

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 746**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10808688 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2464371**

54 Título: **Métodos para prevenir o tratar síndrome metabólico**

30 Prioridad:

12.08.2009 US 233275 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2016

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise And
Commercialization (CCTEC), 395 Pine Tree Road,
Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

SZETO, HAZEL H.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 576 746 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

Métodos para prevenir o tratar síndrome metabólico

Campo técnico

- 5 La presente tecnología se refiere en general a los métodos de prevención o tratamiento de síndrome metabólico. En particular, la presente tecnología se refiere a la administración de péptidos aromáticos catiónicos en cantidades eficaces para prevenir o tratar el síndrome metabólico o afecciones asociadas en sujetos mamíferos.

Antecedentes

Se proporciona la siguiente descripción para ayudar a la comprensión del lector. Ninguna de la información proporcionada o referencias citadas se admite como técnica anterior a la presente invención.

- 10 El síndrome metabólico es un conjunto de trastornos de la salud o riesgos que aumentan la probabilidad de desarrollar enfermedades del corazón, accidente cerebrovascular y diabetes. La condición también se conoce por otros nombres, incluyendo el síndrome X y síndrome dismetabólico. El síndrome metabólico puede incluir cualquiera de una variedad de fenotipos metabólicos subyacentes, incluyendo resistencia a la insulina y/o fenotipos de predisposición a la obesidad.
- 15 El síndrome metabólico se caracteriza a menudo por cualquiera de un número de trastornos metabólicos o factores de riesgo, que generalmente se consideran más caracterizado síndrome metabólico cuando más de uno de estos factores están presentes en un solo individuo. Los factores incluyen: obesidad central (tejido graso desproporcionado en y alrededor del abdomen), dislipidemia aterogénica (éstos incluyen una familia de trastornos de lípidos en la sangre, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos altos, colesterol HDL bajo, y el colesterol LDL alto que puede favorecer la acumulación de placa en el sistema vascular, incluyendo paredes de las arterias), presión arterial alta, resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa (la imposibilidad de utilizar correctamente la insulina o azúcar en la sangre), un estado protrombótico crónica (por ejemplo, que se caracteriza por un niveles altos del inhibidor activador del plasminógeno en la sangre), y un estado proinflamatorio crónico (por ejemplo, caracterizada por niveles más altos que los niveles normales de proteína de alta sensibilidad C-reactiva en la sangre). Las personas con
- 20 síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, otras enfermedades relacionadas con la acumulación de placa en las paredes arteriales (por ejemplo, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica) y diabetes tipo 2.
- 25

- 30 Las causas subyacentes del síndrome metabólico no están claras, aunque ciertos efectos de la enfermedad, tales como la obesidad y la falta de actividad física son a menudo de naturaleza causal. Teniendo en cuenta los patrones de herencia para el trastorno, también parece que existen factores genéticos que subyacen a este síndrome.

Resumen

- 35 La presente tecnología se refiere en general al tratamiento o prevención del síndrome metabólico y de las afecciones asociadas en mamíferos mediante la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de los péptidos catiónicos aromáticos a sujetos en necesidad de los mismos. En realizaciones particulares, los péptidos aromáticos catiónicos tratan o previenen el síndrome metabólico mediante la reducción de la gravedad o la ocurrencia de la dislipidemia, la obesidad central, trastornos de lípidos en la sangre, o resistencia a la insulina.

En un aspecto, la divulgación proporciona Péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ para su uso en el tratamiento o la prevención del síndrome metabólico en un sujeto mamífero.

- 40 En algunas realizaciones, el síndrome metabólico se asocia con la resistencia a la absorción de la glucosa mediada por insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de colesterol LDL, aumento de VLDL, aumento de los triglicéridos, disminución de colesterol HDL, aumento de los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno-1 e hipertensión. En una realización ilustrativa, el síndrome metabólico se caracteriza por tres o más de los siguientes criterios:

- (a) obesidad abdominal: circunferencia de cintura > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres;
- 45 (b) hipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/l);
- (c) colesterol HDL bajo: <40 mg/dl (1.036 mmol/l) en hombres y <50 mg/dl (1.295 mmol/l) en mujeres;
- (d) presión arterial alta: $\geq 130/85$ mm Hg; y

(e) glucosa alta en ayunas: ≥ 110 mg/dl (> 6.1 mmol/l).

