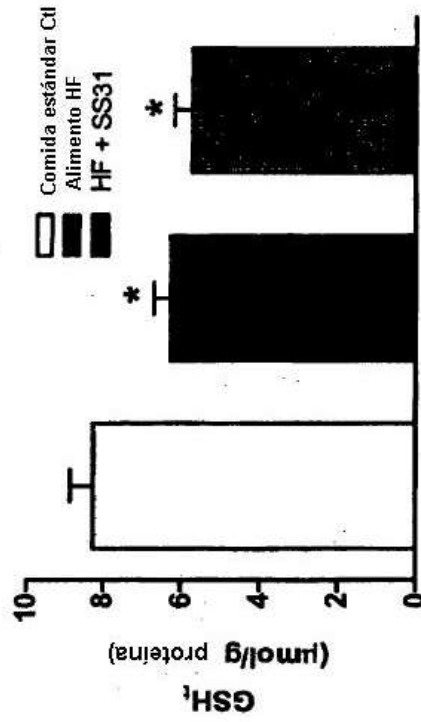


FIG. 4B

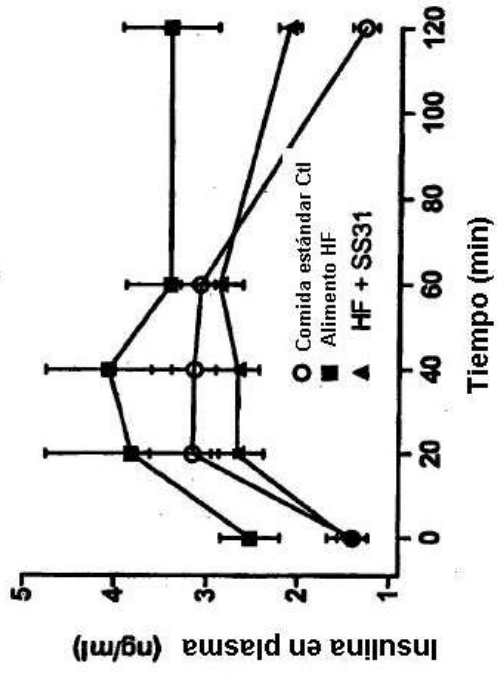


FIG. 4A

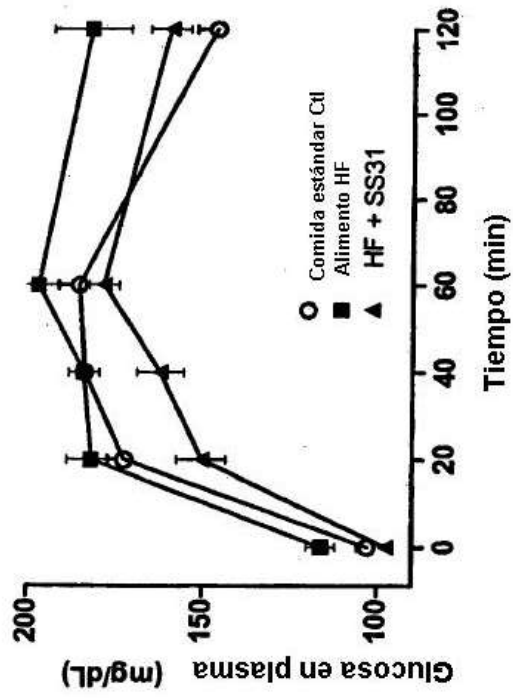


FIG. 4C

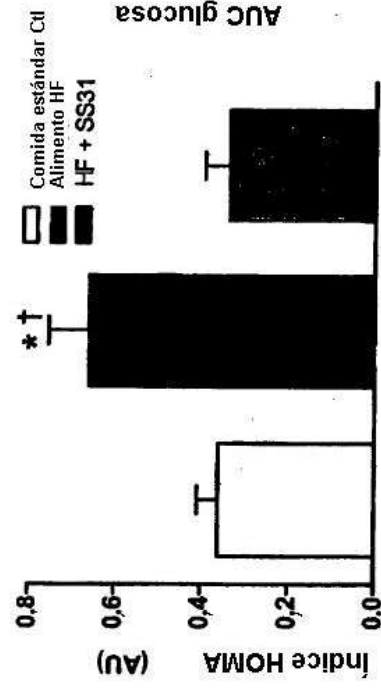


