

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 111**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/25** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08760314 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2152297**

54 Título: **Grelina no acilada como agente terapéutico en el tratamiento de trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

**31.05.2007 US 941186 P**

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

**17.06.2015**

73 Titular/es:

**ALIZÉ PHARMA SAS (100.0%)  
15, Chemin du Saquin  
69130 Ecully, FR**

72 Inventor/es:

**GHIGO, EZIO;  
VAN DER LELY, AART, JAN y  
GRANATA, RICCARDA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 538 111 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

Grelina no acilada como agente terapéutico en el tratamiento de trastornos metabólicos

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere a fragmentos de grelina no acilada y sus análogos así como a sus usos terapéuticos.

**5 Antecedentes**

La grelina es un péptido que se aísla del estómago pero se expresa también en muchos otros tejidos, incluyendo el páncreas endocrino. Se descubrió como un ligando natural del receptor de secretagogo de la hormona de crecimiento tipo 1a (GHS-R) (Refs. 1, 2). La acilación de la grelina en la serina 3 es esencial para la unión a GHS-R1a, que media la actividad de liberación de la GH y también la acción orexigénica de la grelina acilada. Además de la estimulación de la secreción de la GH y modulación de otras funciones pituitarias, la grelina acilada (AG) ejerce una amplia variedad de acciones biológicas tales como la regulación central de la ingesta de alimento y equilibrio de energía y el control de la secreción de insulina y metabolismo de glucosa. La expresión de GHS-R1a se ha detectado en una variedad de tejidos animales y humanos endócrinos y no endócrinos, centrales y periféricos, incluyendo el páncreas. En especial, la unión entre grelina e insulina parece de gran relevancia. Se ha mostrado que la AG tiene efectos diabéticos hipoglucémicos; ratones que no expresan grelina presentan liberación incrementada de insulina inducida por glucosa mientras que se ha mostrado que el bloqueo de la grelina derivada de los islotes pancreáticos potencia la secreción de insulina y previene la intolerancia a la glucosa inducida por dieta alta en grasas en ratas.

En el páncreas endocrino, se ha mostrado que la grelina se localiza en las células  $\alpha$  y  $\beta$  y en las células  $\epsilon$  de los islotes que producen grelina recientemente identificadas, que sugiere una función en la regulación del destino y función de la célula  $\beta$  (Refs. 9, 22, 19). La supervivencia de las células  $\beta$  es de gran importancia para el mantenimiento del metabolismo de la glucosa normal y la apoptosis de células  $\beta$  es un suceso crítico en la diabetes tanto tipo 1 como 2 (Refs. 16, 21). El documento WO 2006/1045319 describe el uso de un compuesto secretagogo de la hormona del crecimiento (GH), tal como la grelina, para estimular el apetito en un individuo que padece insuficiencia renal y/o insuficiencia hepática y para aumentar o mantener la masa corporal.

La grelina no acilada (UAG) es la forma principal en la circulación de la grelina y se ha creído mucho tiempo que es biológicamente inactiva ya que no se une a GHS-R1a en concentraciones fisiológicas y por lo tanto carece de actividad de liberación de GH. Ahora se sabe que la UAG es un péptido biológicamente activo, particularmente en el nivel metabólico, que ha mostrado en particular que ejerce efectos anti-diabéticos como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. número de serie 10/499.376, publicada el 14 de abril de 2005, con el número de publicación US 2005-0080007, y también publicada como WO 2003/051389. La solicitud de patente de EE.UU. 2005-0080007 y WO 2003/051389 se refieren al uso de grelina no acilada y sus análogos en la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos asociados con el metabolismo de la glucosa y metabolismo de la insulina alterados. Efectivamente, la UAG es capaz de: a) contrarrestar el efecto hipoglucémico de AG en humanos (Ref. 6); b) modular directamente el metabolismo de la glucosa en el nivel hepático por bloqueo de la producción basal de glucosa estimulada por grelina acilada e inducida por glucagón de hepatocitos (Ref. 3); c) disminuir la deposición de grasa, consumo de alimentos, y niveles de glucosa en animales transgénicos con UAG (Ref. 7); d) estimular la proliferación y prevenir la muerte celular y apoptosis en células  $\beta$  e islotes pancreáticos humanos (Ref. 4).

Se ha demostrado recientemente que la UAG es capaz de estimular la proliferación y prevenir la muerte celular y apoptosis inducida por la sinergia de (IFN)- $\gamma$ /factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  en células  $\beta$  e islotes pancreáticos humanos (Ref. 4). De manera sobresaliente, la sinergia de citoquinas se considera que es una causa principal de la destrucción de células  $\beta$  en la diabetes de tipo I así como de la pérdida de células  $\beta$  en la diabetes tipo 2. Además, este trabajo también mostraba que la UAG estimulaba la secreción de insulina inducida por glucosa de células  $\beta$  que no expresan GHS-R1a.

Juntos, estos resultados refuerzan el concepto de que la UAG tiene un potencial terapéutico en afecciones médicas asociadas con el trastorno metabólico tal como afecciones caracterizadas por deficiencias de insulina o por resistencia a la insulina, incluyendo, pero sin limitarse a diabetes, y el efecto de la UAG en las células  $\beta$  es uno de los mecanismos de acción de la UAG en estas aplicaciones potenciales.

Recientemente, el potencial terapéutico de la UAG se demostró clínicamente, ya que la una infusión continua de UAG en voluntarios sanos produjo una disminución de la glucosa en sangre, una mejora de la sensibilidad a la insulina, una reducción de ácidos grasos libres en sangre, y disminución de niveles de cortisol.

La UAG es un péptido de 28 aminoácidos y preferiblemente se administra a los pacientes por inyección intravenosa o subcutánea con el fin de producir sus efectos, que no es una manera conveniente de administrar un fármaco a un paciente. También, los péptidos de este tamaño normalmente son degradados rápidamente después de

administración y su eficacia in vivo es con frecuencia débil después de administración de bolo intravenoso, subcutáneo o intramuscular.

5 Además, la fabricación de un péptido de 28 aminoácidos es un procedimiento largo y costoso, se fabrique por síntesis de péptidos en fase sólida o por tecnología recombinante. Finalmente, el tratamiento crónico de pacientes con un péptido largo tal como la UAG puede representar riesgos en la seguridad para los pacientes en forma de inmunogenicidad. La producción de anticuerpos neutralizantes contra un péptido natural es un potencial riesgo de salud importante para los pacientes.

Por lo tanto, sería muy deseable identificar péptidos de tamaño más pequeño que tuvieran una actividad biológica comparable a la UAG, pero que fueran más fáciles y menos costosos de fabricar.

10 Sería todavía más deseable que estos péptidos de tamaño más pequeños tuvieran mayor potencia biológica cuando se comparan con la UAG.

15 Otra ventaja de estos péptidos de tamaño más pequeños sería que conllevarían menos riesgos de inmunogenicidad para los pacientes en administraciones crónicas y repetidas, y por lo tanto presentarían un perfil de seguridad mejor. Estos pueden tener una mejor biodisponibilidad que la UAG, cualquier que sea la ruta de administración, y ser adecuados para rutas de administración más convenientes, tal como, pero sin limitarse a suministro transdérmico, pulmonar, intranasal u oral, o pueden constituir un material de partida para el diseño de análogos peptídicos o moléculas peptidomiméticas con una mejor biodisponibilidad oral. Los péptidos de tamaño más pequeño también pueden ser compatibles con sistemas de suministro de fármacos tales como, pero sin limitarse a formulaciones de depósito basadas en polímero.

## 20 **Resumen**

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido aislado que consiste en un fragmento de grelina no acilada como se expone en la SEQ ID NO: 1, y sus análogos, teniendo dicho fragmento 5, 6, 7 u 8 aminoácidos y comprendiendo la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val como se expone en la SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad seleccionada del grupo que consiste en a) disminuir los niveles de glucosa en sangre; b) 25 aumentar la secreción y/o sensibilidad a la insulina; c) unirse a células secretoras de insulina; y d) promover la supervivencia de células secretoras de insulina, y en donde los análogos de dichos fragmentos son fragmentos que varían de la secuencia del fragmento de UAG natural por sustituciones conservativas de aminoácidos.

El polipéptido aislado de la invención puede contener hasta 2 sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos de aminoácidos Glu, His y Val.

30 En un aspecto de la invención, el polipéptido aislado se selecciona del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.

35 En otro aspecto de la invención, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 6, o comprende la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 7 o comprende la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val como se expone en la SEQ ID NO: 8.

En un aspecto particular de la invención, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos cíclica Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 25.

40 En un aspecto adicional de la invención se proporciona el polipéptido aislado de la invención, para usar en terapia, en el tratamiento de un paciente que padece diabetes de tipo I o de tipo II, deficiencias de insulina, resistencia a la insulina, dislipidemia y/u obesidad.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido aislado de la invención.

## 45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 ilustra la supervivencia de células  $\beta$  INS-1E en medio exento de suero en la presencia de grelina no acilada o los fragmentos indicados de grelina no acilada.

La figura 2 ilustra la supervivencia de células  $\beta$  INS-1E en la presencia de TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$  y en la presencia de grelina no acilada o los fragmentos indicativos de grelina no acilada.

50 Las figuras 3A y 3B ilustran la supervivencia de células  $\beta$  HIT-T15 en medio exento de suero con o sin citoquinas y grelina no acilada UAG (1-28) o su fragmento UAG (1-14) (figura 3A) o UAG (1-18) (Figura 3B).

- Las figuras 4A y 4B ilustran la supervivencia de células  $\beta$  HIT-T15 en medio exento de suero con o sin citoquinas y grelina no acilada UAG (1-28) o sus fragmentos UAG (1-5) (Figura 4A) o UAG (17-28) (Figura 4B).
- 5 Las figuras 5A y 5B ilustran la supervivencia de células  $\beta$  HIT-T15 tratadas con citoquinas en la presencia de los los fragmentos de grelina no acilada UAG (6-13), UAG (8-13), UAG (8-12), UAG (1-14), UAG (1-18), UAG (1-28) (Figura 5A) y UAG (8-11), UAG (9-12) y UAG (9-11) (Figura 5B).
- Las figuras 6A a 6C ilustran los efectos antiapoptóticos de los fragmentos de grelina no acilada UAG (6-13) (Figura 6A), UAG (8-13) (Figura 6B) y UAG (8-12) (Figura 6C) en células  $\beta$  HIT-T15 tratadas con citoquinas.
- Las figuras 7A y 7B ilustran el efecto de supervivencia en islotes pancreáticos humanos de la grelina no acilada (1-28) y sus fragmentos UAG (1-14), UAG (1-18) (Figura 7A) y UAG (1-5) y UAG (17-28) (Figura 7B).
- 10 Las figuras 8A a 8D ilustran el efecto de UAG (1-14) (Figura 8A), UAG (1-18) (Figura 8B), UAG (1-28) (Figura 8C) y extendina-4 (Figura 8D) en la secreción de insulina en islotes pancreáticos humanos.
- Las figuras 9A a 9D ilustran el efecto in vivo del fragmento de grelina no acilada UAG (6-13) en la supervivencia animal (Figura 9A), en los niveles de glucosa plasmática (Figura 9B) y niveles de insulina plasmática (Figura 9C) y pancreática (Figura 9D), en animales tratados con estreptozotocina (STZ).
- 15 Las figuras 10A y 10B ilustran la unión de la grelina no acilada y el fragmento de grelina no acilada UAG (6-13) a receptores de célula  $\beta$  pancreáticas HIT-T15 (Figura 10A) e INS-1E (Figura 10B).
- Las figuras 11A y 11B ilustran los efectos en la supervivencia de la UAG (6-13) con sustituciones de alanina (Ala) en las posiciones 6 a 13 en células  $\beta$  HIT-T15 tanto en ausencia de suero (Figura 11A) como en presencia de citoquinas (Figura 11B).
- 20 Las figuras 12A y 12B ilustran los efectos en la supervivencia de la UAG (6-13) con sustituciones conservativas y modificaciones N-terminales en células  $\beta$  HIT-T15, tanto en ausencia de suero (Figura 12A) como en presencia de citoquinas (Figura 12B).
- Las figuras 13A y 13B ilustran los efectos en la supervivencia de la UAG (6-13) con ciclación en células  $\beta$  HIT-T15 tanto en ausencia de suero (Figura 13A) como en presencia de citoquinas (Figura 13B).
- 25 Las figuras 14A y 14B ilustran los efectos in vivo de la UAG (6-13) en los niveles de glucosa plasmática después de 2 y 4 semanas del tratamiento en ratones ob/ob, un modelo animal de diabetes asociado con obesidad. La figura 14A ilustra los niveles de glucosa plasmática posprandial y la figura 14B ilustra la glucosa plasmática en ayunas.
- La figura 15 ilustra los niveles de insulina en ayunas después de 2 y 4 semanas de tratamiento con UAG y UAG (6-13) en ratones ob/ob, un modelo animal de diabetes asociado con obesidad.
- 30 La figura 16 ilustra el efecto de la UAG y UAG (6-13) en la grasa gonadal como porcentaje de peso corporal en ratones ob/ob, un modelo animal de diabetes asociado con obesidad.

### Descripción detallada

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la cual la invención pertenece.

#### 35 Fragmentos UAG y sus análogos

Para el propósito de la presente invención se definen a continuación los siguientes términos.

En la presente solicitud, los términos “grelina” y “grelina acilada” o “AG” se usan de manera intercambiable y tienen el mismo significado.

- 40 La expresión “grelina no acilada” o “UAG” se pretende que signifique péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO. 1 (1-NH<sub>2</sub>Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-28; SEQ ID NO: 1). La UAG también se puede denominar UAG (1-28).

- 45 Las variaciones de tipo natural de la grelina no acilada incluyen péptidos que contienen sustituciones, adiciones o eliminaciones de uno o más aminoácidos que se producen debido a cambios discretos en la secuencia de nucleótidos del gen de grelina codificante o sus alelos, o debido al empalme alternativo del ARN transcrito. Se debe entender que dichos cambios no afectan sustancialmente a las propiedades, características farmacológicas y biológicas de las variantes de grelina no acilada. Aquellos péptidos pueden estar en forma de sales. Particularmente las funciones ácidas de la molécula se pueden sustituir por su derivado salino tal como, pero sin limitarse a una sal trifluoroacetato.

Como se usa en la presente memoria, SEQ ID NO: 9 se refiere a la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos 6 a 18 de la UAG (SEQ ID NO: 1), principalmente: 6-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-18.

5 Por "péptido", "polipéptido" o "proteína" se entiende cualquier cadena de aminoácidos, sin considerar la longitud o modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), o modificación química, o aquellas que contienen aminoácidos no naturales o inusuales tal como D-Tyr, ornitina, ácido aminoadípico. Los términos se usan de manera intercambiable en la presente solicitud.

10 El término "fragmentos" o "sus fragmentos" se refiere a fragmentos de aminoácidos de un péptido tal como la grelina no acilada. Los fragmentos de grelina no acilada son más cortos que 28 restos de aminoácidos. Los fragmentos de grelina no acilada por lo tanto pueden ser de 8, 7, 6, 5 restos de aminoácidos de longitud.

15 En algunos aspectos de la invención, los polipéptidos se usan en una forma que es "purificada", "aislada" o "sustancialmente pura". Los polipéptidos son "purificados", "aislados" o "sustancialmente puros" cuando se separan de los componentes que los acompañan naturalmente. Típicamente, un compuesto es sustancialmente puro cuando es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en peso, del material total en una muestra.

20 La expresión "análogo de grelina no acilada", "análogo de fragmentos de grelina no acilada" o "sus análogos" se refiere tanto a análogos estructurales como funcionales de grelina no acilada o sus fragmentos que son, entre otros, capaces de reemplazar a la grelina no acilada en el antagonismo de las acciones periféricas o funciones de la grelina, o son capaces de reemplazar otras acciones biológicas de la grelina no acilada, tales como, pero sin limitarse a, estimular la proliferación y/o inhibir la apoptosis en líneas celulares  $\beta$ , disminuir los niveles de glucosa en sangre, mejorar la sensibilidad y/o secreción de insulina, disminuir los niveles de cortisol, mejorar el perfil de lípidos en seres humanos, y de esta manera, tener el uso potencial para tratar trastornos metabólicos tales como los asociados con por ejemplo, resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, dislipidemia o exceso de cortisol.

25 Los análogos estructurales simples comprenden péptidos que muestran homología con la grelina no acilada como se expone en la SEQ ID NO: 1 u homología con cualquiera de sus fragmentos. Por ejemplo, una isoforma de la grelina-28 (SEQ ID NO: 1), des-Gln-14-grelina (un péptido de 27 aminoácidos que posee 3 modificaciones de serina por ácido n-octanoico) se muestra que está presente en el estómago. Es funcionalmente idéntico a la grelina en cuanto que se une a GHSR-1a con afinidad de unión similar, produce flujos de  $Ca^{2+}$  en células clonadas e induce la secreción de GH con potencia similar a la grelina-28. Se espera que la UAG también tenga una des-Gln-14-UAG que sea funcionalmente idéntica a la UAG.

30 Los análogos de fragmentos de UAG son aquellos que varían de la secuencia de UAG natural o de la secuencia del fragmento de UAG natural por sustituciones de aminoácido conservativas; es decir, aquellos que sustituyen un resto por otro de características similares. Las sustituciones típicas incluyen aquellas de entre Ala, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre los restos básicos Lys y Arg; y entre los restos aromáticos Phe y Tyr. Son particularmente preferidos análogos en los cuales se sustituyen varios, por ejemplo, pero sin limitarse a 1-5, o 1-2 aminoácidos, en cualquier combinación. Por ejemplo, los análogos de UAG pueden diferir en la secuencia de UAG en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sustituciones de aminoácidos conservativas.

35 En un aspecto adicional, los polipéptidos aislados de la invención se obtienen, por ejemplo, por barridos de alanina, por la sustitución con D-aminoácidos o con aminoácidos sintéticos o por la ciclación del péptido. Los análogos de UAG o sus fragmentos pueden comprender un aminoácido codificado no natural, en donde el aminoácido codificado no natural se refiere a un aminoácido que no es uno de los aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o un aminoácido que ocurre por la modificación (por ejemplo, modificación postraducciona) del aminoácido codificado natural (incluyendo, pero sin limitarse a los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero no se incorpora por sí mismo a una cadena de polipéptido de crecimiento por el complejo de traducción. Ejemplos de dichos aminoácidos de origen no natural incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

Como se usa en la presente memoria, el término "modificado" se refiere a cualquiera de los cambios hechos a un polipéptido dado, tal como cambios de la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, estructura química, modificación co-traducciona, o modificación postraducciona de un polipéptido.

40 La expresión "modificación postraducciona" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que ocurre en dicho aminoácido después de que ha sido incorporado en una cadena de polipéptido. La expresión incluye, a modo de ejemplo solamente, modificaciones in vivo cotraduccionales, modificaciones in vitro cotraduccionales (tal como en el sistema de traducción exento de células), modificaciones in vivo postraduccionales, y modificaciones in vitro postraduccionales. Ejemplos de modificaciones postraduccionales son, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, amidación, carboxilación, fosforilación, adición de sales, amidas o ésteres, en particular ésteres C-terminales, y derivados de N-acilo de los péptidos de la invención. Los tipos de modificaciones postraduccionales son bien conocidos.

Ciertos péptidos de acuerdo con la presente invención también pueden estar en forma ciclada, tal que los extremos N o C se enlazan cabeza a cola directamente, o a través de la inserción de un grupo conector, dicho grupo generalmente comprende él mismo uno o más restos de aminoácidos según se requiera para unir la cadena principal de modo que se evite alterar la estructura tridimensional del péptido con respecto a la forma no ciclada. Dichos derivados de péptido pueden tener mejor estabilidad y biodisponibilidad respecto a los péptidos no ciclados. Los métodos para ciclar péptidos son bien conocidos en la técnica.

La ciclación se puede realizar por la formación de enlace de disulfuro entre dos grupos funcionales de cadenas laterales, formación de enlace amida o éster entre un grupo funcional de una cadena lateral y el grupo funcional  $\alpha$ -amino o carboxilo de la cadena principal, formación de enlace amida o éster entre dos grupos funcionales de cadenas laterales, o formación de enlace amida entre los grupos funcionales  $\alpha$ -amino y carboxilo de la cadena principal. Estas reacciones de ciclación se llevan a cabo tradicionalmente en solución con alta dilución. La ciclación se realiza habitualmente mientras el péptido está unido a la resina. Una de las maneras más comunes de sintetizar péptidos cíclicos en un soporte sólido es uniendo la cadena lateral de un aminoácido a la resina. Usando estrategias de protección adecuadas, los extremos C y N se pueden desproteger selectivamente y ciclar en la resina después del ensamblado de cadena. Esta estrategia se usa ampliamente, y es compatible con protocolos de *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Sin embargo, se restringe a péptidos que contienen grupos funcionales en la cadena lateral adecuados para unir al soporte sólido. Se puede usar una serie de métodos para lograr la síntesis eficiente de péptidos cíclicos. Un procedimiento para sintetizar péptidos cíclicos se basa en la ciclación con escisión simultánea de la resina. Después de ensamblar una secuencia de péptido adecuada por síntesis en fase sólida en la resina o de añadir una secuencia lineal a la resina, el grupo amino desprotegido puede reaccionar con su enlace activo de anclaje para producir péptidos cíclicos protegidos. En general, se requiere una etapa de desprotección final para producir el péptido cíclico objetivo. El procedimiento para la síntesis de péptidos cíclicos es bien conocido en la técnica.

Por ejemplo, se puede llevar a cabo la formación de lactama, una forma de ciclación, para formar un puente de lactama, usando síntesis con Fmoc se pueden introducir aminoácidos con diferentes grupos protectores en las cadenas laterales, tales como, pero sin limitarse a ácido aspártico (o glutámico) protegido con éster alílico en el éster beta (o éster gamma para el ácido glutámico) y lisina protegida con carbamato de aliloxi en el N- $\epsilon$ . Al final de la síntesis, con el extremo N del péptido protegido con Fmoc, Boc u otro grupo protector diferente de Alloc, los grupos protectores alilo y alloc del ácido aspártico y la lisina se pueden desproteger, por ejemplo, con paladio (0) seguido por la ciclación usando PyAOP (hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio) para producir el puente lactama.