En una realización ilustrativa, el síndrome metabólico se caracteriza por diabetes, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucosa en ayunas, o resistencia a la insulina además de dos o más de las siguientes anomalías:

(a) presión arterial alta: $\geq 160/90$ mm Hg;

5 (b) hiperlipidemia: concentración de triglicéridos ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/l) y/o colesterol HDL <35 mg/dl (0.9 mmol/l) en hombres y <39 mg/dl (1.0 mmol/l) en mujeres;

(c) obesidad central: relación cintura-cadera de >0.90 en hombres o >0.85 en mujeres o BMI >30 kg/m²; y

(d) microalbuminuria: velocidad de excreción urinaria de albúmina ≥ 20 µg/min o una relación albúmina con creatinina ≥ 20 mg/g.

10 En una realización ilustrativa, el síndrome metabólico se caracteriza por tres o más de los siguientes criterios:

(a) triglicéridos > 150 mg/dl;

(b) presión arterial sistólica (BP) ≥ 130 mm Hg o presión arterial diastólica ≥ 85 mm Hg o en tratamiento antihipertensivo;

(c) colesterol de lipoproteínas de alta densidad < 40 mg/dl;

15 (d) azúcar en sangre en ayunas (FBS) > 110 mg/dl; y

(e) índice de masa corporal. > 28.8 kg/m².

20 En una realización, el síndrome metabólico se trata a través de la mejora del metabolismo de lípidos en comparación con el metabolismo de los lípidos del sujeto antes de que se administre el péptido. En una realización, la mejora en el metabolismo de los lípidos es la reducción del nivel de triglicéridos en la sangre en comparación con el nivel de triglicéridos en la sangre del sujeto antes de que se administre el péptido. En una realización, la mejora en el metabolismo de los lípidos es la mejora de la relación de colesterol HDL/LDL en sangre en comparación con el colesterol en sangre HDL/LDL del sujeto antes de que se administre el péptido. En una realización, el síndrome metabólico es tratado mediante la reducción de nivel de azúcar en sangre en comparación con el nivel de azúcar en la sangre del sujeto antes de que se administre el péptido. En una realización, el síndrome metabólico es tratado por una reducción en el peso corporal en comparación con el peso corporal del sujeto antes de que se administre el péptido.

25 En algunas realizaciones, los péptidos aromáticos catiónicos se usan para tratar o prevenir las afecciones asociadas con el síndrome metabólico en sujetos mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, obesidad central, dislipidemia, hiperinsulinemia, diabetes tipo II, función endotelial vascular anormal, retinopatía, enfermedad arterial coronaria, enfermedad cardiovascular, disfunción renal, hipertensión, hígado graso, neuropatía, e hiperuricemia. Los ejemplos específicos de enfermedades cardiovasculares potencialmente causados por síndrome metabólico y afecciones asociadas incluyen infarto de miocardio, accidente cerebrovascular hemorrágico o isquémico (infarto cerebral).

30 Los péptidos aromáticos catiónicos se pueden administrar en una variedad de maneras. En algunas realizaciones, los péptidos se pueden administrar por vía oral, tópica, intranasal, intravenosa, subcutánea, o transdérmica (por ejemplo, por iontoforesis).

35 Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre el peso corporal. Los valores son la media \pm S.E.M. # P <0.001 frente a comida para ratas normales (NRC) + vehículo. * P <0.05 , ** p <0.01 frente a HFD/STZ + vehículo. Cuadrados, ratas NRC tratadas con vehículo, n = 5; triángulos, ratas HFD/STZ tratadas con vehículo, n = 7; círculos sólidos, ratas HFD/STZ tratadas con SS-31 a 10 mg/kg, n = 7; círculos abiertos, ratas HFD/STZ tratadas con SS-20 a 10 mg/kg, n = 7.

45 La figura 2 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre la glucosa en sangre a las 4 semanas de tratamiento. Los valores son la media \pm S.E.M. # P <0.001 frente a HFD/STZ + vehículo. * P = 0.031, P ** 0.006 frente a HFD/STZ + vehículo. Cuadrados, ratas NRC tratadas con vehículo, n = 5; triángulos, las ratas HFD/STZ tratadas con vehículo, n = 7; círculos sólidos, ratas HFD/STZ tratadas con SS-31 a 10 mg/kg, n = 7; círculos abiertos, ratas HFD/STZ tratadas con SS-20 a 10 mg/kg, n = 7.

La figura 3 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos en glicéridos totales en ratas HFD/STZ más de 10 semanas de tratamiento.

La figura 4A es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre los triglicéridos en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento. La figura 4B es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre el colesterol total en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento. La figura 4C es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre el colesterol HDL en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta, después de 14 semanas de tratamiento.

La figura 5A es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre la grasa abdominal en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento. La figura 5B es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos en la grasa subcutánea en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento.