FIG. 4D

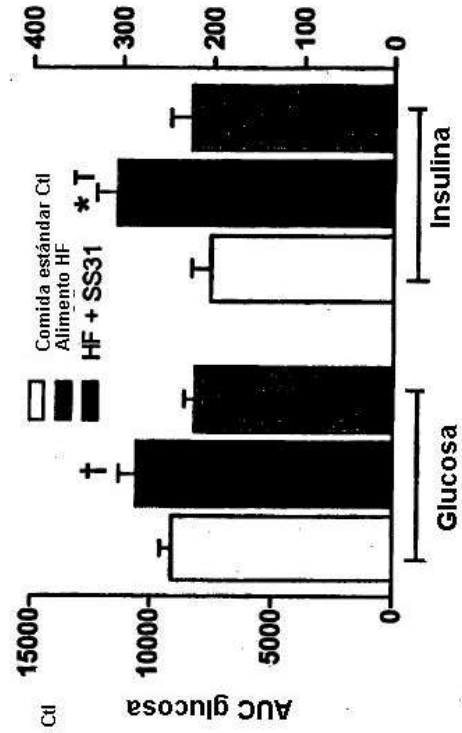


FIG. 4E



FIG. 4F

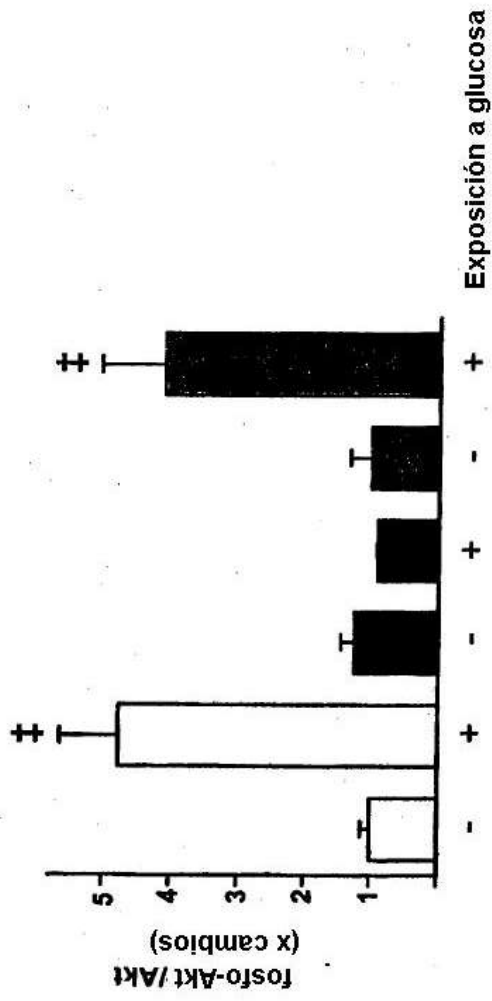


FIG. 5A

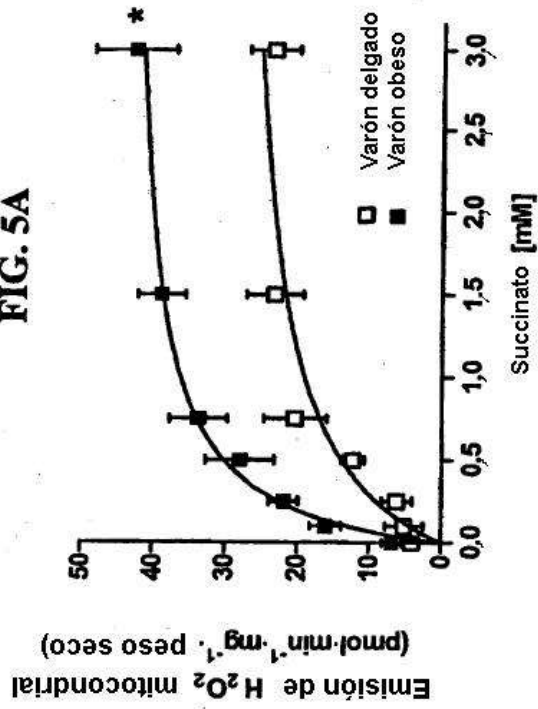


FIG. 5B