A menos que se indique de otra manera, un aminoácido nombrado en la presente memoria se refiere a la forma L. Se usarán abreviaturas bien reconocidas en la técnica para describir aminoácidos, incluyendo aminoácidos levorrotatorios (L-aminoácidos o L o forma L) y aminoácidos dextrorrotatorios (D-aminoácidos o D o forma D), alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), ácido glutámico (Glu o E), glutamina (Gln o Q), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). Un resto de L-aminoácido dentro de la secuencia de péptido natural se puede alterar a cualquiera de los 20 L-aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas o cualquiera de los D-aminoácidos correspondientes, aminoácidos raros, tal como, pero sin limitarse a, 4-hidroxiprolina o hidroxilisina, o un aminoácido no proteico, tal como P-alanina u homoserina.

Los métodos generales y estrategias sintéticas usados para proporcionar análogos funcionales y estructurales de la UAG o sus fragmentos se usan habitualmente y son bien conocidos en la técnica y se describen en publicaciones tal como "Peptide synthesis protocols" ed, M.W. Pennigton & B. M. Dunn. Methods in Molecular Biology. Vol. 35. Humana Press, NJ., 1994.

El término "homología" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos mientras retienen una actividad biológica equivalente. La homología se puede determinar al comparar cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de homología entre las secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos o que se corresponden en posiciones compartidas por las secuencias de modo que una "secuencia homóloga" se refiere a una secuencia que comparte homología y una función o actividad biológica equivalente. La valoración del porcentaje de homología es conocida por los expertos en la técnica.

Los métodos para determinar la identidad y similitud de péptidos están implementados en programas de ordenador a disposición del público. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete de programas GCG, BLASTP, BLASTN, y FASTA. El programa BLAST X está a disposición del público en NCBI y otras fuentes. El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también se puede usar para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol Biol.* 48:443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919 (1992);

Penalización por hueco: 12; Penalización por longitud de hueco: 4.

5 Un programa útil con estos parámetros está disponible al público como el programa de "hueco" de Genetics Computer Group, Madison, Wis. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de secuencias de aminoácidos (junto con sin penalización por huecos finales).

Los polipéptidos de la invención se pueden preparar en cualquier manera adecuada como se conoce en la técnica. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos de origen natural aislados, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos de manera sintética, o polipéptidos producidos por una combinación de estos métodos. Los medios y métodos para preparar dichos polipéptidos son bien conocidos en la técnica.

10 Ciertos aspectos de la invención usan polinucleótidos de UAG. Estos incluyen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos UAG, fragmentos y análogos definidos en la solicitud.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula que comprende una pluralidad de deoxiribonucleótidos o subunidades de nucleósido. El enlace entre las subunidades de nucleósido se puede proporcionar mediante fosfatos, fosfonatos, fosforamidatos, fosforotioatos, o similares, o mediante grupos no fosfato como se conoce en la técnica, tal como enlaces tipo péptido utilizados en ácidos péptidonucleicos (PNA). Los grupos de unión pueden ser quirales o aquirales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden variar de longitud en 2 subunidades de nucleósido a cientos o miles de subunidades de nucleósido. Aunque los oligonucleótidos son preferiblemente de 5 a 100 subunidades de longitud, y más preferiblemente, de 5 a 60 subunidades de longitud, la longitud del polinucleótido puede ser mucho mayor (por ejemplo, hasta 100). El polinucleótido puede ser cualquiera de ADN y ARN. El ADN puede estar en cualquier forma de ADN genómico, una genoteca de ADN genómico, ADNc derivado de una célula o tejido, y ADN sintético. Además, la presente invención puede, en ciertos aspectos, usar vectores que incluyen bacteriófago, plásmido, cósmido, o fagemido.

Efecto en la supervivencia de fragmentos de UAG y sus análogos

25 En un aspecto de la invención, se investigaron los efectos proliferativos y antiapoptóticos de fragmentos de UAG y sus análogos frente a la UAG en la línea celular  $\beta$  INS-1E, línea celular  $\beta$  HIT-T15 así como en islotes pancreáticos humanas.

30 Los fragmentos de UAG y sus análogos que estimulan la proliferación y/o inhiben la apoptosis en estas líneas celulares tendrán también otras propiedades metabólicas de la UAG incluyendo, pero sin limitarse a, disminución de niveles de glucosa en sangre, mejora de la sensibilidad a la insulina, disminución de niveles de cortisol, mejora del perfil de lípido en seres humanos, y de esta manera, tendrán el uso potencial para tratar trastornos metabólicos asociados, por ejemplo, con la resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, dislipidemia o exceso de cortisol.

En un aspecto de la invención, se analizaron los efectos en la supervivencia de algunos fragmentos de UAG humanos citados en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
UAG (1-14)	2	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln
UAG (1-18)	3	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser
UAG (1-5)	4	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu
UAG (17-28)	5	Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg
UAG (6-13)	6	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-13)	7	Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-12)	8	Glu-His-Gln-Arg-Val
UAG (8-11)	10	Glu-His-Gln-Arg
UAG (9-12)	11	His-Gln-Arg-Val
UAG (9-11)	-	His-Gln-Arg

También se analizaron fragmentos UAG citados en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia (Restos de aminoácido de 6 a 13 de SEQ ID NO: 1)
(Asp) 8 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	12	Ser-Pro-Asp-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Lys) 11 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	13	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Gly) 6 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	14	Gly-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 6 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	15	Ala-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 7 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	16	Ser-Ala-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 8 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	17	Ser-Pro-Ala-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 9 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	18	Ser-Pro-Glu-Ala-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 10 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	19	Ser-Pro-Glu-His-Ala-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 11 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	20	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Ala-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 12 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	21	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Ala-Gln-NH <sub>2</sub>
(Ala) 13 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	22	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Ala-NH <sub>2</sub>
(Acetil-Ser)6 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	23	Ac-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
(Acetil-Ser)6, (DPro) 7 UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	24	Ac-Ser-pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH <sub>2</sub>
Ciclo (6-13) UAG	25	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln (cicl)
Ciclo (8,11), Lys 11, UAG (6-13)amida	26	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Val-Gln-amida
Ciclo (8,11), Acetil-Ser6, Lys 11, UAG (6-13)-amida	27	Ac-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Val-Gln (cicl)
Acetil-Ser6, Lys 11, UAG (6-13)NH <sub>2</sub>	28	Ac-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Val-Gln-NH <sub>2</sub>

- 5 La UAG (1-14) y UAG (1-18) aumentaban potencialmente la supervivencia celular tanto de células  $\beta$  INS-1E como de células  $\beta$  HIT-T15 en condiciones exentas de suero y después del tratamiento con citoquinas (figuras 1-2 para células INS-1E, figuras 3A, 3B, 4A y 4B para células  $\beta$  HIT-T15). Estos efectos eran similares a los presentados por la molécula de UAG de longitud completa (1-28). La UAG (1-14) parecía aún más fuerte que la UAG natural como una protección contra la apoptosis inducida por citoquinas en células INS-1E. La UAG (1-5) y UAG (17-28) ejercían solamente un efecto trivial en células INS-1E (figuras 1-2) y un efecto muy pequeño en células HIT-T15 (figuras 4A y 4B). Sorprendentemente, los fragmentos cortos UAG (6-13), UAG (8-13) y UAG (8-12) eran todos muy eficaces en el aumento de la supervivencia en la apoptosis inducida por citoquinas en células HIT-T15 (figura 5A). Realmente, los péptidos UAG (8-12) y UAG (8-13) eran al menos tan potentes como la UAG (1-14), mientras que el péptido UAG (6-13) era claramente superior. La UAG (1-5) y UAG (17-28) eran solamente mínimamente eficaces.
- 10
- 15 Se mostró que la UAG (6-13), UAG (8-12) y UAG (8-13) ejercían el efecto antiapoptótico más fuerte en células  $\beta$  HIT-T15 tratadas con citoquinas (figuras 6A, 6B y 6C).

Los datos presentados en la presente memoria demuestran que los fragmentos de UAG aumentan potencialmente la supervivencia celular y previenen la muerte celular en líneas celulares  $\beta$  con potencias muy comparables a aquellas de la propia UAG de longitud completa o mejores. La UAG (1-14) presentaba una potencia equivalente, si no mejor que la propia UAG de longitud completa, mientras que el fragmento (8-12), un péptido de 5 aminoácidos, retenía toda la actividad biológica y la UAG (6-13) era incluso más potente.

20

En otro aspecto de la invención, los datos presentados en la presente memoria también demuestran el efecto en la supervivencia de fragmentos de UAG en islotes pancreáticos humanos (figuras 7A y 7B). La UAG (1-14) y UAG (1-18) ejercen efectos protectores en condiciones exentas de suero que son similares a los presentados por la UAG (1-28). Por otra parte, el efecto protector de la UAG (1-5) y (17-28) en islotes humanos es reducido o incluso está ausente en las condiciones experimentales ensayadas.

Efecto de fragmentos de UAG o sus análogos en la secreción de insulina

También se investigaron los efectos de la UAG (1-14) y UAG (1-18) en la secreción de insulina en islotes humanos. La UAG (1-14), de manera similar a la UAG (1-28), y a la exedina-4, aumentaba significativamente la secreción de insulina inducida por glucosa en células  $\beta$  HIT-T15 (datos no mostrados) y en islotes humanos (figuras 8A a 8D).

El fragmento de UAG y sus análogos reducen la diabetes in vivo

En un aspecto adicional, los datos presentados en la presente memoria también muestran que los fragmentos de UAG, por ejemplo UAG (6-13), aumentan la supervivencia de animales tratados con estreptozotocina (STZ) (Figura 9A). Los fragmentos de UAG también reducen la glucosa plasmática inducida por STZ (figura 9B) y mejoran los niveles de insulina plasmática y pancreática (figuras 9C y 9D) en ratas diabéticas inducidas con STZ. Los datos presentados en la presente memoria también demuestran que fragmentos de UAG, por ejemplo la UAG (6-13), reducen los niveles de glucosa plasmática, potencian la sensibilidad a la insulina y modulan la diabetes in vivo (figuras 14A, 14B y 15) y reducen el peso de grasa corporal (figura 16).

Unión de fragmentos de UAG y sus análogos a células  $\beta$

En un aspecto adicional, los datos presentados en la presente memoria demuestran que la UAG (6-13), UAG (1-14) y UAG (1-3) reconocen y se unen al receptor de UAG en células  $\beta$  pancreáticas HIT-T15 e INS-1E. Entre estas, la UAG (6-13) presenta la actividad de unión más alta y tiene una afinidad de unión muy cercana a aquella de la UAG de origen natural. Este hallazgo, junto con los estudios funcionales in vitro que muestran que la UAG (6-13) ejerce, de manera similar a la UAG natural, efectos pro-supervivencia en células HIT-T15, indican que la UAG (6-13) es un agonista de UAG potente con potencial actividad anti-diabética.

Por lo tanto, parece que la secuencia activa de la UAG para obtener sus efectos metabólicos reside en la región que contiene los restos 8-12. Esta observación diferencia claramente la relación estructura-actividad de la UAG de la de la grelina acilada, para la cual la secuencia activa mínima es la grelina (1-5), estando octanoilado el resto serina en la posición 3. De esta manera se refuerza adicionalmente la hipótesis de que la UAG ejerce sus efectos metabólicos a través de uno o varios receptores diferentes de GHS-R1a, el receptor que media los efectos de la grelina acilada en la secreción de la hormona del crecimiento.

Por lo tanto, y de forma muy sorprendente, estos resultados muestran que la secuencia de UAG de longitud completa no es necesaria para que la UAG produzca sus efectos biológicos en células  $\beta$  y en los islotes humanos. La UAG (1-14) y UAG (1-18) son al menos tan potentes como la UAG natural. Aún más sorprendentemente, la UAG (8-12) y UAG (8-13) retenían toda la actividad biológica de la UAG de longitud completa, y la UAG (6-13) era incluso más potente que la UAG (1-14).

Los resultados indican que la UAG (8-12) o cualquier péptido que comprenda esta secuencia de 5 aminoácidos, esté amidado o no, o cualquier péptido que comprenda, por ejemplo, cualquiera de los análogos de UAG (6-13), UAG (8-12) o UAG (8-13) compartirán los mismos efectos metabólicos o biológicos que la propia UAG. También se prefiere cualquier péptido que comprenda un fragmento de al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que contiene los restos 6 a 18 de la UAG y que incluyan al menos la secuencia de aminoácido UAG (8-12).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona péptidos que comprenden la UAG (8-12) o UAG (8-13) o UAG (6-13) o cualquiera de sus análogos que tienen la propiedad de estimular la proliferación de células  $\beta$ , mejorar la supervivencia y/o inhibir la muerte de células  $\beta$ , disminuir el nivel de glucosa plasmática, aumentar la secreción y/o sensibilidad de insulina, disminuir los lípidos en sangre, tal como ácidos grasos libres y triglicéridos, reducir la secreción de cortisol, unirse a las células  $\beta$ , que los hacen útiles, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos asociados con el metabolismo de glucosa alterado, metabolismo de insulina alterado, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, y/o para mejorar el injerto de islotes pancreáticos, ya sea por el tratamiento ex vivo del injerto o por la administración al paciente. Los péptidos también son útiles para tratar afecciones médicas asociadas con la resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, glucosa en sangre inferior, útiles para el tratamiento de la diabetes, obesidad y dislipidemia. Los ensayos para medir las propiedades de los polipéptidos de la invención y los procedimientos para llevar a cabo estos ensayos son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona análogos de fragmentos de UAG que retienen la actividad biológica de la UAG. Ejemplos de dichos análogos son, pero no se limitan a, (Asp) 8 UAG (6-13) donde la E (Glu) se sustituye por D (Asp), que es tan activo como la UAG (6-13). La actividad de este análogo ilustra que una

sustitución de un aminoácido ácido por otro resto ácido preserva la actividad biológica de la UAG (6-13). (Lys)<sup>11</sup> UAG (6-13) donde la R (Arg) se sustituye por K (Lys), también es tan activo como la UAG (6-13), que ilustra el hecho de que una sustitución de un aminoácido básico por otro resto básico preserva la actividad biológica de la UAG (6-13). (Gly)<sup>6</sup> UAG (6-13) donde la S (ser) se sustituye por G (Gly), es también tan activo como la UAG (6-13), que ilustra que una sustitución basada en tamaño preserva la actividad biológica de la UAG (6-13). En general, estos análogos de UAG (6-13) demuestran que las sustituciones conservadoras preservan la actividad biológica de la UAG (6-13).

Además, la acetilación de la Ser en la posición 6 (N-terminal) de la UAG (6-13) preserva la actividad biológica de la UAG (6-13) y una combinación de acetilación N-terminal y la sustitución de, por ejemplo, Pro<sup>7</sup> por D-Pro (su forma D) produce un análogo que también presenta actividad biológica. Por lo tanto, las estrategias que se dirigen a la estabilización del extremo N de la UAG (6-13) para mejorar su resistencia a la degradación por ejemplo, por exopeptidasas y endopeptidasas (tales como, pero no limitarse a, DPP IV) producen péptidos que aún presentan actividad biológica de UAG (6-13), haciéndolos útiles para usos in vivo.

Los péptidos de la presente invención, incluyendo sus análogos, se pueden producir en células hospedantes diseñadas genéticamente de acuerdo con técnicas convencionales. Las células hospedantes adecuadas son aquellos tipos de células que se pueden transformar o transfectar con ADN exógeno y crecen en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas, y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Las técnicas de manipulación de moléculas de ADN clonado e introducción de ADN exógeno en una variedad de células hospedantes se describen al menos por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> edición., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, y Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY., 1987.

En general, una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la presente invención se une operativamente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo en general un promotor de la transcripción y terminador dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá habitualmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que dentro de ciertos sistemas se pueden proporcionar marcadores seleccionables en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno se puede proporcionar por integración en el genoma celular hospedante. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una materia de diseño rutinario de la experiencia ordinaria en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido a la ruta secretora de una célula hospedante, se puede proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN de marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se colocan habitualmente en 5' de la secuencia de ADN que codifica el propéptido de interés, aunque algunas secuencias señal se pueden colocar en otra parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch et al., patente de EE.UU. N° 5.037.743; Holland et al., patente de EE.UU. N° 5.143.830). Los métodos para producir y/o fabricar el polipéptido de la invención se conocen bien y practican en la técnica.

Los péptidos de la invención se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida. La síntesis en fase sólida es un método común para la síntesis de péptidos. Básicamente, en esta técnica, se unen moléculas en una perla y se sintetizan etapa por etapa en una solución de reaccionante; en comparación con la síntesis normal en un estado líquido, es más fácil retirar el reaccionante en exceso o producto secundario del producto. En este método, las unidades estructurales se protegen en todos los grupos funcionales reactivos. Los dos grupos funcionales que pueden participar en la reacción deseada entre unidades estructurales en la solución y en la perla se pueden controlar por el orden de desprotección.

En el método básico de la síntesis en fase sólida, se usan unidades estructurales que tienen dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales de la unidad estructural normalmente se protege con un grupo protector. El material de partida es una perla que se une a la unidad estructural. En primer lugar, esta perla se añade a la solución de la unidad estructural protegida y se agita. Después de completarse la reacción entre la perla y la unidad estructural protegida, se separa la solución y la perla se lava. Después se elimina el grupo protector y las etapas anteriores se repiten. Después de terminar todas las etapas, el compuesto sintetizado se escinde de la perla.

Si se sintetiza un compuesto que contiene más de dos tipos de unidades estructurales, se añade una etapa antes de la desprotección de la unidad estructural unida a la perla; debe protegerse un grupo funcional que está en la perla y no reacciona con una unidad estructural añadida, mediante otro grupo protector que no se elimina en las condiciones de desprotección de la unidad estructural. Los productos secundarios que carecen de la unidad estructural de esta etapa solamente se evitan por esta etapa. Además, esta etapa hace más fácil la purificación del compuesto sintetizado después de la escisión de la perla.

Normalmente, los péptidos se sintetizan desde la cadena en este método, aunque los péptidos se sintetizan en la dirección opuesta en las células. Un aminoácido amino-protégido se une a una perla (una resina), formando un enlace covalente entre el grupo carbonilo y la resina. Después el grupo amino se desprotege y reacciona con el grupo carbonilo del siguiente aminoácido amino-protégido. La perla ahora porta dos aminoácidos. Este ciclo se repite para formar la cadena peptídica deseada. Después de completarse todas las reacciones, el péptido sintetizado se escinde de la perla.

Los grupos protectores para los grupos amino usados principalmente en esta síntesis peptídica son, pero sin limitación, el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y t-butiloxycarbonilo (Boc). El grupo Fmoc se elimina del extremo amino con base mientras el grupo Boc se elimina con ácido. Cualquier experto en la técnica a la cual esta invención pertenece estará familiarizado con la técnica de la síntesis en fase sólida de péptidos.

Se pueden usar otras técnicas para sintetizar los péptidos de la invención. Las técnicas para producir y obtener los péptidos de la invención se conocen bien en la técnica.

Los péptidos de la invención se pueden purificar usando métodos y medios de purificación de fraccionamiento y/o convencionales. Por ejemplo, se puede usar precipitación con sulfato de amonio y extracción con ácido o agente caotrópico para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación de ejemplo pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaños, FPLC y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Los medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales, y similares. Se pueden usar derivados de PEI, DEAE, QAE y Q (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Los medios cromatográfico de ejemplo incluye aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo, u octilo, tales como fenil-sefarosa FF (Pharmacia), Toyopearl butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, Pa.), octil-sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticuladas, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos carbohidrato. Los ejemplos de métodos químicos de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados de carboxilo y amino para métodos químicos de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos se conocen bien y se usan ampliamente en la técnica, y están disponibles en proveedores comerciales.

Aunque se han sintetizado fragmentos de UAG que contienen los restos de aminoácidos 6-13, 8-12, 8-13 y análogos de fragmentos UAG, un experto en la técnica, con conocimiento de la presente invención, puede determinar fácilmente si un fragmento de UAG particular o análogo del mismo tiene las actividades biológicas esperadas.

#### Usos terapéuticos y tratamientos

La expresión "tratamiento de una enfermedad o un trastorno" se refiere a la administración de una sustancia terapéutica eficaz para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para disminuir la gravedad o curar la enfermedad, o para prevenir que ocurra la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere al tratamiento tanto terapéutico como profiláctico y a medidas preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad o trastorno, afección o afección médica así como aquellos en los que se va a prevenir la enfermedad, trastorno, afección o afección médica. Los que necesitan tratamiento también son aquellos en los que el trastorno, enfermedad, afección o afección médica ha ocurrido y ha dejado secuelas o cicatrices. El tratamiento también se refiere a la administración de una sustancia terapéutica eficaz para mejorar o aliviar los síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno, una afección o afección médica para disminuir la gravedad o curar la enfermedad, trastorno, afección o afección médica, o prevenir que ocurra la enfermedad, trastorno o afección.

La expresión "trastornos metabólicos" se refiere, pero no se limita a, trastornos del metabolismo de hidratos de carbono, trastornos del metabolismo de aminoácidos, trastornos del metabolismo de ácidos orgánicos (acidurias orgánicas), trastornos de oxidación de ácidos grasos y metabolismo mitocondrial, trastornos del metabolismo de porfirinas, trastornos del metabolismo de purinas o pirimidinas, trastornos del metabolismo de esteroides, trastornos de la función mitocondrial, trastornos de la función peroxisomal y trastornos de almacenamiento lisosomal.

La expresión "síndrome metabólico" se refiere a una combinación de trastornos médicos que incrementan el riesgo de tener una enfermedad cardiovascular y/o diabetes.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es que los fragmentos de grelina no acilada y sus análogos y péptidos que los comprenden tienen un efecto de disminución de glucosa ya que la grelina no acilada previene los efectos hiperglucémicos de la grelina acilada, un efecto de sensibilización de insulina, un efecto de potenciación de la secreción de insulina, un efecto de disminución de peso de grasa corporal, un efecto de disminución de ácidos grasos libres (FFA) y de cortisol, indicando un efecto de los fragmentos de grelina no acilada en la dislipidemia.