La figura 6 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos en glicéridos en un modelo de rata STZ del síndrome metabólico.

Descripción detallada

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

En la práctica de la presente invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, Ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, Eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, Eds. (1984); *Animal Cell Culture*, Freshney, Ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); y *Meth. Enzymol.*, Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente.

Las definiciones de ciertos términos que se utilizan en esta especificación se proporcionan a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención generalmente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto habitual en el arte a la que pertenece esta invención.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

Como se usa en este documento, "aproximadamente" será entendido por personas con conocimientos ordinarios en la técnica y variará en cierta medida dependiendo del contexto en donde se utiliza. Si hay usos del término que no están claros para las personas de experiencia habitual en la técnica, dado el contexto en donde se utiliza, "aproximadamente" significará hasta más o menos el 10% del valor enumerado.

Como se utiliza en este documento, la "administración" de un agente, fármaco, o péptido a un sujeto incluye cualquier vía de introducción o entrega a un sujeto, un compuesto que funciona de forma satisfactoria. La administración puede llevarse a cabo por cualquier vía adecuada, incluyendo por vía oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea), o por vía tópica. La administración incluye auto-administración y la administración, de otro.

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

conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos pueden ser referidos en este documento por cualquiera de sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Como se utiliza en este documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que resulta en la prevención de, o una disminución en los síntomas asociados con síndrome metabólico. La cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a las drogas. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto en el arte será capaz de determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los métodos descritos en este documento, los péptidos aromáticos catiónicos se pueden administrar a un sujeto que tiene uno o más signos de síndrome metabólico. La administración de una cantidad eficaz de los péptidos aromáticos catiónicos puede mejorar al menos un signo o síntoma de síndrome metabólico en el sujeto, por ejemplo, peso corporal, ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (OGTT), sensibilidad muscular por insulina, marcadores de señalización de la insulina (por ejemplo, Akt-P, IRS-P), los niveles de triglicéridos en suero, niveles de colesterol HDL y LDL, presión arterial, de fibrinógeno o del activador del plasminógeno niveles de inhibidor de suero, los niveles de proteína C-reactiva, función mitocondrial (por ejemplo, respiración o emisión de H₂O₂), marcadores de estrés oxidativo intracelular (por ejemplo, la peroxidación lipídica, relación GSH/GSSG o actividad aconitasa) y actividad de la enzima mitocondrial. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los péptidos aromáticos catiónicos se entiende los niveles en los que los efectos fisiológicos del síndrome metabólico son, como mínimo, mejorados.

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

Como se utiliza en este documento, el término "síndrome metabólico" se refiere a una combinación de trastornos metabólicos o factores de riesgo, que cuando está presente en un solo individuo, pueden predisponer al individuo a desarrollar enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular, o diabetes.

Como se usa en este documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para significar un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, esto es, isómeros peptídicos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente se hace referencia como péptidos, glicopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente denominados proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados de gen. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidos en la técnica.

El término "sujeto" como se usa en este documento, se refiere a un miembro de cualquier especie de vertebrados. Los métodos de la materia divulgada en la actualidad son particularmente útiles para los vertebrados de sangre caliente. Aquí se incluye el tratamiento de mamíferos tales como seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a peligro de extinción, de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) a los seres humanos. En realizaciones particulares, el sujeto es un humano.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" o "que trata" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la condición o trastorno patológico objetivo. Un sujeto es con éxito "tratado" para el síndrome metabólico si, después de recibir una cantidad terapéutica de los péptidos aromáticos catiónicos de acuerdo con los métodos descritos en este documento, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más signos y síntomas de síndrome metabólico. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir una reducción en los niveles de glucosa o de insulina en sangre en ayunas, reducción en el peso corporal, reducción en los niveles de triglicéridos en suero o niveles de colesterol HDL y LDL. También se debe apreciar que los diversos modos de tratamiento o prevención de condiciones médicas que se describen están destinados a significar "sustancial", que incluye total, pero también menos de tratamiento o prevención total, y en donde se logra algún resultado relevante biológicamente o médicamente.

Como se usa en este documento, "que previene" o "prevención" de un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o condición en la muestra tratada con respecto a una muestra de control sin tratamiento, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o condición en relación con la muestra de control sin tratar.

5 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (también llamado síndrome X) es un síndrome que puede estar asociada con varios criterios tales como la resistencia a la captación de glucosa estimulada por la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento del colesterol LDL, aumento de los triglicéridos VLDL, disminución del colesterol HDL, aumento de los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) e hipertensión. Otras anomalías metabólicas que se han considerado como parte del síndrome incluyen peso anormal o distribución del peso, inflamación, microalbuminuria, hiperuricemia, y anomalías de fibrinólisis y de coagulación.