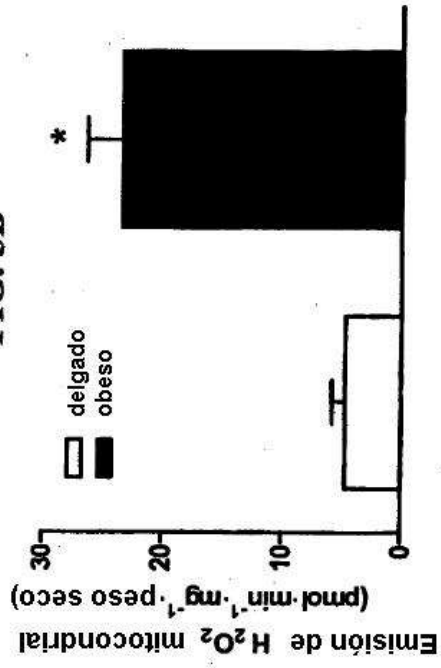


FIG. 5D

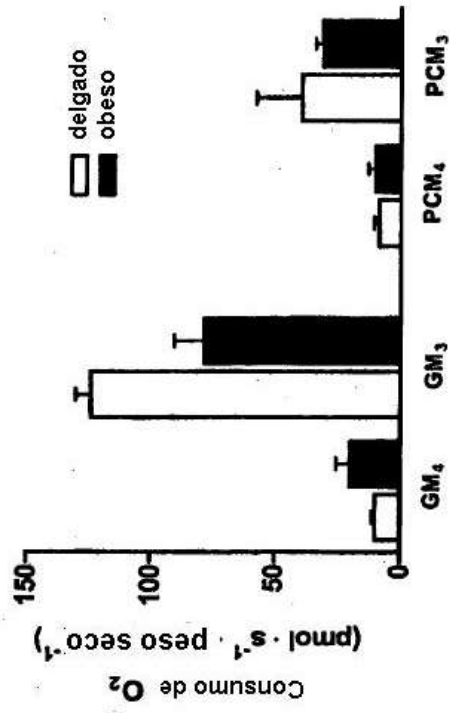


FIG. 5C

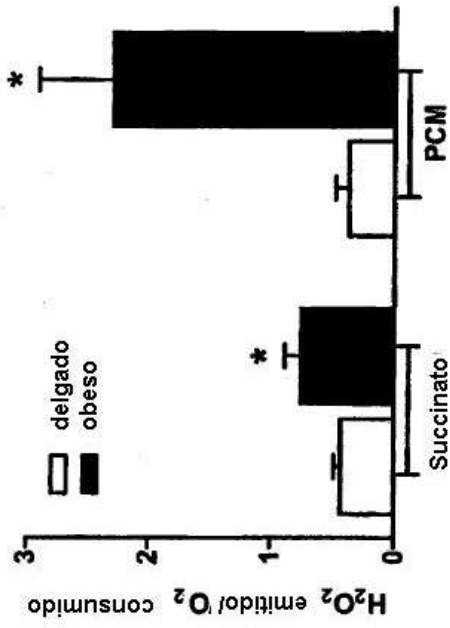


FIG. 5F

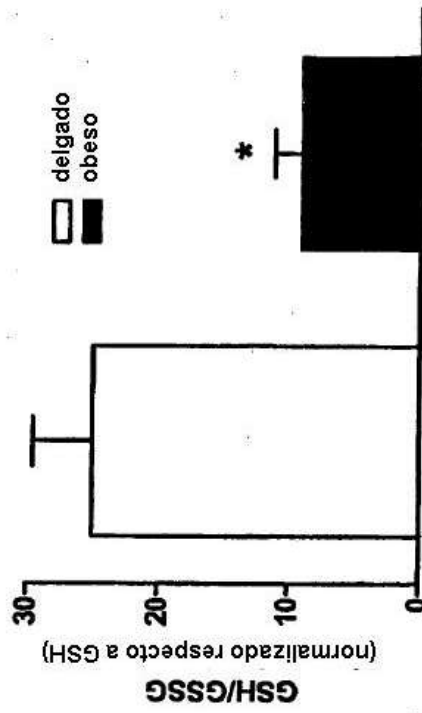


FIG. 5E