Además de estas propiedades, los fragmentos de grelina no acilada y sus análogos pueden estimular la proliferación y la supervivencia, así como inhibir la muerte de células secretoras de insulina tales como, células-β pancreáticas.

5 Por lo tanto, la invención proporciona un potencial terapéutico de fragmentos de grelina no acilada y sus análogos en el tratamiento de, por ejemplo, diabetes, otras afecciones médicas relacionadas con el metabolismo alterado de la glucosa o insulina, deficiencias o resistencia a la insulina, dislipidemia, obesidad, el síndrome metabólico y el tratamiento de células secretoras de insulina tales como células-β pancreáticas.

Es un aspecto adicional, la invención proporciona cualquier composición farmacéutica que incorpora al menos uno de los péptidos de la invención, que comparte la misma indicación terapéutica potencial que la propia UAG.

10 Los péptidos de la presente invención se pueden usar para, y se pueden incorporar en las formulaciones farmacéuticas para usarse en la prevención, reducción y/o tratamiento de, por ejemplo, pero sin limitación, trastornos o afecciones médicas asociadas con el metabolismo alterado de glucosa, metabolismo alterado de insulina, metabolismo alterado de lípidos, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, obesidad, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, trastornos del síndrome metabólico asociados con proliferación alterada de células secretoras de insulina o con resistencia a insulina.

15 Para usos terapéuticos y/o farmacéuticos, los péptidos de la invención se pueden formular para, pero sin limitación, suministro intravenoso, subcutáneo, transdérmico, oral, bucal, sublingual, nasal, inhalación, pulmonar, o parenteral de acuerdo con métodos convencionales. La inyección intravenosa puede ser por medio de bolo o infusión durante un periodo de tiempo convencional. Los péptidos de la invención también pueden ser compatibles con el sistema de suministro de fármacos tal como, pero sin limitación, formulaciones de depósito basadas en polímero.

20 Los ingredientes activos para ser administrados por vía oral como una suspensión se pueden preparar de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener, pero sin limitación, celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido alginico o alginato de sodio como un agente de suspensión, metilcelulosa como un potenciador de la viscosidad, y agentes edulcorantes/saborizantes. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener, pero sin limitación, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, extensores, disgregantes, diluyentes y lubricantes.

Las formulaciones administradas por aerosol nasal o inhalación se pueden preparar, como soluciones en solución salina, usando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, usando fluorocarbonos, y/o usando otros agentes de solubilización o dispersión.

30 Los péptidos de la invención se pueden administrar en forma intravenosa (tanto en bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o forma intramuscular. Cuando se administra por inyección, la solución o suspensión inyectable se puede formular usando diluyentes o disolventes adecuados aceptables por vía parenteral, no tóxicos, bien conocidos en la técnica.

35 En general, las composiciones farmacéuticas comprenderán al menos uno de los péptidos de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable que será bien conocido por los expertos en la técnica. Las composiciones pueden comprender adicionalmente, por ejemplo, uno o más excipientes, diluyentes, cargas, solubilizantes, conservantes, sales, agentes de tamponamiento y otros materiales adecuados bien conocidos en la técnica dependiendo de la forma farmacéutica usada. Los métodos de la composición se conocen bien en la técnica.

40 En el presente contexto, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” pretende indicar cualquier material, que es inerte en el sentido de que no tiene sustancialmente ningún efecto terapéutico y/o profiláctico por sí mismo. Un excipiente farmacéuticamente aceptable se puede añadir a los péptidos de la invención con el propósito de permitir la obtención de una composición farmacéutica, que tiene propiedades técnicas aceptables.

45 Los intervalos de dosis terapéutica de la invención generalmente variarán de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Las dosis terapéuticas que están fuera de este intervalo pero que tienen los efectos terapéuticos deseados también están abarcadas por la presente invención.

Los regímenes de dosificación adecuados preferiblemente se determinan considerando factores bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse, el tipo de sujeto al que se administra; edad, peso, sexo y afección médica del sujeto, la ruta de administración; la función renal y hepática del sujeto; el efecto deseado; y el compuesto particular usado.

50 Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos de la invención (también denominados en la presente memoria “compuesto activo”) es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la disminución de los niveles de glucosa en sangre, mejorando la sensibilidad a la insulina y/o secreción, reduciendo los niveles de ácidos grasos libres en la sangre, disminuyendo el peso de grasa corporal, disminuyendo los niveles de cortisol y/o aumentando la supervivencia de células secretoras de insulina, entre otros cambios. Las pruebas para medir dichos parámetros son conocidas para los expertos en la técnica.

55

Los péptidos de la invención se pueden proporcionar en un kit. Dicho kit típicamente comprende un compuesto activo en una forma farmacéutica para la administración. Una forma farmacéutica comprende una cantidad suficiente de compuesto activo de tal manera que se puede obtener un efecto deseable. Preferiblemente, un kit comprende instrucciones indicando el uso de la forma farmacéutica para lograr el efecto deseado y la cantidad de forma farmacéutica que debe tomarse durante un periodo de tiempo especificado.

#### Experimentos y análisis de datos

##### Los fragmentos de UAG promueven la supervivencia de células- $\beta$ INS-1E

La supervivencia de células se valoró por el ensayo de MTT en células- $\beta$  INS-1E de rata incubadas con UAG humana de longitud completa (1-28) o UAG (1-14), UAG (1-18), UAG (1-5) y UAG (17-28) en medio desprovisto de suero, ya sea solo o con IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , cuya sinergia se ha mostrado que está implicada en la muerte de células  $\beta$  en la diabetes de tipo 1 y tipo 2 (Ref. 16). Los péptidos se ensayaron en concentraciones crecientes, que variaban de 0,1 nM a 100 nM. En condiciones exentas de suero, las UAG (1-14) y (1-18) mostraron un efecto de supervivencia significativo, comparable al de la UAG (1-28). En las mismas condiciones, las UAG (1-5) y (17-28) presentaron una acción reducida, aunque significativa, de supervivencia (figura 1). En presencia de citoquinas, todos los péptidos aumentaron significativamente la supervivencia celular en cada concentración ensayada (figura 2). Sin embargo, de forma similar a las condiciones exentas de suero, la UAG (1-5) y UAG (17-28) presentaron un efecto reducido. De manera interesante, la UAG (1-14) y también la UAG (1-18) mostraron que eran más potentes que la UAG de longitud completa (1-28) (figura 2). Estos resultados indican que los fragmentos UAG, en particular UAG (1-14) y (1-18), de forma similar a la UAG de longitud completa (1-28), son capaces de contrarrestar la muerte de células- $\beta$  inducida por privación de suero o tratamiento con citoquinas.

##### Los fragmentos de UAG promueven la supervivencia de célula- $\beta$ HIT-T15

También se llevaron a cabo experimentos de MTT en células- $\beta$  HIT-T15 de hámster, para analizar el efecto en la supervivencia de la UAG (1-28) o sus fragmentos UAG (1-14), UAG (1-18), UAG (1-5) y UAG (17-28) en medio desprovisto de suero, ya sea solo o con IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . Como para los experimentos realizados en células- $\beta$  INS-1E, los péptidos se ensayaron en concentraciones crecientes, que variaban de 0,1 nM a 100 nM. Con respecto a INS-1E, en células HIT-T15, los péptidos presentaban diferentes efectos protectores contra la muerte celular inducida por privación de suero y por citoquinas. Realmente, mientras que la UAG (1-14) y UAG (1-18) aumentaban significativamente la viabilidad celular en ambas condiciones experimentales (figuras 3A y 3B), la UAG (1-5) aumentaba ligeramente la supervivencia celular solo en células tratadas con citoquinas, mientras que la UAG (17-28) no tenía efecto significativo, en cualesquiera condiciones examinadas (figuras 4A y 4B).

El efecto en la supervivencia de la UAG (6-13), UAG (8-13), UAG (8-12), UAG (8-11), UAG (9-12), y UAG (9-11) se valoró en células- $\beta$  HIT-T15 tratadas con citoquinas. Como se esperaba, las citoquinas (IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ) reducían fuertemente la supervivencia celular con respecto a condiciones de cultivo normal (medio que contiene suero). La UAG (6-13), en todas las concentraciones ensayadas (1 nM a 100 nM) y particularmente 100 nM, inhibía potentemente la muerte celular inducida por citoquinas aumentando la supervivencia celular hasta valores similares a o aún mayores a los observados en presencia de suero. De manera interesante, el efecto en la supervivencia de la UAG (6-13) era comparable a aquel de la UAG (1-28) de longitud completa (figura 5A).

Bajo las mismas condiciones experimentales, la UAG (8-13), aunque menos que la UAG (6-13), mostraba un efecto protector significativo en todas las concentraciones examinadas, mientras que la UAG (8-12) presentaba una protección significativa, aunque reducida, solo con 10 nM y 100 nM. Los efectos protectores de los péptidos UAG (8-13) y UAG (8-12) se encontraron similares a los de UAG (1-14) y UAG (1-18). Un péptido hecho de la secuencia inversa de UAG (1-14) y denominado UAG (14-1), se usó como control negativo para estos experimentos (figura 5A). Con respecto a la UAG (8-11), UAG (9-12) y UAG (9-11) (figura 5B), los resultados de MTT indicaban que la UAG (8-11) ejercía un efecto significativo en la supervivencia solo con 100 nM y la UAG (9-12) aumentaba significativamente la supervivencia celular en ambas concentraciones analizadas (1 y 100 nM). Sin embargo, estos efectos eran más bajos, a los de la UAG (6-13) (figura 5B). La UAG (9-11) no tenía un efecto significativo en ambas concentraciones ensayadas (figura 5B).

##### Los fragmentos de UAG ejercen efectos antiapoptóticos en células- $\beta$ HIT-T15

Se cultivaron células- $\beta$  HIT-T15 durante 24 horas en medio exento de suero, ya sea solo o con IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . En ambas líneas celulares, la apoptosis aumentaba con el tratamiento con citoquinas, con respecto a la privación de suero solamente. La UAG (6-13) aumentaba el número de células, inducía agrandamiento celular y formación de islotes pequeños, con respecto a las condiciones con citoquinas (datos no mostrados). Además, reducía significativamente la apoptosis inducida por citoquinas en la concentración de 1 nM, 10 nM y, particularmente, 100 nM donde el efecto antiapoptótico era aún más fuerte que el presentado por la UAG (1-28) (figura 6A). La UAG (8-13), aunque menos que la UAG (6-13), inhibía significativamente la apoptosis con 10 y 100 nM, mientras que la UAG (8-12) mostraba algún efecto protector solo con 100 nM (figuras 6B y 6C, respectivamente). La UAG (14-1), la secuencia inversa de la UAG (1-14), se usó como control negativo, mientras que la UAG (1-28), se usó como control

positivo en cada experimento. Estos resultados indican que, similarmente a los resultados obtenidos para la supervivencia celular, con respecto a la UAG (8-13) y UAG (8-12), la UAG (6-13) ejerce el efecto antiapoptótico más fuerte en las células- $\beta$  HIT-T15 tratadas con citoquinas.

#### Efecto en la supervivencia de fragmentos de UAG en islotes pancreáticos humanos

5 El efecto en la supervivencia de la UAG (1-14), UAG (1-18), UAG (1-5) y UAG (17-28), con respecto al de la UAG (1-28) de longitud completa, se valoró en islotes pancreáticos humanos por MTT. Los péptidos se analizaron en células de islote cultivadas en medio desprovisto de suero, ya sea solo o con  $\text{IFN}\gamma/\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$  (5 ng/ml cada una). La UAG (1-14) aumentaba significativamente la supervivencia celular en medio desprovisto de suero con 10 nM y 100 nM, mientras que en presencia de citoquinas prevenía la muerte celular con 100 nM (figura 7A). La UAG (1-18) aumentaba significativamente la supervivencia celular con 1 nM y 10 nM (figura 7A). La UAG (1-5) presentaba poca acción de supervivencia, aunque significativa, con 10 nM en medio desprovisto de suero, pero no mostraba protección celular después de la adición de citoquinas, en cualquiera de las concentraciones ensayadas (de 1 nM a 100 nM) (figura 7B). La UAG (17-28) aumentaba significativamente la supervivencia de células de islotes cultivadas en condiciones desprovistas de suero, con 10 nM y 100 nM, pero no tenía efecto en presencia de citoquinas (figura 7B). En todos, estos resultados indican que en los islotes humanos, la UAG (1-14) y UAG (1-18) ejercen efectos protectores en condiciones exentas de suero que son similares a las presentadas por la UAG (1-28), mientras que su capacidad de supervivencia se pierde al menos parcialmente en células tratadas con citoquinas donde el efecto de la UAG (1-28) es todavía evidente.

#### Efecto de fragmentos de UAG en la secreción de insulina en islotes pancreáticos humanos

20 Se investigaron los efectos de la UAG (1-14) y UAG (1-18), ambos usados en concentración 100 nM, en la secreción de insulina en islotes humanos. La figura 8A muestra que la UAG (1-14), de forma similar a la UAG (1-28) (figura 8C) y a la exendina-4 (figura 8D), aumentaba significativamente la secreción de insulina tanto en ausencia como en presencia de glucosa (de 2 a 25 mM), mientras que la UAG (1-18) mostraba un efecto significativo con glucosa 7,5 mM (figura 8B). Se usaron la UAG (1-28) y la exendina-4 como controles positivos (figuras 8C y 8D). Estos resultados indican que en islotes pancreáticos humanos la UAG (1-14) y UAG (1-18) estimulan la secreción de insulina inducida por glucosa.

#### Efecto in vivo del fragmento UAG en animales tratados con estreptozotocina (STZ)

30 Se conoce bien que el tratamiento con estreptozotocina (STZ) en ratas recién nacidos causa diabetes (Refs. 24, 25, 26). En la presente memoria, se investigaron los efectos a largo plazo de la UAG (6-13) (una semana de tratamiento seguido por administración de STZ, valoración a los 70 días después de la administración de STZ frente a los de UAG en ratas recién nacidas tratadas con STZ el día 1 de nacimiento). La UAG (6-13) se ensayó en una concentración que era igual (30 nmol/l) o mayor (100 nmol/l) que la de la UAG. De manera interesante, el día 9 después de la inyección con STZ, la tasa de supervivencia del animal, que había disminuido por la STZ con respecto al grupo de control ( $\approx 52\%$ ), aumentó mucho por la UAG ( $\approx 72\%$ ), y por ambas concentraciones de UAG (6-13) ( $\approx 71\%$  y  $89\%$  para 30 nmol/l y 100 nmol/l, respectivamente) (figura 9A). El día 70, la glucosa plasmática aumentó significativamente en  $150\%$  ( $p < 0,01$ ) en el grupo de STZ con respecto al control. La UAG, como se esperaba, contrarrestaba el efecto de la STZ al reducir los niveles de glucosa (en  $\approx 21\%$ ). Se obtuvo un efecto similar con UAG (6-13) tanto 30 nmol/l como 100 nmol/l (reducción de  $31\%$  y  $14\%$ , respectivamente frente al grupo de STZ). De manera interesante, la UAG (6-13) en una concentración igual mostraba un efecto que era más fuerte que el de la UAG (figura 9B). Los animales tratados con STZ mostraron una reducción significativa de niveles de insulina plasmática; la UAG, así como la UAG (6-13), en ambas concentraciones, reducían significativamente este efecto aumentando los niveles de insulina en ratas tratadas con STZ (figura 9C). Se obtuvieron resultados similares con respecto a la secreción de insulina pancreática (figura 9D). Estos resultados indican que el día 70 después del tratamiento con STZ, la UAG (6-13), de forma similar o aún más que la UAG, es capaz de reducir el aumento de glucosa plasmática inducido por la STZ y mejorar los niveles de insulina tanto plasmática como pancreática.

Los fragmentos de UAG modulan los niveles de glucosa plasmática, la sensibilidad a la insulina así como el peso de grasa gonadal in vivo en un modelo genético de diabetes asociado con obesidad y resistencia a la insulina, los ratones ob/ob.

50 Se recogieron muestras de plasma basal de la vena de la cola de ratones ob/ob con alimentación libre y de 16 horas en ayunas, 7 y 6 días antes del implante de la bomba en tubos capilares recubiertos con  $\text{K}_2\text{EDTA}$  (Microvette CB300 K2E; Sarstedt, Alemania). Después los animales se separaron en tres grupos con intervalos de peso aproximadamente equivalentes. Se anestesiaron ratones de 10 semanas de edad, y se insertó una bomba Alzet 1004 cargada, suministro porta primero, en la cavidad peritoneal. Las capas musculoperitoneales y de piel después se cerraron usando suturas interrumpidas (sutura absorbible Vicryl 5,0 FS-2). Los animales recibieron bombas que contenían solución salina, UAG 10 mg/ml, o UAG (6-13) 3,5 mg/ml ( $n=8$  por grupo). Las bombas Alzet 1004 suministran  $12 \mu\text{l/día}$ , e infunden  $30 \mu\text{g}$  de hUAG/animal/día ( $\sim 600 \mu\text{g/kg/día}$ ) y  $10 \mu\text{g}$  de UAG (6-13)/animal/día ( $\sim 200 \mu\text{g/kg/día}$ ).

Se obtuvieron muestras de sangre (a las 09:00-10:00) de animales alimentados y en ayunas las semanas 2 y 4 por la vena de la cola en tubos con EDTA Microvette. Los niveles de glucosa en la sangre de la vena de la cola se midieron directamente usando un glucómetro. En el último día de tratamiento se tomaron muestras de sangre basales (en ayunas).

5 Aunque no se observaron efectos estadísticamente significativos (RM-ANOVA) en los niveles de glucosa plasmática posprandial durante el periodo de tratamiento, la UAG (6-13) mostraba un efecto reductor constante respecto a los controles de solución salina, y en la semana 4, la UAG también reducía los niveles de glucosa respecto a los controles (figura 14A). En contraste, las concentraciones de glucosa en ayunas se reducían significativamente en un 25-30% respecto a los controles tratados con solución salina, por el tratamiento con UAG y UAG (6-13) la semana 2 (figura 14B). Este efecto permanecía la semana 4 (figura 14B). Como se esperaba, tanto los niveles de glucosa en ayunas como posprandial en los controles aumentaban durante el periodo de tratamiento, ya que los ratones ob/ob alcanzan valores de hiperglucemia máximos en aproximadamente 12 semanas (Ref. 27).

10 Los niveles de insulina plasmática en ayunas se reducían significativamente por la UAG en 2 semanas en relación con controles de solución salina (figura 15). Sin embargo, a las 4 semanas de tratamiento, los niveles de insulina en ayunas aumentaban significativamente por encima de los niveles basales, y con respecto a los controles de solución salina.

20 Durante el periodo de tratamiento, en animales ob/ob tratados con UAG (6-13), disminuyó el peso de la almohadilla de grasa gonadal en aproximadamente 7% con respecto a los controles tratados con solución salina (tendencia  $p < 0,06$ ) (figura 16). La UAG y UAG (6-13) no produjeron un aumento en el peso de grasa gonadal durante el periodo de tratamiento, como se observa con el tratamiento con grelina. La tendencia hacia una disminución en el peso de grasa sugiere que una exposición más prolongada a la UAG y UAG (6-13) ejercerá un efecto lipolítico que se traduce en una reducción en masa de grasa, y por lo tanto, puede constituir un tratamiento prometedor para la obesidad, acompañado de efectos beneficiosos en la sensibilidad a la insulina (por ejemplo, Refs. 28, 29).

25 Los hallazgos de este protocolo de tratamiento a largo plazo eran que la UAG y UAG (6-13) reducían los niveles de glucosa plasmática en animales en ayunas después de 2 y 4 semanas de tratamiento, respecto a animales de control con solución salina. La UAG (6-13) también parecía tener un efecto de reducción del 30-40% en niveles de glucosa plasmática en animales alimentados.

El efecto de la UAG en la glucosa en ayunas observado después de 2 semanas de tratamiento se correspondía con niveles de insulina significativamente menores, indicando una sensibilidad a la insulina mejorada.

30 Unión de fragmentos de UAG a receptores de célula- $\beta$  pancreáticas

Se ensayó la capacidad del fragmento UAG (6-13) para competir de una manera dependiente de la concentración con [ $^{125}$ I-Tyr $^4$ ]-UAG por sitios de unión de HIT-T15 (figura 10A) y INS-1E (figura 10B). Como se muestra en las figuras 10A y 10B, la UAG (1-28) y UAG (6-13) no marcadas competían con una eficacia similar y en una forma dependiente de la concentración con [ $^{125}$ I-Tyr $^4$ ]-UAG por dichos sitios de unión en ambas líneas celulares. Los valores de  $CI_{50}$  calculados de curvas de unión de competición, todos expresados como concentración nM, son  $2,6 \pm 0,5$  y  $2,0 \pm 0,2$  para UAG (1-28) y  $3,8 \pm 0,3$  y  $2,4 \pm 0,3$  para UAG (6-13) en HIT-T15 y INS-1E, respectivamente.

Efectos en la supervivencia de fragmentos de UAG con sustituciones de alanina en células- $\beta$  HIT-T15

35 Se ensayaron fragmentos de UAG con sustituciones de alanina (Ala) en diferentes posiciones de aminoácidos (6 a 13) con respecto a sus efectos en la supervivencia en células- $\beta$  HIT-T15 de hámster. Las células se cultivaron en medio desprovisto de suero, ya sea solo o con IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . Los péptidos se ensayaron en las concentraciones de 1 nM a 100 nM. En condiciones exentas de suero, donde la tasa de supervivencia se reducía en  $\approx 40\%$  con respecto a la presencia de suero, la UAG (6-13) aumentaba significativamente la supervivencia celular, como se esperaba ( $\approx 18\%$  y  $\approx 30\%$  con 1 y 100 nM, respectivamente). Ala 6-UAG (6-13), Ala 7-UAG (6-13), Ala 8-UAG (6-13), Ala 9-UAG (6-13) y particularmente, Ala 12-UAG (6-13) y Ala 13-UAG (6-13), mostraron efectos similares en ambas concentraciones. Por el contrario, se presentaron efectos muy bajos en la supervivencia por la sustitución de Ala en las posiciones 10 y 11 (figura 11A). Bajo tratamiento con citoquinas, donde la supervivencia celular se reducía en  $\approx 18\%$  con respecto a las condiciones de privación de suero, todas las sustituciones de Ala, excepto aquellas en las posiciones 10 y 11, invirtieron completamente la muerte celular y llevaron la tasa de supervivencia a niveles que eran aún más altos que aquellos en condiciones exentas de suero, en concentraciones tanto 1nM como 100 nM. Estos efectos, eran similares a aquellos producidos por el péptido original UAG (6-13) (figura 11B). Las sustituciones de Ala en las posiciones 6 a 9 y 12 a 13 de la UAG (6-13) no afectan al efecto del péptido en la supervivencia, mientras las cadenas laterales de aminoácidos en la posición 10 (Q) y 11 (R) parecen jugar una función esencial.

Efectos en la supervivencia de fragmentos de UAG con sustituciones conservativas y modificaciones N-terminales en células- $\beta$  HIT-T15

En condiciones exentas de suero, donde la tasa de supervivencia se reducía en  $\approx 35\%$  con respecto a la presencia de suero, la UAG (6-13) aumentaba significativamente la supervivencia celular, como se esperaba ( $\approx 18\%$  y  $\approx 30\%$  con 1 y 100 nM, respectivamente). Asp 8-UAG (6-13), Lys 11-UAG (6-13), Gly 6-UAG (6-13), así como AcSer 6-UAG (6-13) y AcSer 6-(D)Pro 7-UAG (6-13) mostraban efectos similares con ambas concentraciones (figura 12A). En el tratamiento con citoquinas, donde la supervivencia celular se redujo en  $\approx 20\%$ , todos los péptidos aumentaron significativamente la supervivencia celular. Particularmente, el mejor efecto es ejercido por Gly 6-UAG (6-13), mientras que el más bajo se observa usando AcSer 6-UAG (6-13), AcSer 6-(D)Pro 7-UAG (6-13) (figura 12B).

#### Efectos en la supervivencia de fragmentos de UAG ciclados en células- $\beta$ HIT T15

En condiciones exentas de suero, donde la tasa de supervivencia se redujo en  $\approx 58\%$  con respecto a la presencia de suero, la UAG (6-13) aumentaba significativamente la supervivencia celular, como se esperaba ( $\approx 16\%$  y  $\approx 60\%$  con 1 nM y 100 nM, respectivamente). Ciclo 6,13 UAG (6-13), ciclo (8-11), Acetil-Ser6, Lys11, UAG (6-13)amida y Acetil-Ser6, Lys11, UAG (6-13)NH<sub>2</sub> mostraron efectos similares (figura 13A). Se encontraron resultados similares en el tratamiento con citoquinas (figura 13B).

#### Materiales y protocolos técnicos

La UAG humana y los fragmentos de UAG (1-14), (1-18), (1-5) y (17-28) así como la exendina-4 eran de Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA). Los otros fragmentos (6-13), (8-13), (8-12), (8-11), (9-12), (9-11) eran de Tib MolBiol (Génova, Italia). Los reactivos de cultivo celular eran de Invitrogen (Milano, Italia). La UAG (6-13) humana con alanina (Ala), Ala 6-UAG (6-13), Ala 7-UAG (6-13), Ala 8-UAG (6-13), Ala 9-UAG (6-13), Ala 10-UAG (6-13), Ala 11-UAG (6-13), Ala 12-UAG (6-13) y Ala 13-UAG (6-13) se sintetizaron en Tib MolBiol (Génova, Italia).

La mayoría de los péptidos definidos en la presente memoria se sintetizaron por medio de la síntesis peptídica múltiple simultánea en el siguiente instrumento: PSSM-8, SHIMADZU, Japón, usando la estrategia de Fmoc/But (G. Schnorrenberg et al. *Tetrahedron*, 45:7759, 1989) de SHEPPARD (W. C. Chan et al., *Fmoc solid phase peptide synthesis - A practical approach*, IRL Press, Oxford, 1989). Los acoplamiento se llevaron a cabo usando 3-6 equivalentes de Fmoc-aminoácido/HOBt/TBTU y 6-12 equivalentes de N-metilmorfolina en resina Tentagel HL RAM. Los péptidos se purificaron mediante el instrumento de HPLC SHIMADZU LC-8A. Los péptidos se desprotegeron y escindieron de la resina mediante TFA/agua y se caracterizaron por MALDI-TOF mediante un instrumento MALDI 2 DE. Finalmente los péptidos se liofilizaron en forma de la sal de TFA.

Cultivo celular - Las células- $\beta$  secretoras de insulina HIT-T15 de hámster se obtuvieron y cultivaron como se ha descrito (Refs. 14, 4). Las células- $\beta$  INS-1E de rata las proporcionó generosamente el Prof. Claes B. Wollheim (University Medical Center, Génova, Suiza) y se cultivaron como se ha descrito (Refs. 14, 4). Los reactivos de cultivo celular eran de Invitrogen (Milano, Italia). Las citoquinas se adquirieron en Biosource (Invitrogen, Italia).

Aislamiento de islotes humanos - Los islotes humanos se obtuvieron de páncreas de donantes de multi-órganos como se ha descrito (Ref. 4). Las preparaciones de islotes con una pureza  $>70\%$ , no adecuadas para el trasplante, fueron proporcionadas por el Consorcio Europeo para el Trasplante de Islotes (ECIT) "Islets for Research Distribution Program" Unidad de Trasplante, Instituto Científico San Raffaele, Vita-Salute University, Milán. Los islotes (10.000) se cultivaron en CRML (Invitrogen) con FBS al 10%

Ensayo de supervivencia celular - la supervivencia celular se valoró con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) como se ha descrito previamente (Ref. 4). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pocillo. Después de los tratamientos, las células se incubaron con MTT 1 mg/ml durante  $\approx 1$  hora. El medio se aspiró, y el producto de formazán se solubilizó con 100  $\mu$ l de DMSO. La viabilidad se valoró por espectrometría a 570 nm de absorbancia usando un lector de placas de 96 pocillos.

Secreción de insulina - Las células HIT-T15 se pusieron en placas con una densidad de  $5 \times 10^5$  células en placas de 100 mm y se privaron de suero durante 24 h antes de incubación durante 1 hora a 37°C en tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato tamponado con HEPES (KRBH), que contenía BSA al 0,5% con glucosa 1,25 mM. El medio se cambió y las células se incubaron nuevamente durante 1 h en KRBH/BSA al 0,5% que contenía glucosa 1,25, 7,5 o 15 mM. Después de la extracción con etanol ácido de la hormona, se cuantificó la insulina secretada con un kit de radioinmunoensayo (Linco Research, Labodia, Yens, Suiza) que reconoce la insulina humana y reacciona de forma cruzada con insulina de rata.

Animales - Las ratas Sprague-Dawley hembra preñadas (n = 10, día 14 - 15 del preñado) se adquirieron en Harlan Srl (Italia), se mantuvieron en jaulas con libre acceso a alimentos y agua con una dieta para ratas de pellets estándar. El nacimiento natural se produjo 6-7 días más tarde. Se estudiaron 5 grupos experimentales: 1) grupo de control, en el que las ratas recién nacidas recibían una sola inyección i.p. de tampón de citrato (0,05 mmol/l, pH 4,5); 2) el grupo de STZ, que recibía una sola inyección i.p. de STZ (100 mg/kg de peso corporal), recién disuelta en tampón de citrato el día 1 del nacimiento; 3) el grupo de STZ+UAG, que recibía una sola inyección i.p. de STZ seguido de inyecciones de UAG, (30 nmol/kg s.c., dos veces al día) durante 7 días (del día 2 al 8) después del nacimiento; 4) el grupo de STZ+UAG (6-13), que recibía una sola inyección i.p. de STZ seguido de inyecciones de

UAG (6-13) (30 nmol/kg s.c., dos veces al día) durante 7 días (del día 2 al 8) después del nacimiento; 5) el grupo de STZ + UAG (6-13), que recibía una sola inyección i.p. de STZ seguido de inyecciones de UAG (6-13), (100 nmol/kg s.c., dos veces al día) durante 7 días (del día 2 al 8) después del nacimiento. Se asignaron madres aleatoriamente a los cinco grupos y las crías de la misma camada se asignaron al mismo grupo. Los números de madres en cada uno de los cuatro grupos eran 11 (control), 11 (STZ), 16 (STZ+UAG), y 21 (STZ + UAG (6-13), 30 nmol/kg) y 15 (STZ + UAG (6-13), 100 nmol/kg). Se dejó a las crías con sus madres. Se ensayó en todos los recién nacidos el día 2 la glicosuria usando Accu-chek Compact Plus (Roche). Solamente aquellos animales que eran glicosúricos el día 2 después del nacimiento se incluyeron en el grupo del modelo de STZ. Los tratamientos con UAG y UAG (6-13) se iniciaron después de confirmar la glicosuria. Los animales se sacrificaron el día 70 después del nacimiento por decapitación. Se recogieron muestras de sangre después de la decapitación e inmediatamente se centrifugaron a 20.000 x g durante 2 minutos a 4°C, y se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaron.

Para los datos experimentales ilustrados en las figuras 14A, 14B, 15 y 16, los animales se obtuvieron de Charles River Laboratories (Maastricht, Países Bajos). Los animales (B6. V-Lep<sup>ob</sup>/J, Charles River Laboratories, Colonia de Bélgica) se recibieron en las instalaciones de animales de los autores de la invención, con 8 semanas de edad, y se aclimataron en jaulas individuales durante 2 semanas antes de empezar los tratamientos. Se mantuvieron en condiciones estándar de luz:oscuridad de 12:12 horas, 21°C, y se permitió libre acceso al alimento y agua. Los animales también se manipularon diariamente para que se acostumbraran al método usado para recoger sangre. Los péptidos se disolvieron en solución salina estéril no pirogénica al 0,9% (Baxter BV, Utrecht, Países Bajos). La D-glucosa se obtuvo de Sigma-Aldrich Chemie BV (Zwijndrecht, Países Bajos), y se disolvió a 400 mg/ml en solución salina al 0,9%. Las bombas Alzet (modelo 1004) se obtuvieron de Charles River Laboratories (Maastricht, Países Bajos). Las bombas se llenaron con solución salina al 0,9%, UAG o UAG (6-13) en condiciones estériles, y se pre-incubaron en solución salina al 0,9% durante al menos 48 horas a 37°C para iniciar el flujo. Los niveles de glucosa en sangre se midieron directamente de las incisiones de la vena de la cola usando un mini-glucómetro Feestyle y tiras de prueba (ART05214 Rev. A; Abbot, Amersfoort, Países Bajos). Los niveles de insulina plasmática se ensayaron mediante ELISA ultrasensible para insulina de ratón (nº de Catálogo 10-1150-10; Mercodia, Suecia).

Extracción del páncreas y tratamiento – Después de la escisión, los páncreas se extrajeron y pesaron. Para la determinación del contenido de insulina, los páncreas (35-50 mg) se homogenizaron y centrifugaron en 5 ml de ácido-etanol (HCl 0,15 mol/l en etanol al 75% [vol/vol] en 1000 g durante 20 min; los líquidos sobrenadantes se almacenaron a -80°C.

Para la inmunohistoquímica, páncreas adicionales se fijaron en paraformaldehído fijador al 4% durante 24 horas y se introdujeron en parafina.

Técnicas analíticas – Los niveles de glucosa plasmática se determinaron usando un analizador de glucosa. La insulina se midió del páncreas o del plasma con RIA como se ha descrito previamente (ref. 15).

Ensayo de unión – Las membranas de células-β pancreáticas HIT-T15 de hámster y INS-1E de rata se prepararon y se ensayaron la presencia de unión [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]-UAG. La capacidad de los fragmentos de UAG para competir con el radioligando por dichos sitios de unión se ha evaluado como se ha descrito previamente (Ref. 4). Los datos se presentan como la media ± S.E.M. de los tres experimentos independientes.

Análisis estadísticos – Los resultados se expresan como media ± SE. Los análisis estadísticos se realizaron usando una prueba T de Student o ANOVA de una vía. Se estableció significancia cuando p < 0,05.

Se entiende que los datos descritos en la presente memoria descriptiva únicamente se dan para ilustrar la invención y no se deben considerar como que constituyen una limitación de la misma.

Aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones específicas de la misma, se entenderá que se pueden hacer modificaciones adicionales y se pretende que esta solicitud cubra cualquier variación, uso, o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción como vienen dentro de la práctica conocida o común de la técnica a la cual la invención pertenece y como se pueden aplicar a las características esenciales expuestas antes, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todos los documentos publicados mencionados en la memoria descriptiva anterior se incorporan en la presente memoria por referencia.

## 50 Referencias

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K; (1999) Ghrelin Is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.

2. van der Lely AJ, Tschop M, Helman ML, Ghigo E; (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457.

3. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ; (2005) Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1055-1060.
- 5 4. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G; (2007) Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic [beta] cells and human islets involvement of CAMP/PKA, ERK1/2 and PI3K/AKT signaling. *Endocrinology* 148:512-529.
- 10 5. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P.; (2004) Glucose sensitivity and metabolism- secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-IE insulinoma cells. *Endocrinology* 145:667-678.
6. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E; (2004) Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3062-3065.
- 15 7. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M et al . ; (2005) Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54:18-24.
8. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A; (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029-1037.
- 20 9. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S; (2002) Ghrelin is present in pancreatic alpha- cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129.
10. Delhanty PJ, van Koetsveld PM, Gauna C, van de Zande B, Vitale G, Hofland LJ, van der Lely AJ; (2007) Ghrelin and its unacylated isoform stimulate the growth of adrenocortical tumor cells via an anti-apoptotic pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293:E302-309.
- 25 11. Dezaki K, Kakei M, Yada T; (2007) Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K<sup>+</sup> channels to attenuate glucose-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*. 56:2319-2327.
- 30 12. Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Tralni S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghe C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A; (2007) Ghrelin and des- acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell*. 18:986-994.
13. Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJ, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen AP, van der Lely AJ; (2007) Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E697-704.
- 35 14. Granata R, Settanni F, Trovato L, Destefanis S, Gallo D, Martinetti M, Ghigo E, Muccioli G; (2006) Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest* 29:RC19-22.
- 40 15. Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghe C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E; (2008) Obestatin promotes survival of pancreatic [beta]-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of -cell mass and function. *Diabetes* 57:967-79.
16. Mandrup-Poulsen T; (2001) beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* 50:S58-63.
- 45 17. Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E; (2004) Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non- type Ia growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27-35.
18. Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF; (2006) Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function. *J Biol Chem* 281:1159-1168.
- 50 19. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L; (2004) Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2924-2929.

20. Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP; (1981) Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4339-4343.
21. Wajchenberg BL; (2007) beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev.* 28:187-218.
- 5 22. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F,- (2002) The ghrelin cell : a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107:63-69.
23. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ; (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin 's effects on food intake. *Science* 310:996-999.
- 10 24. Irako T, Akamizu T, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Tojo K, Tajima N, Kangawa K; (2006) Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* 49:1264-1273.
25. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosseliii G.; (1974) Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23:889-895.
- 15 26. Turrel C, Bailbe D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B; (2001) Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 50:1562-1570.
27. Menahan LA; (1983) Age-related changes in lipid and carbohydrate metabolism of the genetically obese mouse. *Metabolism* 32:172-178.
- 20 28. Hayashi T, Boyko EJ, McNeely MJ, Leonetti DL, Kahn SE, Fujimoto WY; (2008) Visceral Adiposity, not Abdominal Subcutaneous Fat Area, Is Associated with an Increase in Future Insulin Resistance in Japanese Americans. *Diabetes May*; 57(5) :1269-75. Epub 2008 Feb 25.
29. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E; (2006) Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2:367-373..

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ALIZE PHARMA SAS

5 <120> GRELINA NO ACILADA COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS METABÓLICOS

<130> 86937-13 y 86937-15

10 <150> Us 60/941,186  
<151>31-05- 2007

<160> 28

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

25 <210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 3

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser

45 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 4

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55 <400> 5

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

**Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg**  
**1 5 10**

5 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

**Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**

15 <210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 7

**Glu His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**

25 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 8

**Glu His Gln Arg Val**  
**1 5**

35 <210> 9  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

40 **Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser**  
**1 5 10**

45 <210> 10  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

**Glu His Gln Arg**  
**1**

50 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 11

**His Gln Arg Val**  
**1**

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 12  
  
**Ser Pro Asp His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**  
 10  
 <210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 13  
  
**Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln**  
**1 5**  
 20  
 <210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 14  
  
**Gly Pro Glu His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**  
 30  
 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 15  
  
**Ala Pro Glu His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**  
 40  
 <210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 16  
  
**Ser Ala Glu His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**  
 50  
 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 17  
  
**Ser Pro Ala His Gln Arg Val Gln**  
**1 5**  
 60  
 <210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18

**ser Pro Glu Ala Gln Arg val Gln**  
**1 5**

5 <210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 19

**ser Pro Glu His Ala Arg val Gln**  
**1 5**

15 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 20

**ser Pro Glu His Gln Ala val Gln**  
**1 5**

25 <210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

**ser Pro Glu His Gln Arg Ala Gln**  
**1 5**

30 <210> 22  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 22

**ser Pro Glu His Gln Arg val Ala**  
**1 5**

40 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> ACETILACIÓN

50 <400> 23

**ser Pro Glu His Gln Arg val Gln**  
**1 5**

55 <210> 24  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

5 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (2)..(2)  
 <223> amino acido-D

10 <400> 24

**ser Pro Glu His Gln Arg val Gln**  
**1 5**

<210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (1)..(8)  
 <223> Cíclico

20 <400> 25

25 **ser Pro Glu His Gln Arg val Gln**  
**1 5**

<210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (3)..(6)  
 <223> Cíclico

35 <400> 26

40 **ser Pro Glu His Gln Lys val Gln**  
**1 5**

<210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN,

50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (3)..(6)  
 <223> cíclico

55 <400> 27

60 **ser Pro Glu His Gln Lys val Gln**  
**1 5**

<210> 28

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

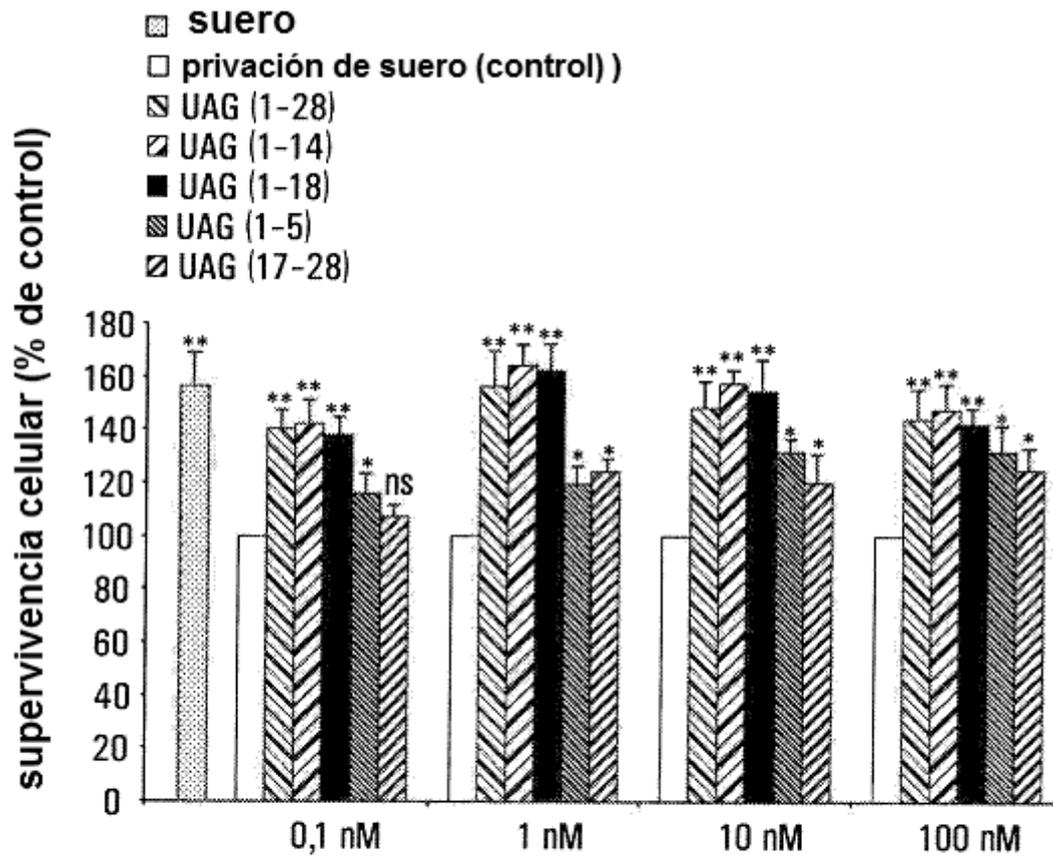
5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

10 <400> 28

Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido aislado que consiste en un fragmento de grelina no acilada como se expone en la SEQ ID NO: 1, y sus análogos, teniendo dicho fragmento 5, 6, 7 u 8 aminoácidos y comprendiendo la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val como se expone en la SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad seleccionada del grupo que consiste en a) disminuir los niveles de glucosa en sangre; b) aumentar la secreción y/o sensibilidad a la insulina; c) unirse a células secretoras de insulina; y d) promover la supervivencia de células secretoras de insulina, y en donde los análogos de dichos fragmentos son fragmentos que varían de la secuencia del fragmento de UAG natural por sustituciones conservativas de aminoácidos.
- 5 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde contiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos de aminoácidos Glu, His y Val.
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento y análogo se selecciona del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.
- 15 4. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 6.
5. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento tiene la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 7.
- 20 6. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos Glu-His-Gln-Arg-Val como se expone en la SEQ ID NO: 8.
7. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos cíclica Ser-Pro-Glu-His-Gln- Arg-Val-Gln como se expone en la SEQ ID NO: 25.
8. El polipéptido aislado de una de las reivindicaciones 1 a 7, para usar en terapia.
9. El polipéptido aislado para su uso según la reivindicación 8, en el tratamiento de un paciente que padece diabetes de tipo I o de tipo II, deficiencias de insulina, resistencia a la insulina, dislipidemia y/u obesidad.
- 25 10. Una composición farmacéutica que comprende el péptido aislado de una de las reivindicaciones 1 a 7.



**FIG. 1**

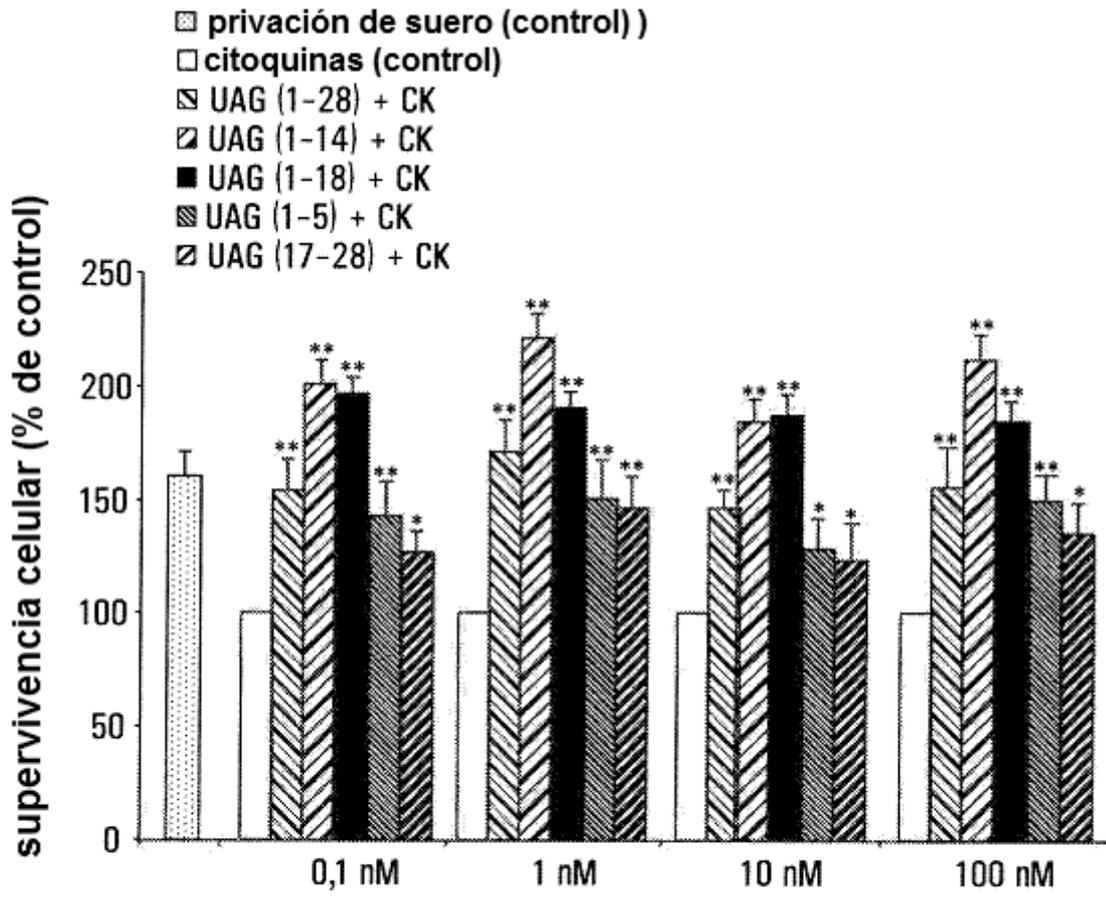


FIG. 2

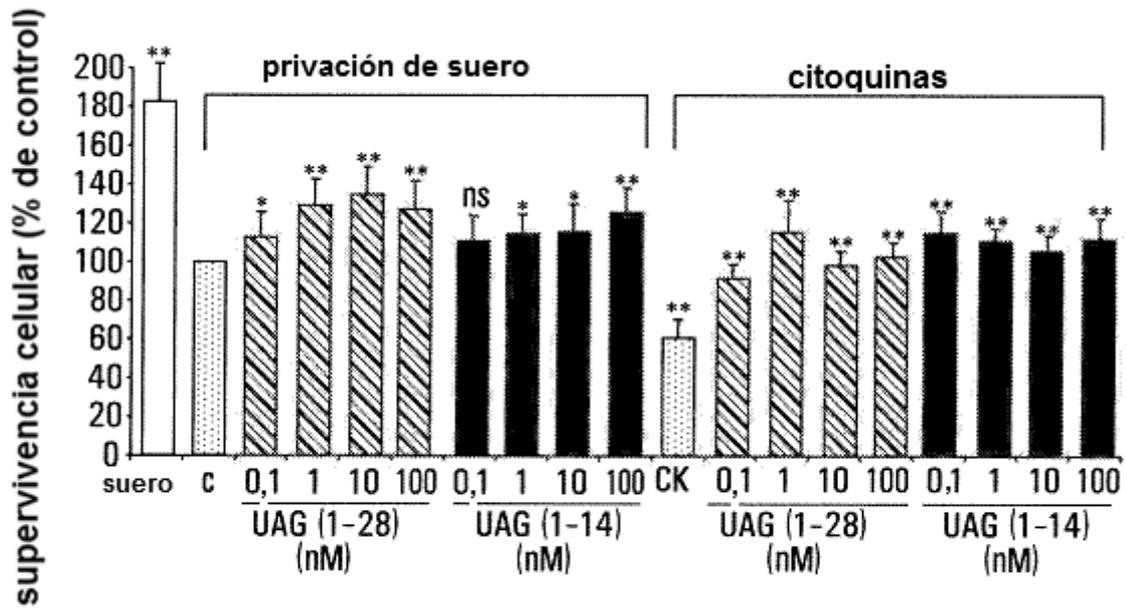


FIG. 3A

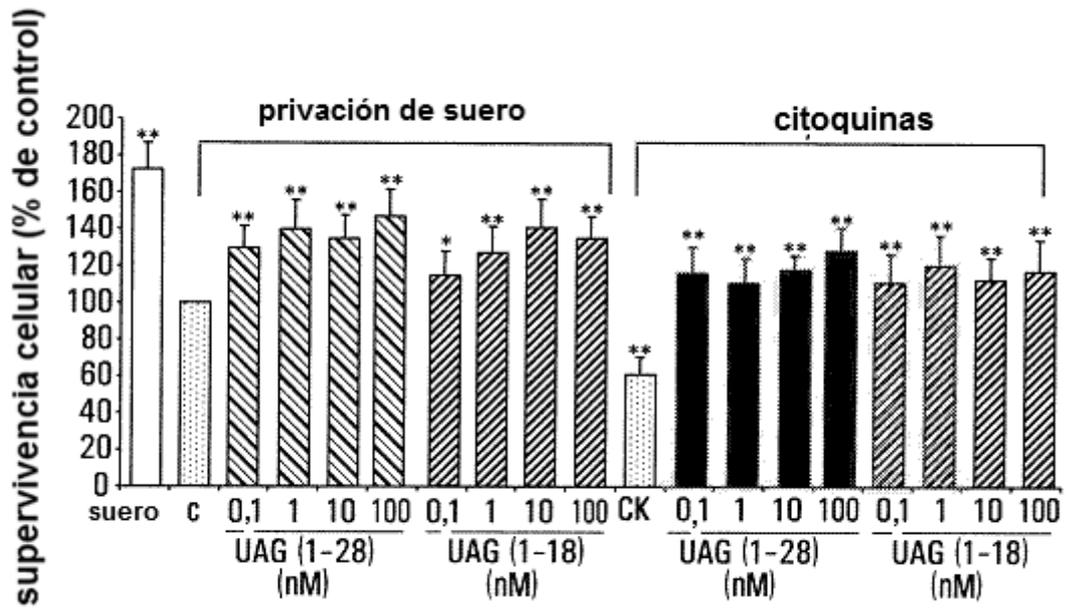


FIG. 3B

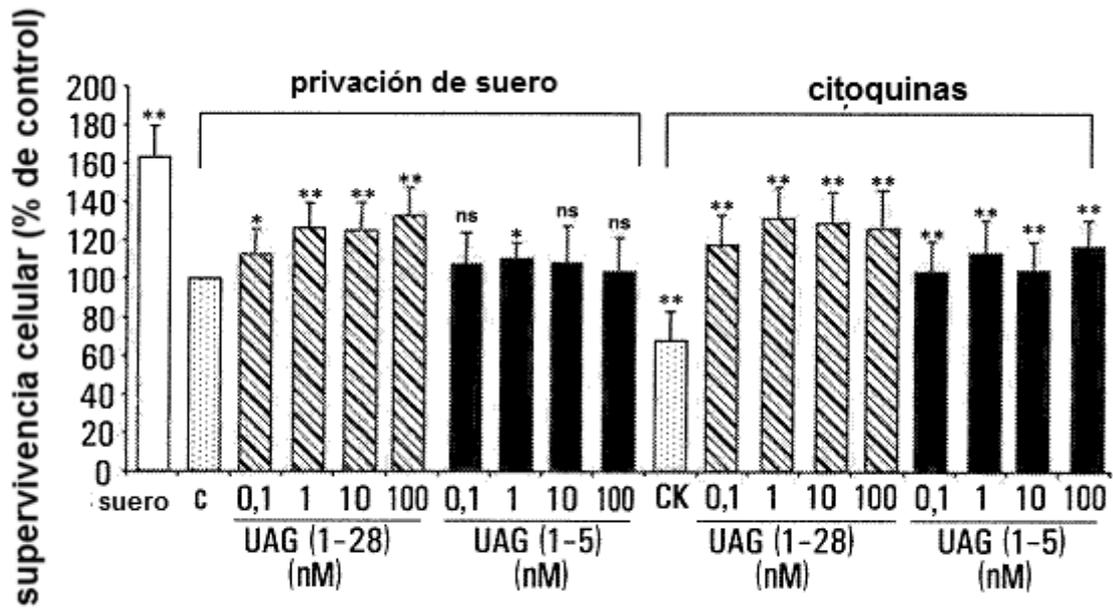


FIG. 4A

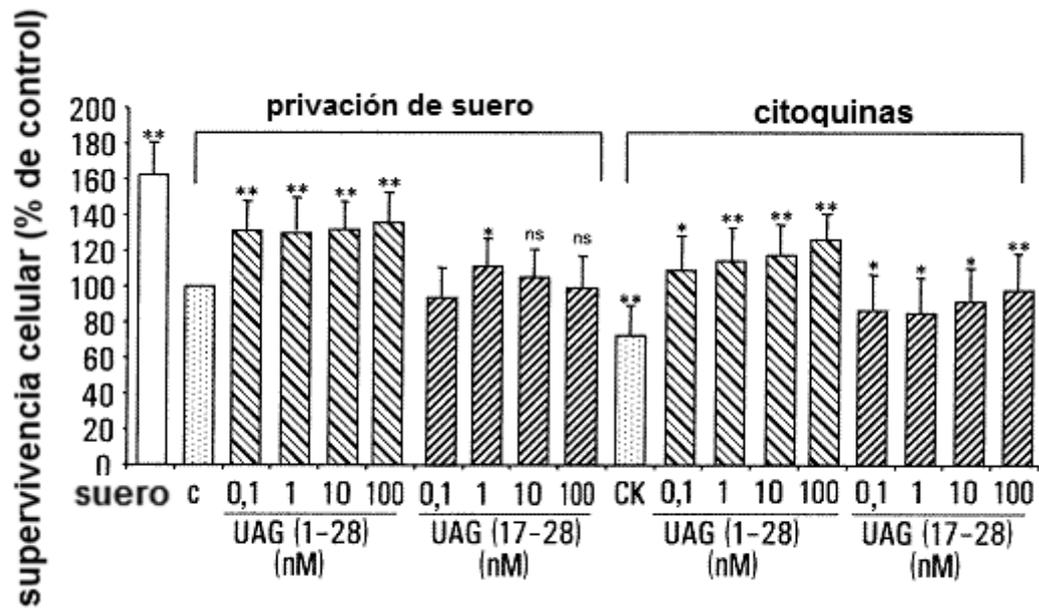


FIG. 4B

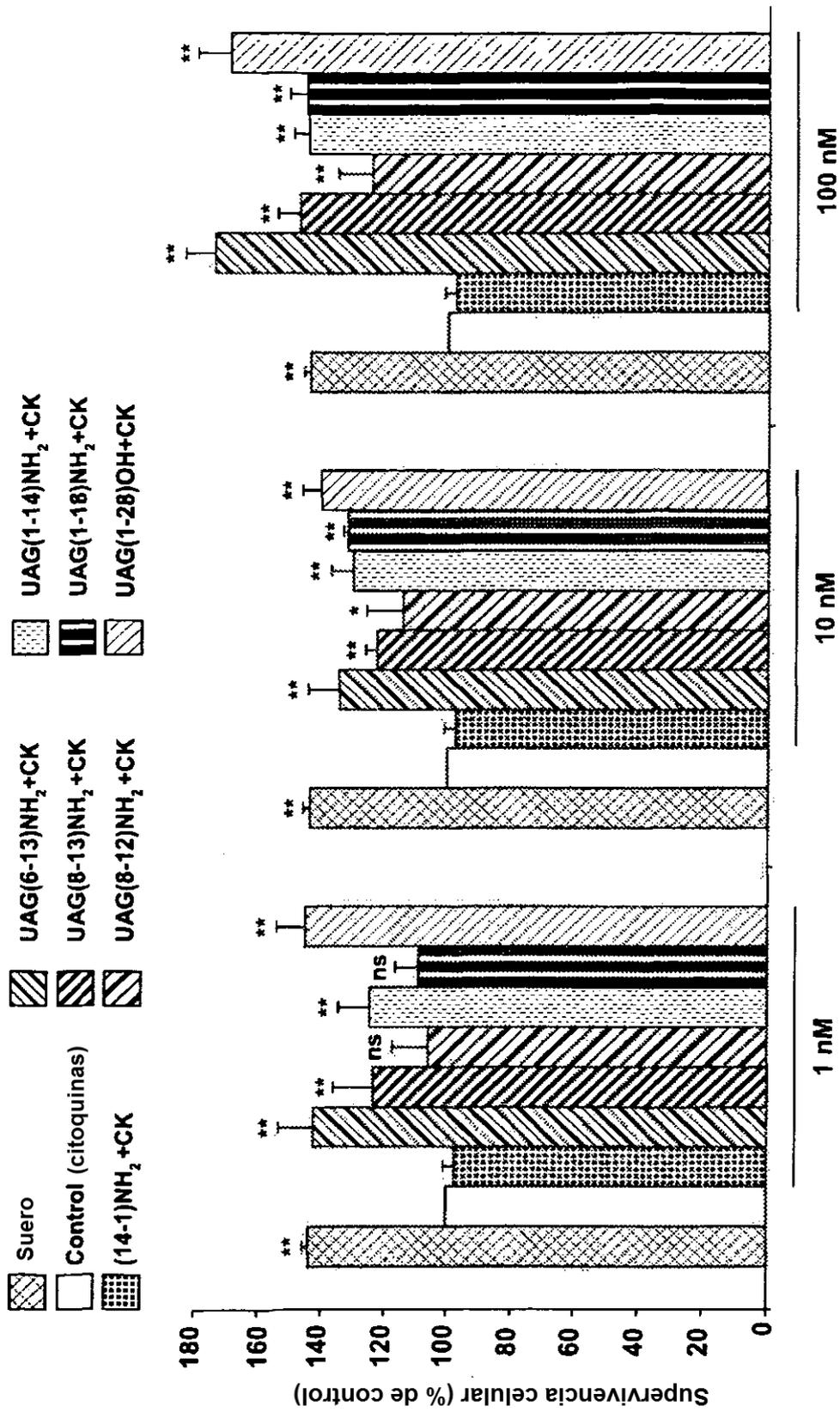


FIG. 5A

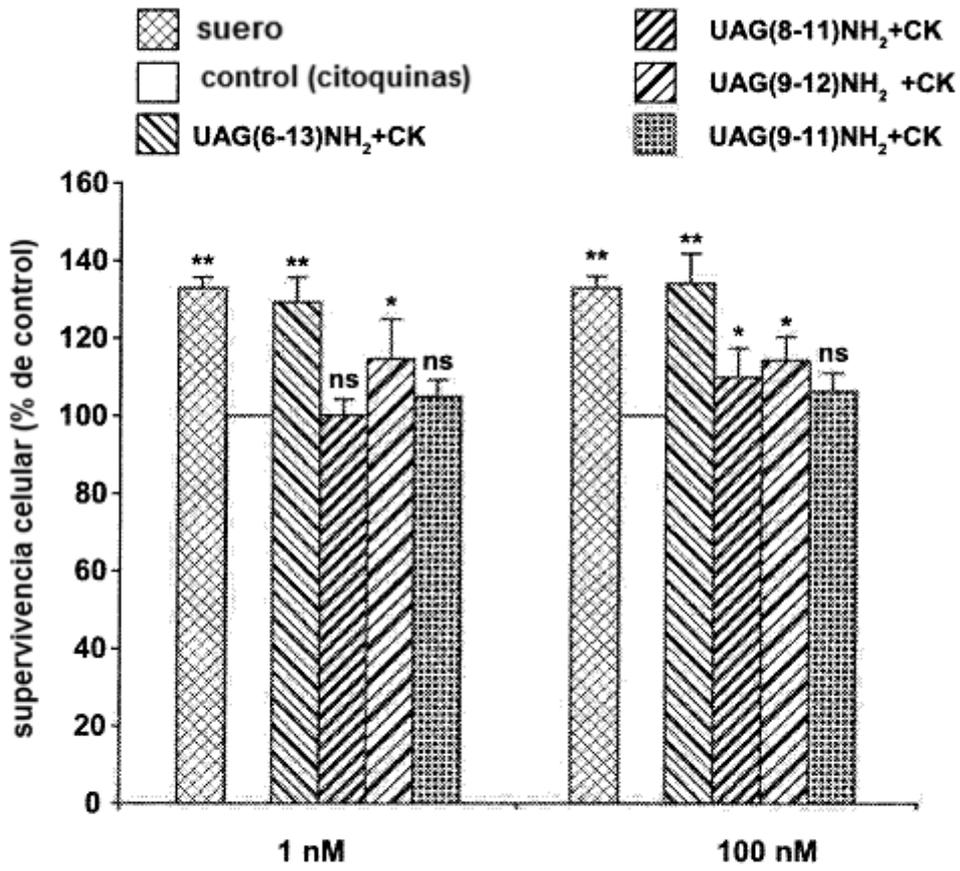


FIG. 5B

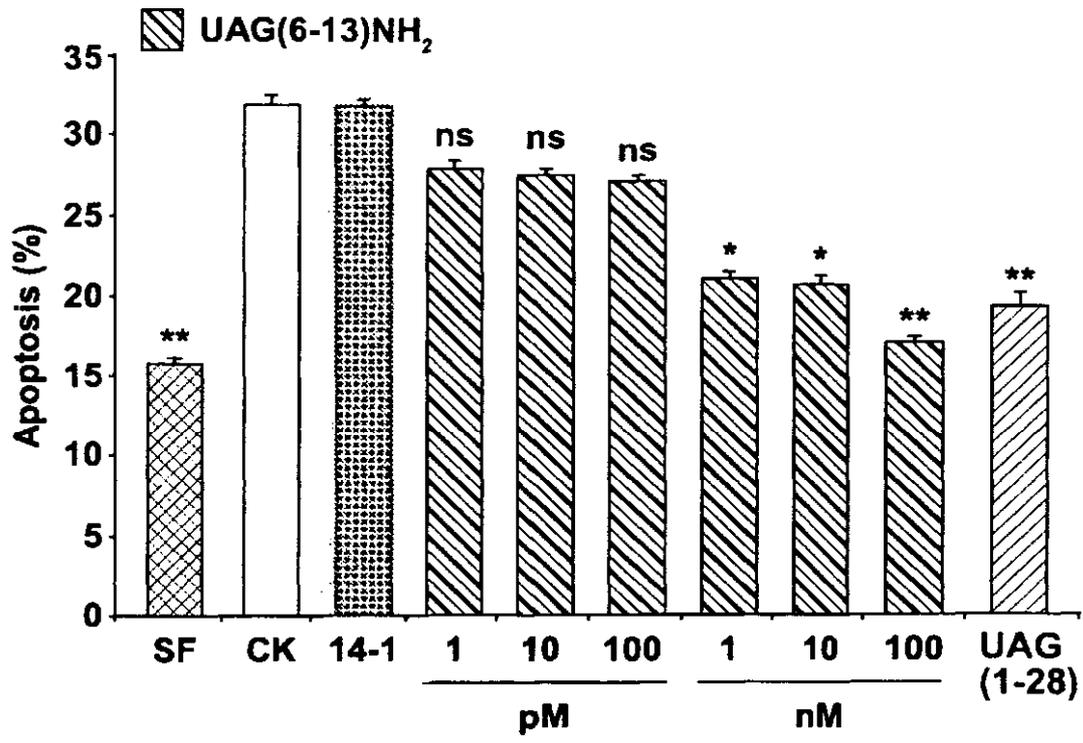


FIG. 6A

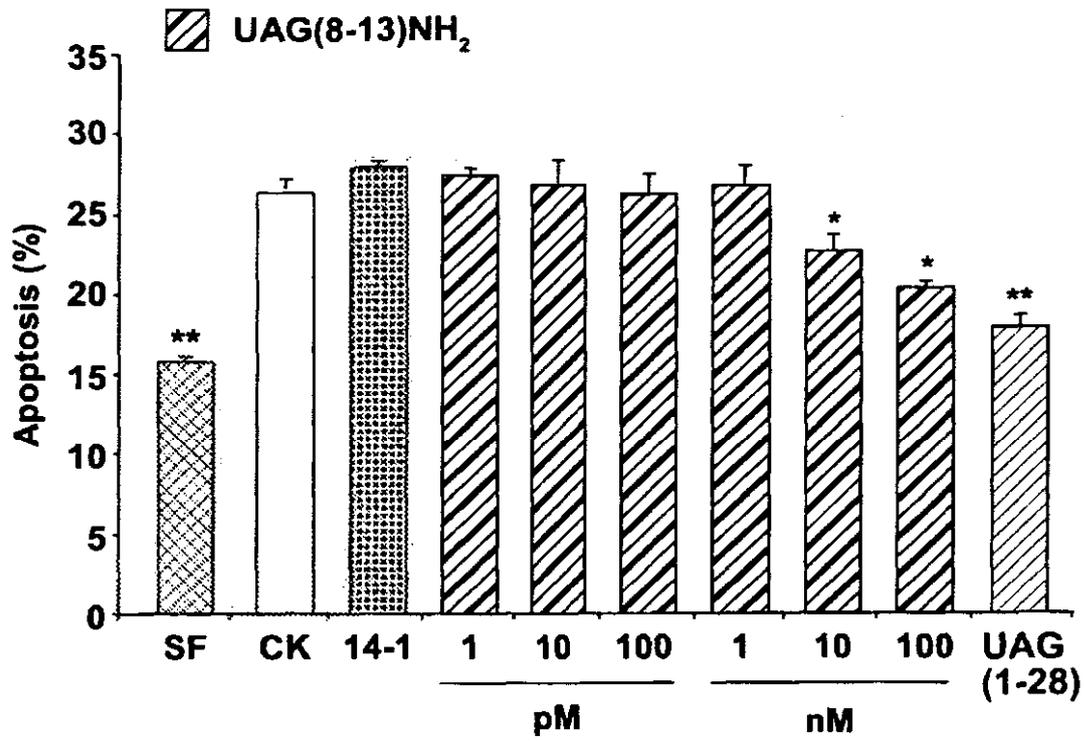


FIG. 6B

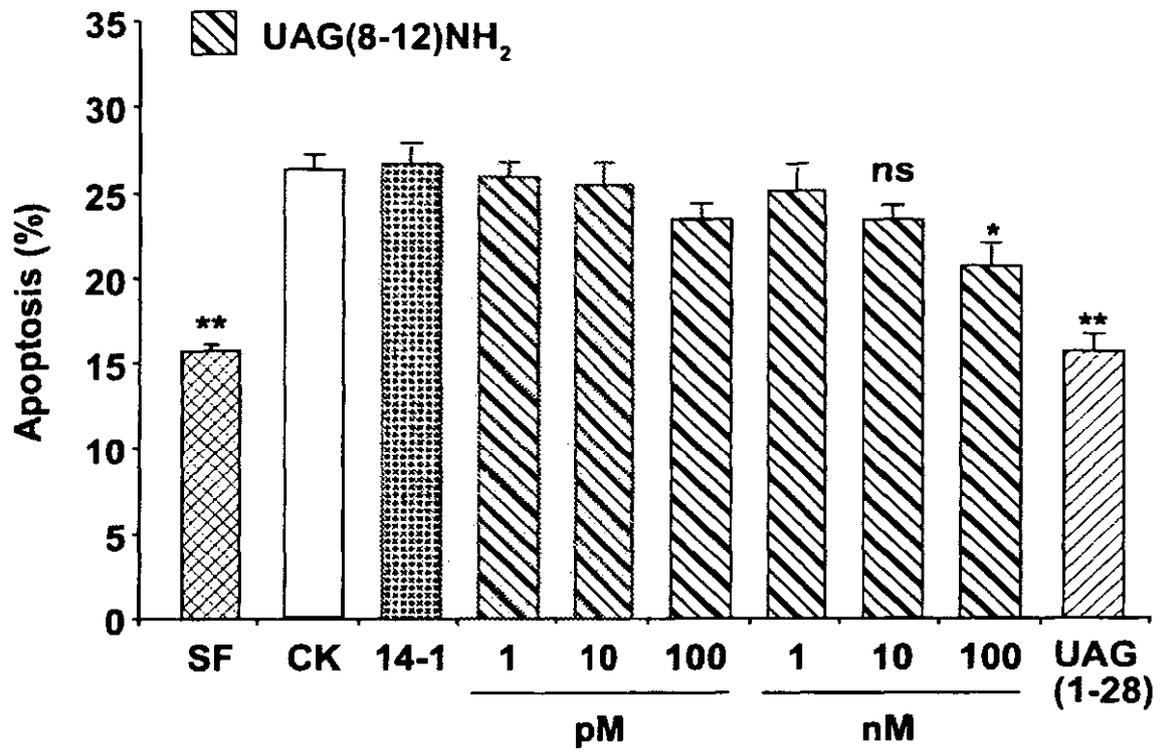


FIG. 6C

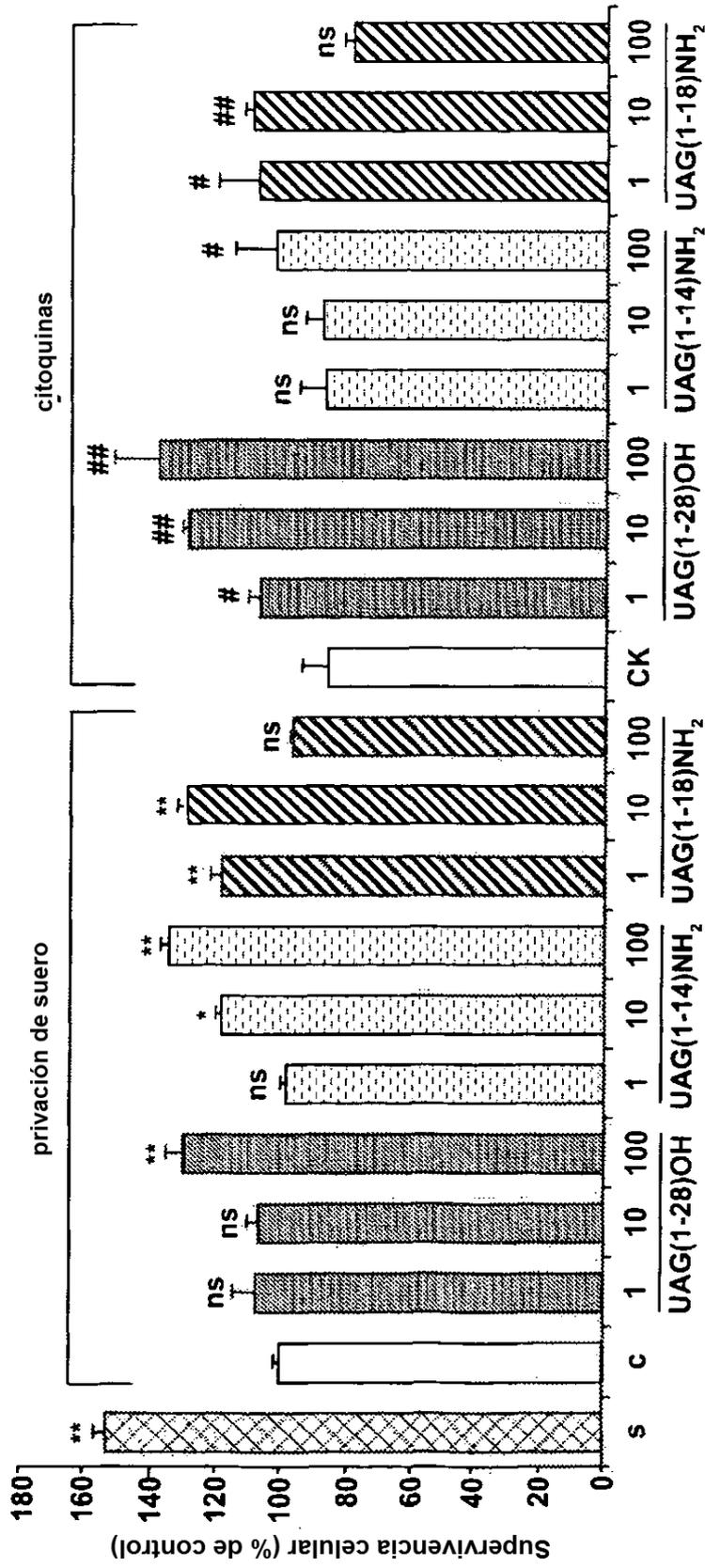


FIG. 7A

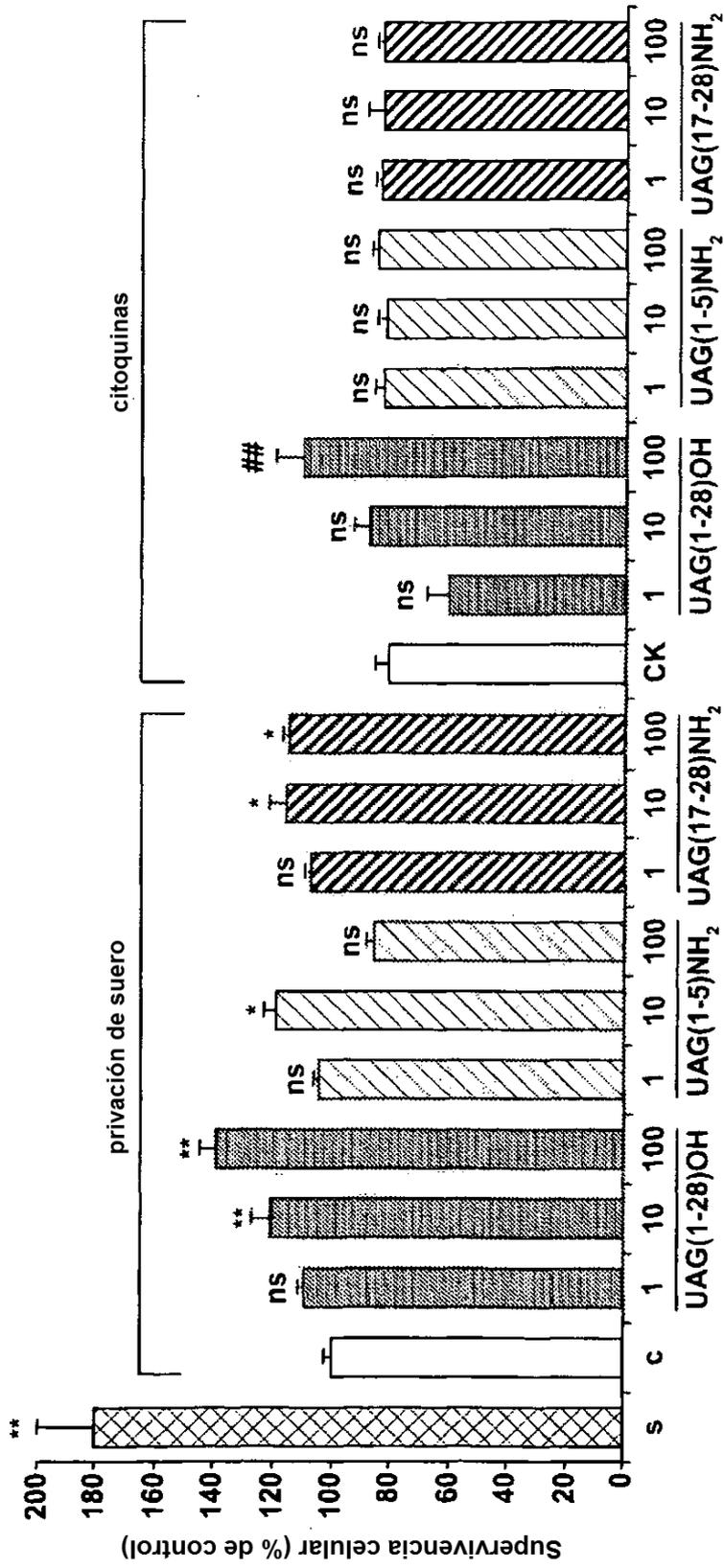
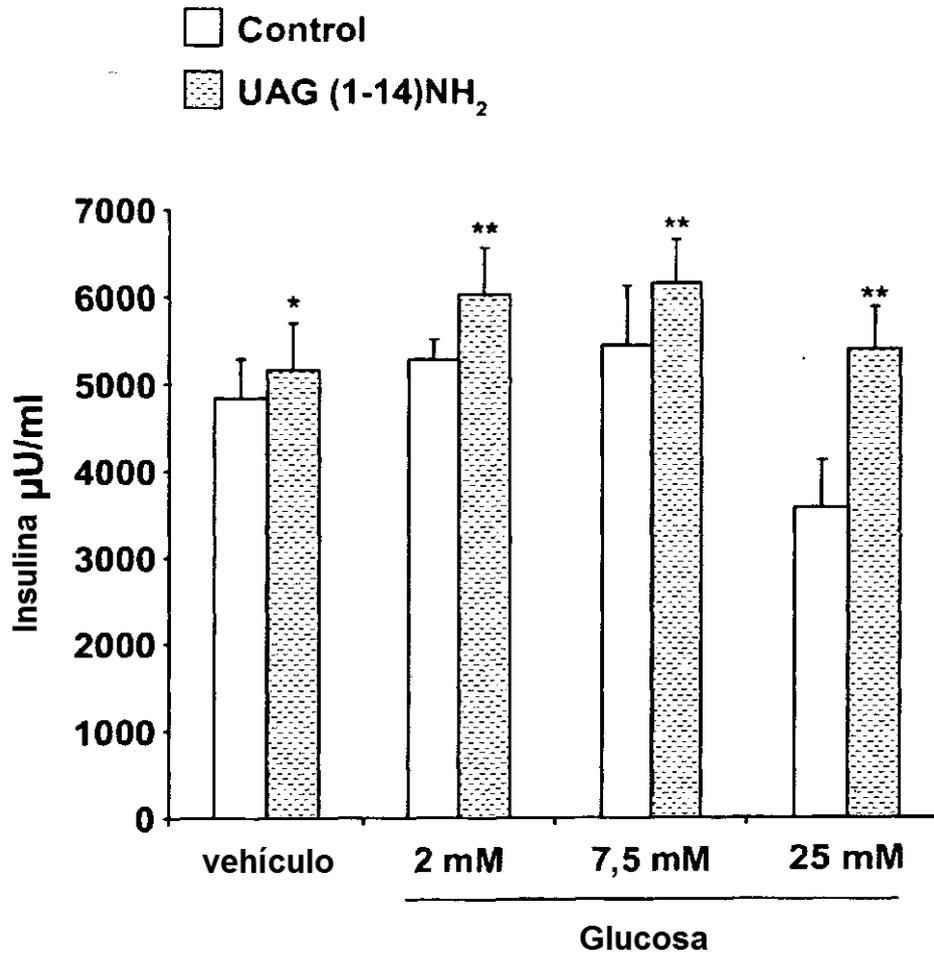
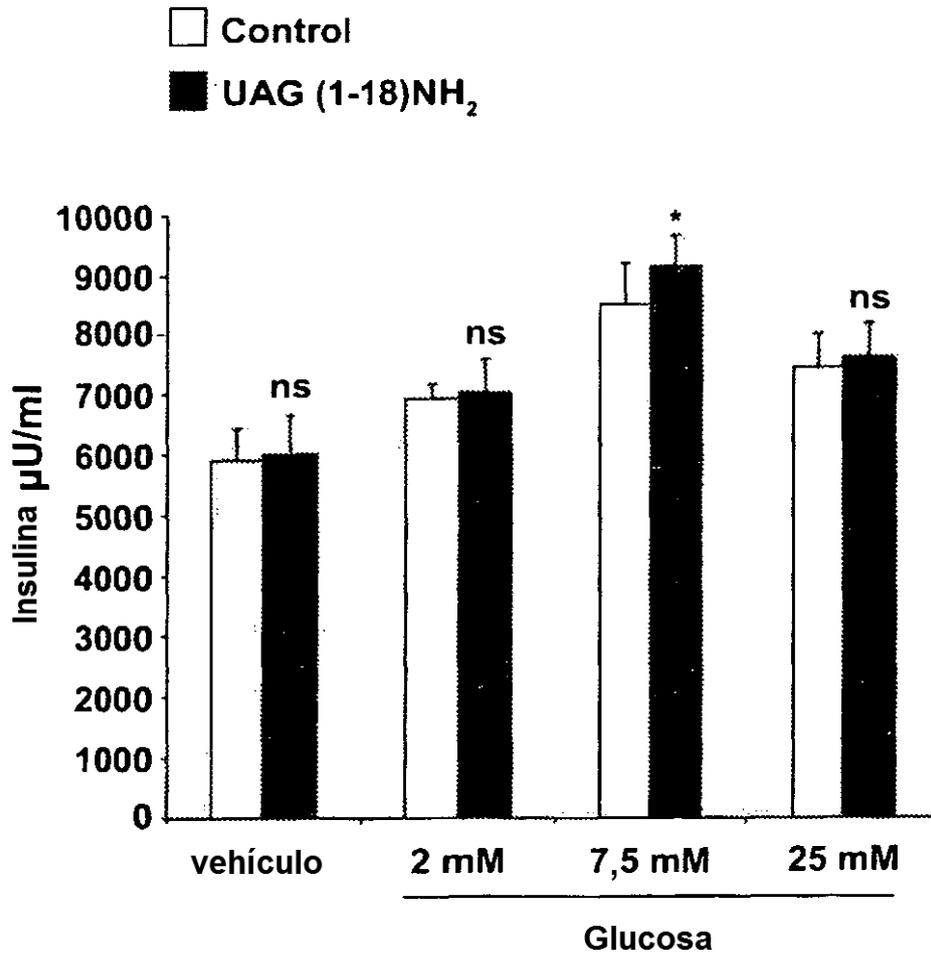


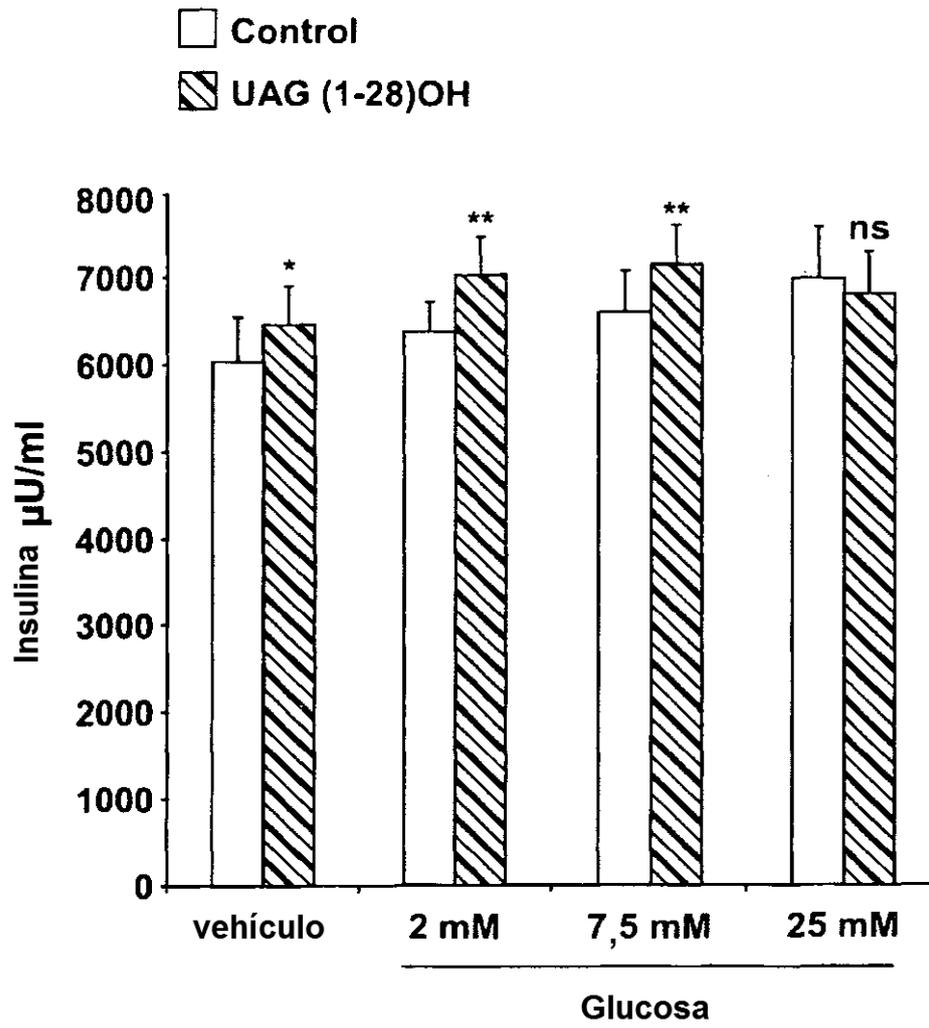
FIG. 7B



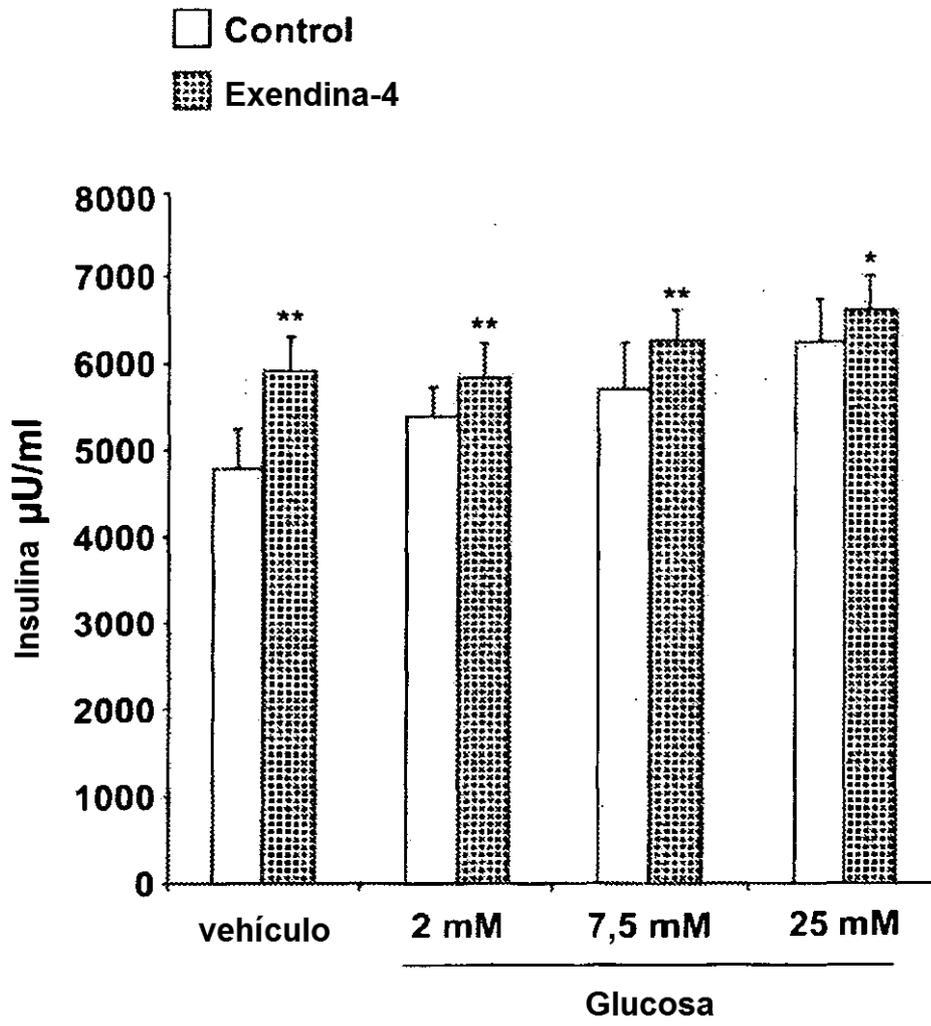
**FIG. 8A**



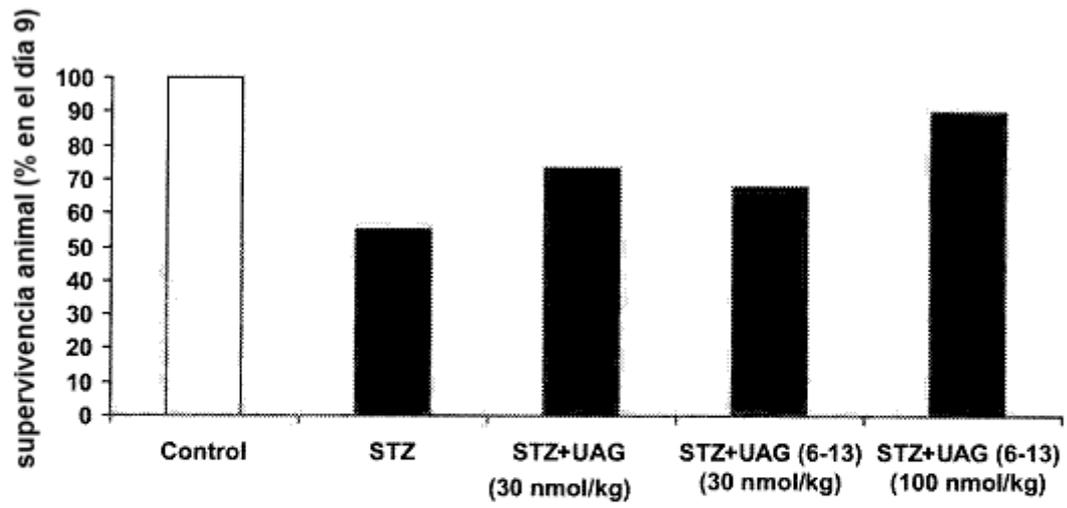
**FIG. 8B**



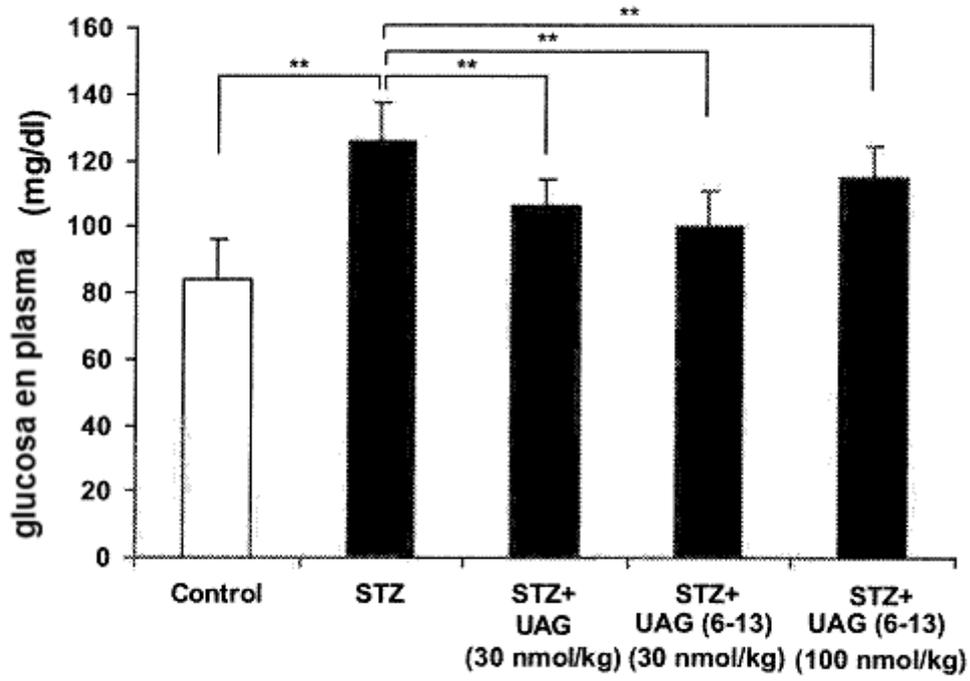
**FIG. 8C**



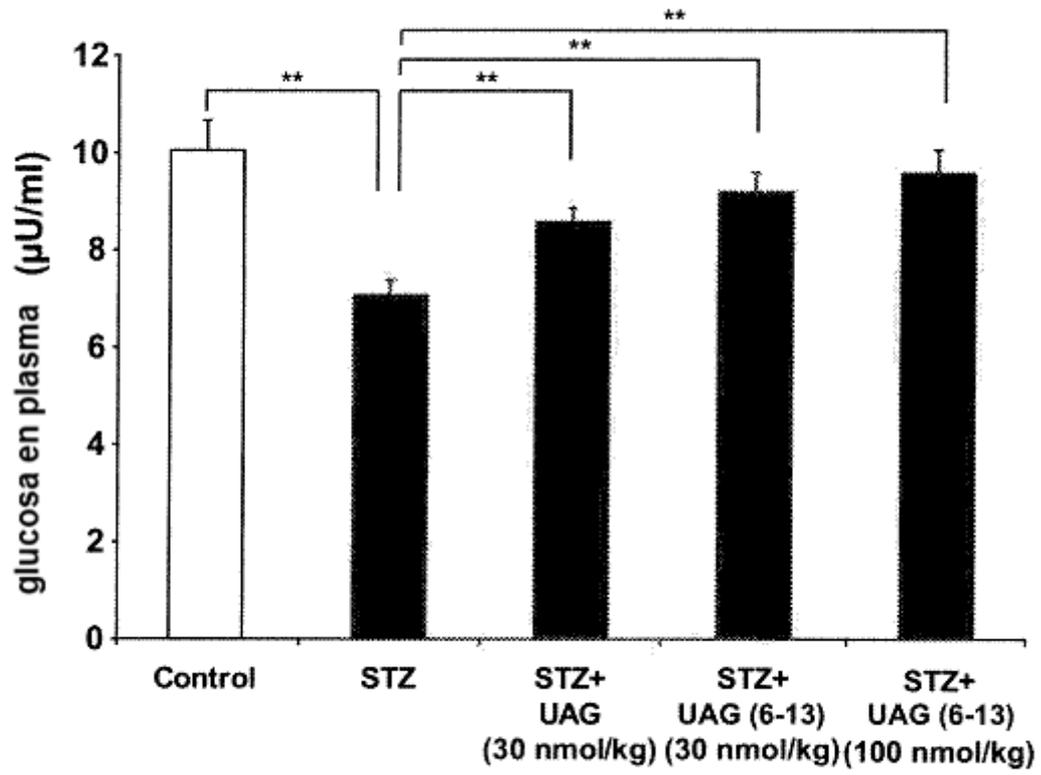
**FIG. 8D**



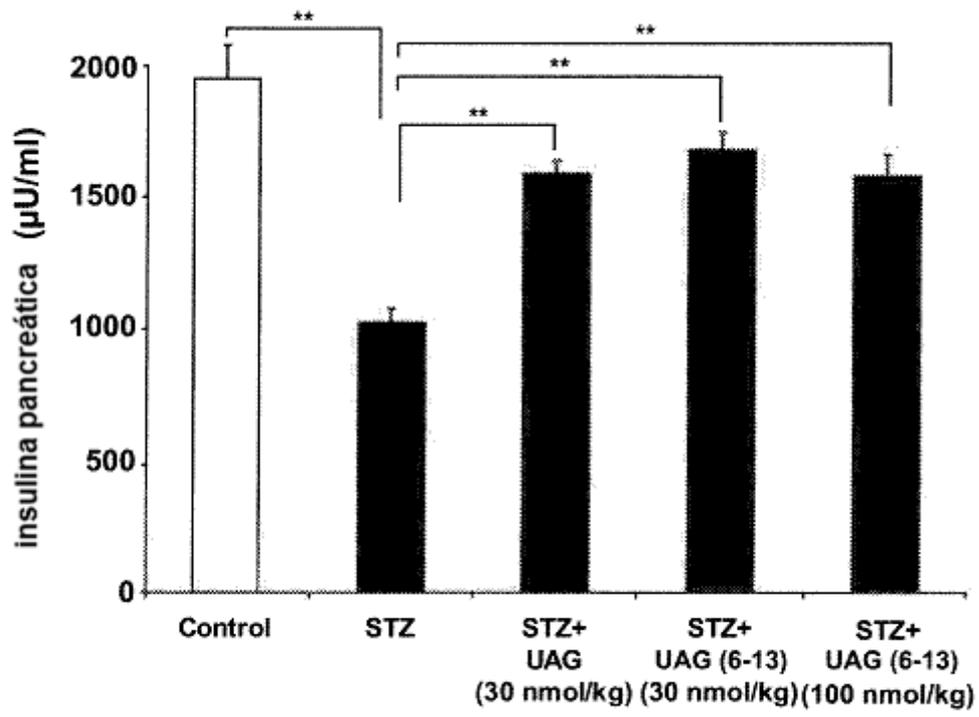
**FIG. 9A**



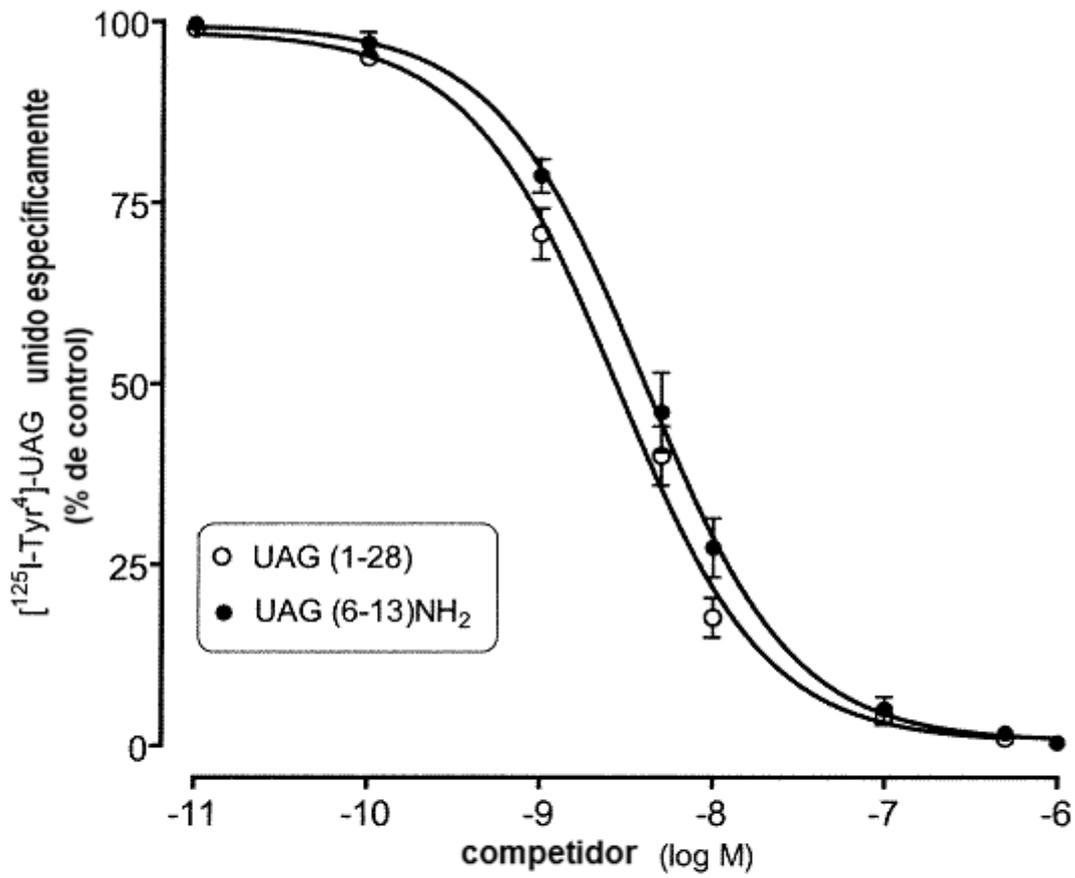
**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**

**FIG. 10A**

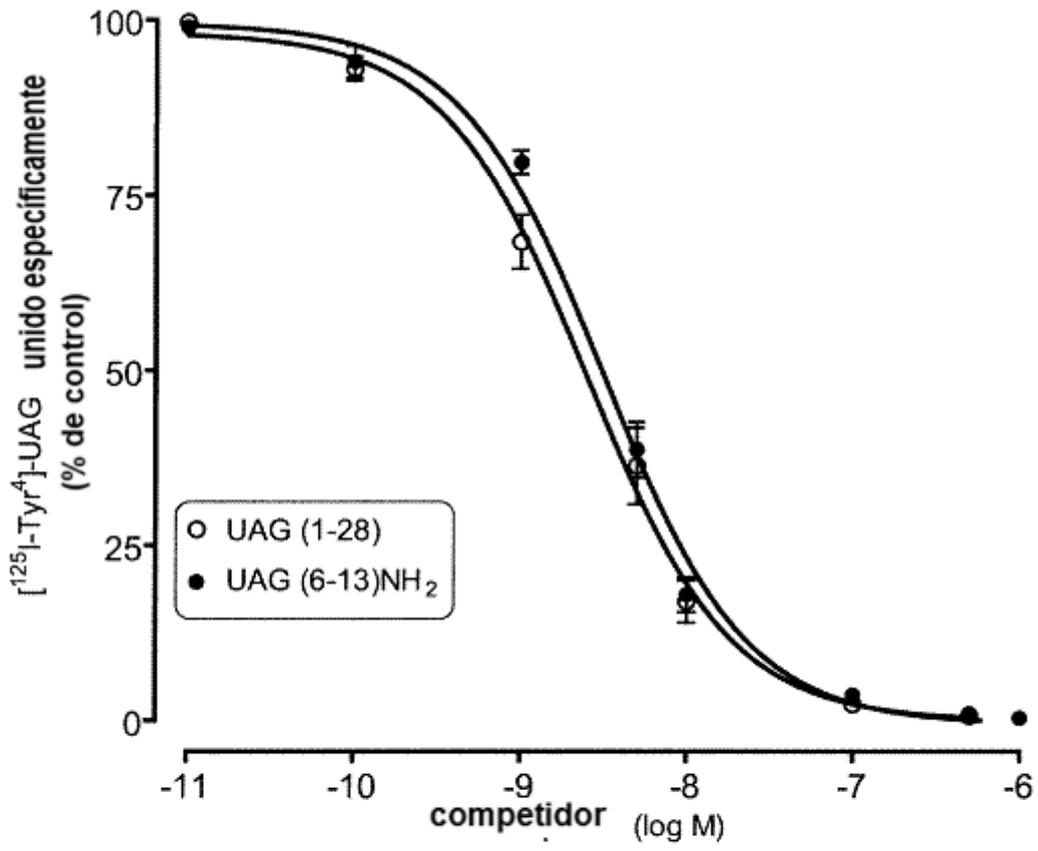


FIG. 10B

Privación de suero

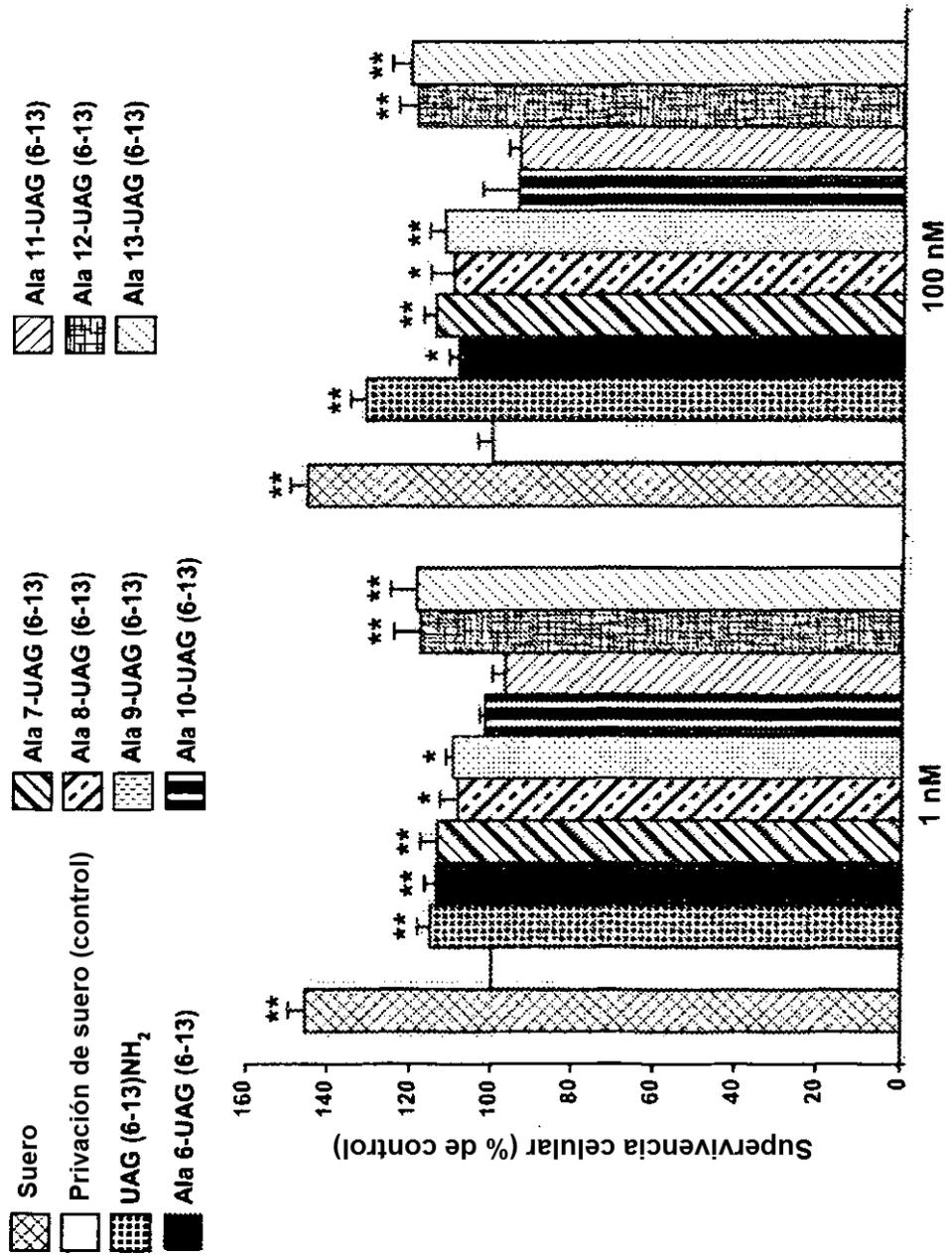


FIG. 11A

Citoquinas (TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ )

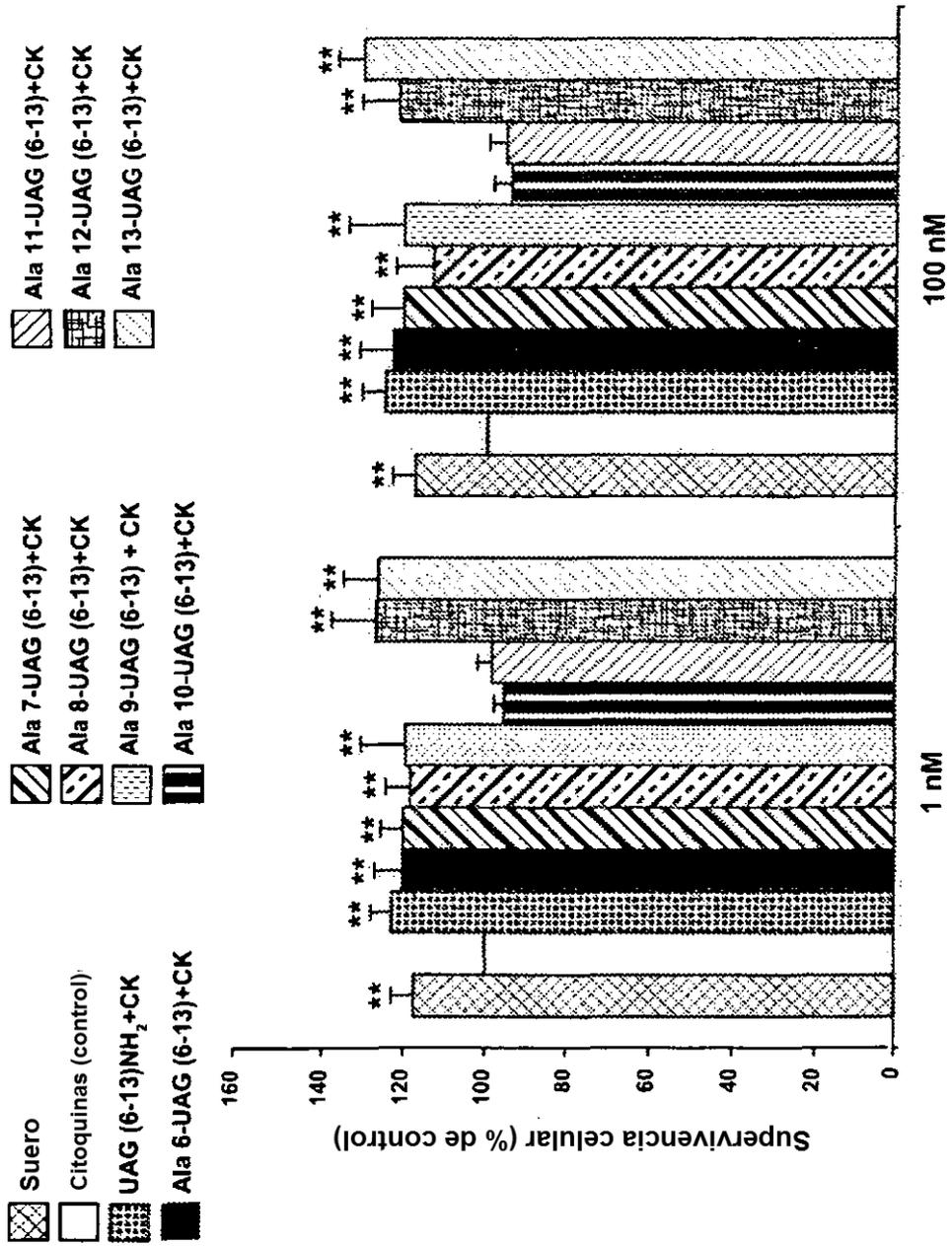


FIG. 11B

Privación de suero

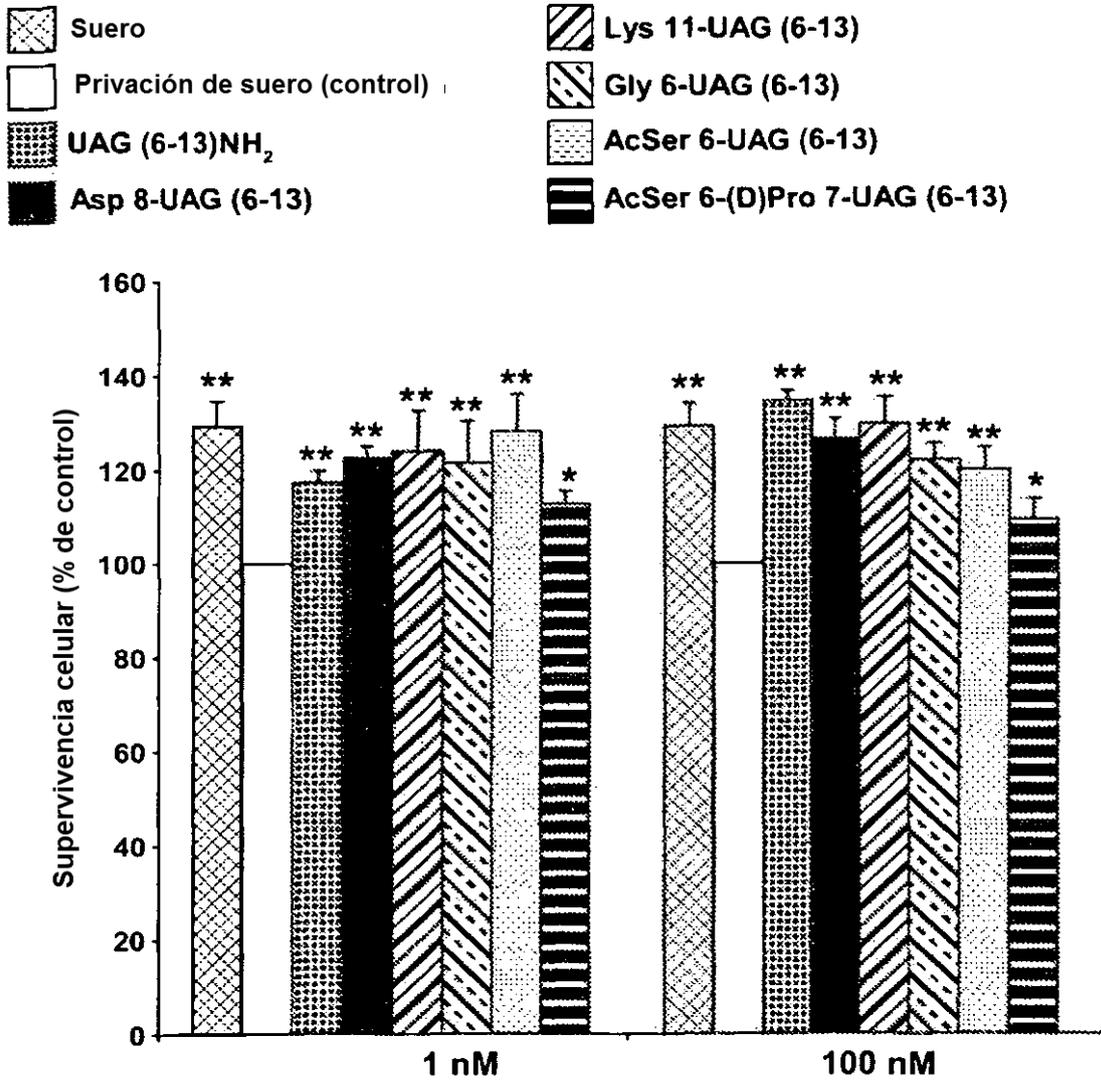


FIG. 12A

### Citoquinas (TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ )

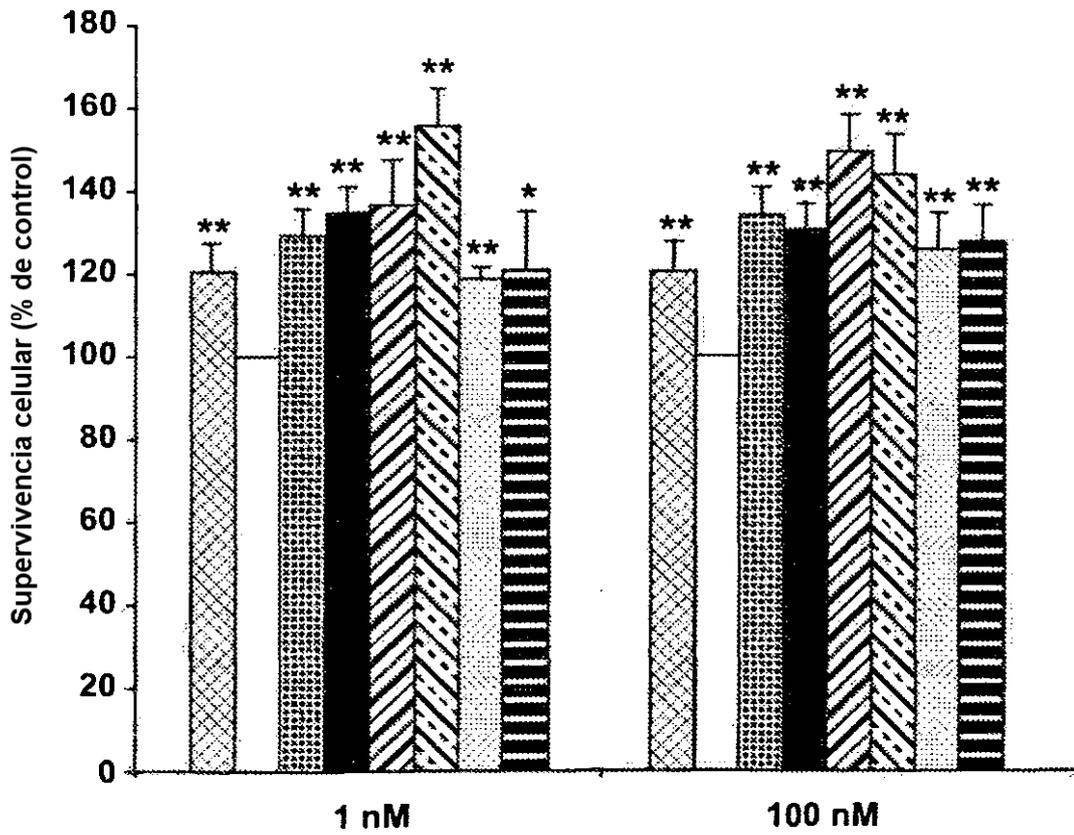
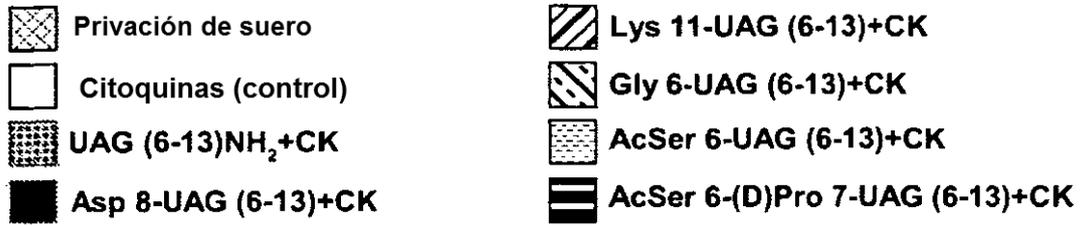


FIG. 12B

Privación de suero

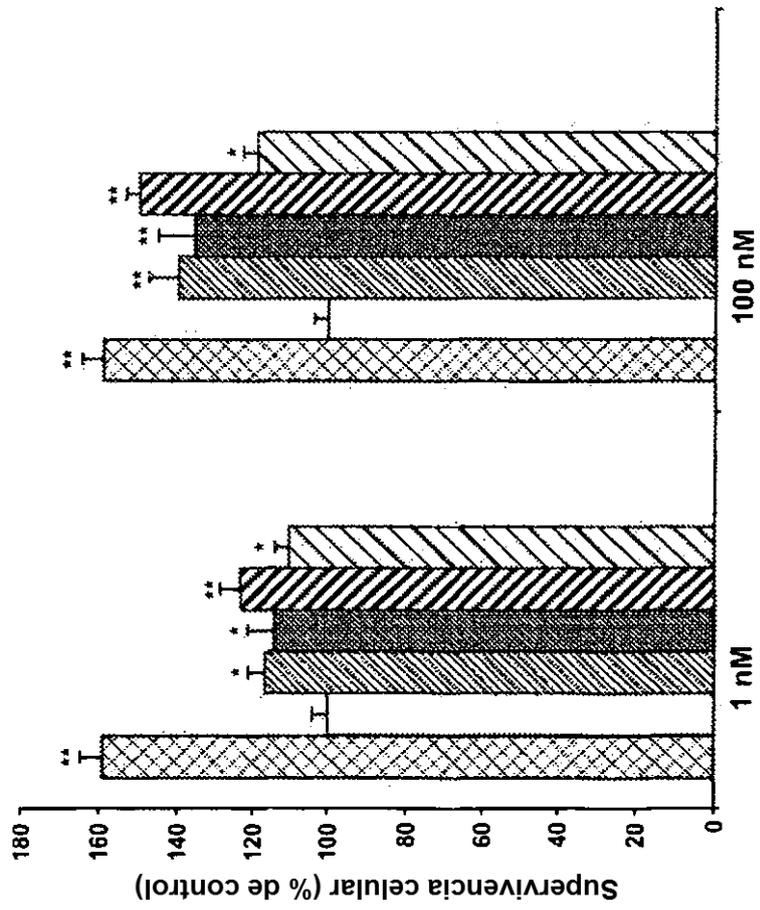
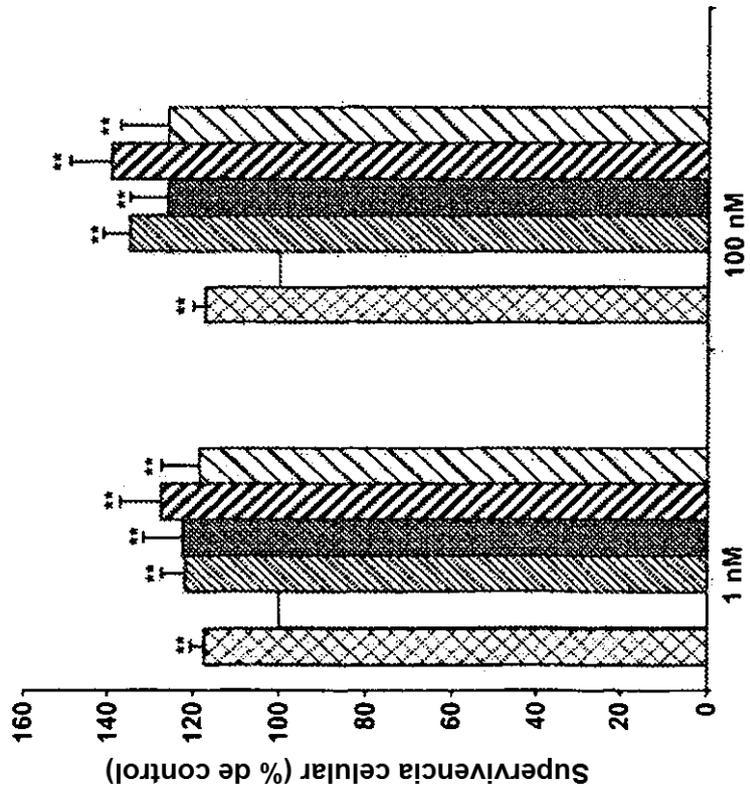


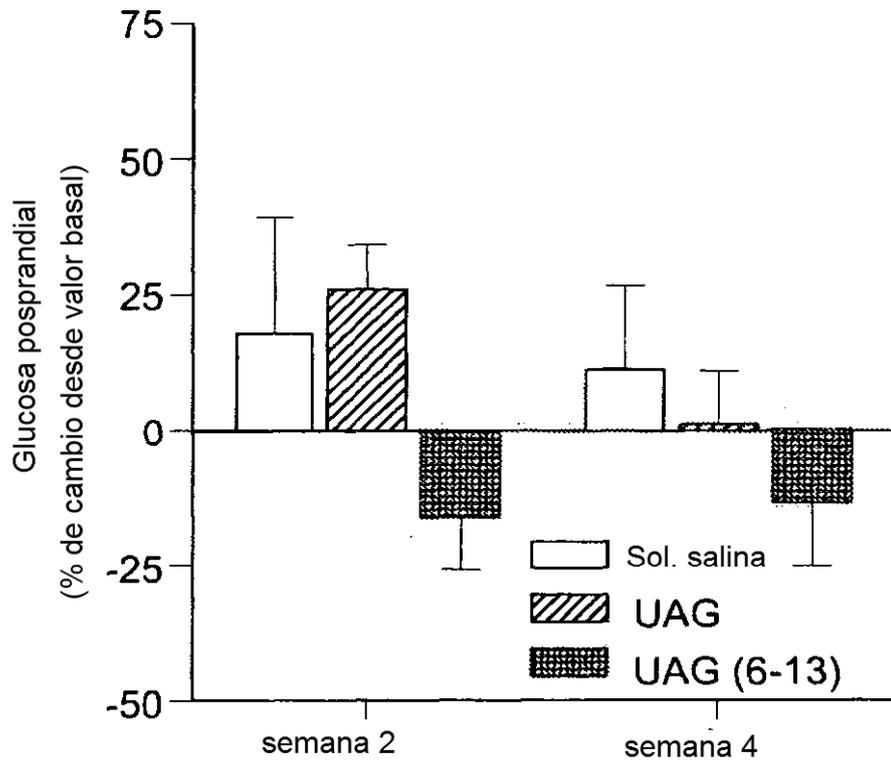
FIG. 13A

**Citoquinas (TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ )**

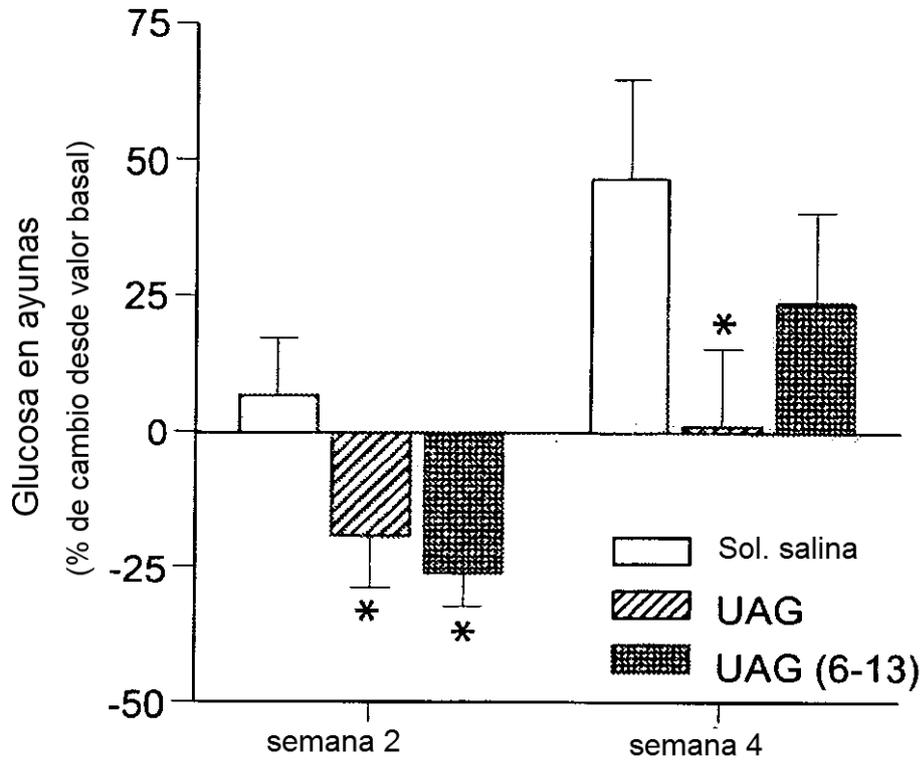
- ▨ Privación de suero
- ▨ Citoquinas (control)
- ▨ UAG (6-13)NH<sub>2</sub>+CK
- ▨ Ciclo (6,13) UAG+CK
- ▨ Ciclo (8,11), Acetyl-Ser6, Lys11, UAG (6-13)amida+CK
- ▨ Acetil-Ser6, Lys11, UAG (6-13)NH<sub>2</sub>+CK



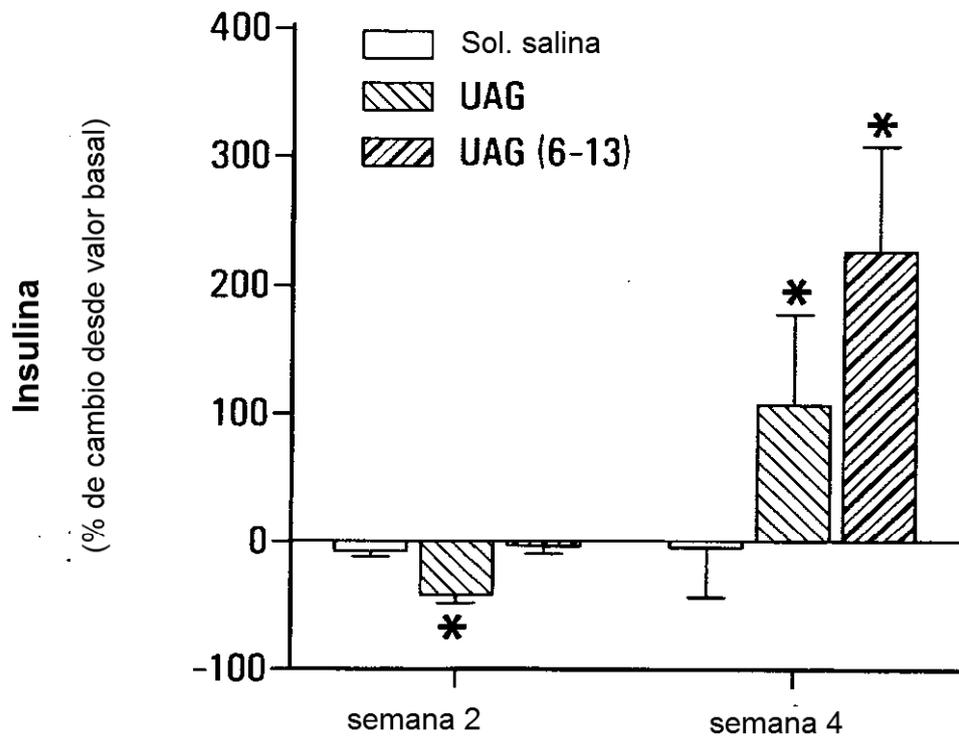
**FIG. 13B**



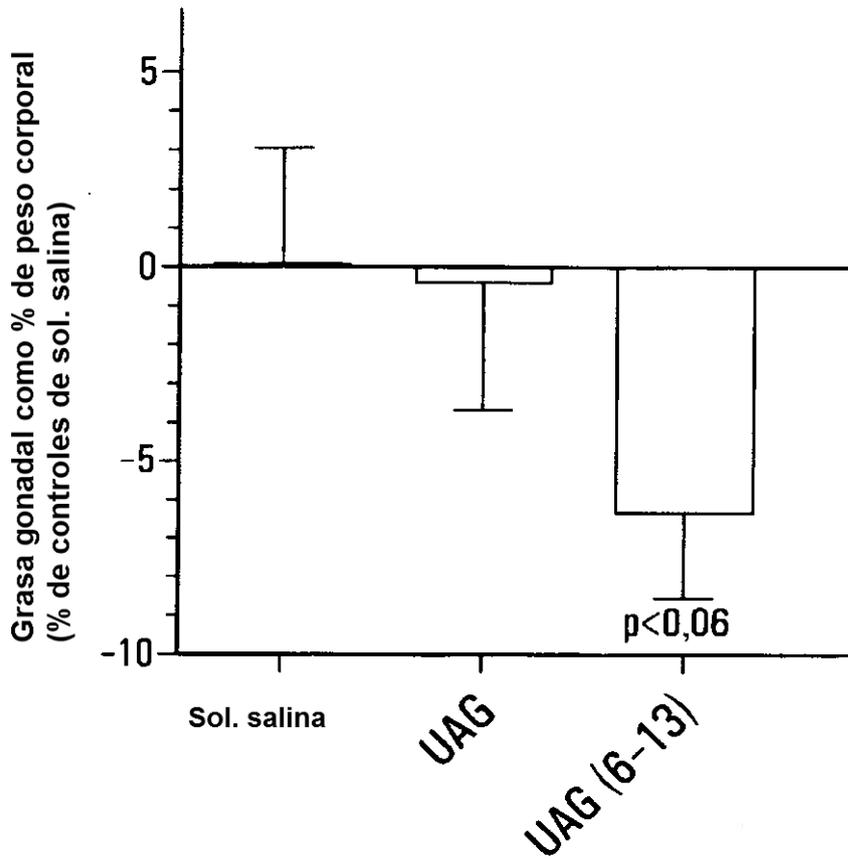
**FIG. 14A**



**FIG. 14B**



**FIG. 15**



**FIG. 16**