10

Intolerancia a la glucosa se caracteriza por un estado patológico en el cual el nivel de glucosa en plasma en ayunas es menos de 140 mg por decilitro y la concentración de glucosa en plasma a los 30, 60, o 90 minutos después de un ensayo de tolerancia a la glucosa excede 200 mg por decilitro.

15 La hiperinsulinemia es una condición en la que el nivel de insulina en la sangre es más alto de lo normal. La hiperinsulinemia es causada por la sobreproducción de insulina por el cuerpo y se relaciona con resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se produce cuando el cuerpo no responde a la insulina fabricada por el páncreas y la glucosa es menos capaz de entrar en las células. Los sujetos con resistencia a la insulina pueden o no pueden llegar a desarrollar la diabetes tipo 2. Cualquiera de una variedad de pruebas de uso actual se puede utilizar para determinar la resistencia a la insulina, incluyendo: prueba oral de tolerancia a la glucosa (PTOG), glucosa en sangre en ayunas (FBG), tolerancia a la glucosa normal (NGT), alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), alteración de la glucosa en ayunas (IFG), evaluación del modelo de homeostasis (HOMA), índice de sensibilidad a la insulina de verificación cuantitativa (QUICKI) y la prueba de tolerancia a la insulina intravenosa (IVITT). Véase también, De Vegt "The 1997 American Diabetes Association criteria versus the 1985 World Health Organization criteria for the diagnosis of abnormal glucose tolerance: poor agreement in the Hoorn Study." Diab Care 1998, 21:1686-1690; Matthews "Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia 1985, 28:412-419; Katz "Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans." JCE & M, 2000, 85:2402-2410.

20

25

La hipertrigliceridemia se define por la concentración de triglicéridos elevada en sangre. La hiperlipidemia se caracteriza por la presencia de exceso de lípidos en la sangre. Todas las hiperlipidemias (tipos I, IIb, III, IV y V), excepto el tipo II se caracterizan por niveles elevados de triglicéridos. La hiperlipidemia tipo I se caracteriza por elevaciones severas en los quilomicrones y triglicéridos elevados. Debido a que los quilomicrones también contienen una pequeña cantidad de colesterol, los niveles de colesterol en suero también son bastante altos. La hiperlipidemia tipo IIb es la hiperlipidemia mixta clásica (el colesterol y los triglicéridos altos) causada por elevaciones en tanto la lipoproteína de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Tipo hiperlipidemia III también se conoce como disbetalipoproteinemia, enfermedad eliminación de restos, o enfermedad de amplia beta. Por lo general, estos pacientes tienen niveles elevados de colesterol total y de triglicéridos y se confunden fácilmente con los pacientes con hiperlipidemia tipo IIb. Los pacientes con hiperlipidemia tipo III tienen elevaciones de la lipoproteína de densidad intermedia (IDL), un remanente de VLDL. Tipo hiperlipidemia IV se caracteriza por elevaciones anormales de VLDL y triglicéridos. los niveles de colesterol en suero son normales. Tipo V hiperlipidemia es la combinación de los tipos I y IV (elevaciones de ambos quilomicrones y VLDL). Los niveles de colesterol en suero son por lo general elevado, pero los niveles de colesterol LDL son normales. Dada la rareza de la enfermedad de tipo I, cuando se observan niveles elevados de triglicéridos, la causa más probable es hiperlipidemia tipo V.

30

35

40

45

Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) son las lipoproteínas grandes ricas en triglicéridos que circulan por la sangre donando sus triglicéridos a la grasa y el tejido muscular hasta que los restos de VLDL son modificados y se convierten en LDL. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son lipoproteínas que transportan el colesterol en la sangre; compuesto de una alta proporción de proteínas y colesterol relativamente pequeño; se cree que los niveles elevados de estar asociado con un menor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria y aterosclerosis.

50

Las personas con síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y de aumento de la mortalidad tanto de enfermedad cardiovascular como de otras causas. Los estudios también han encontrado que la agrupación de factores de riesgo propuestos forma parte del síndrome metabólico puede aumentar el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. Además, los componentes del síndrome metabólico son factores de riesgo para la diabetes. El síndrome metabólico se caracteriza a menudo por tres o más de los siguientes criterios:

55

1. obesidad abdominal: circunferencia de la cintura > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres.
2. hipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/l).
3. colesterol HDL bajo: < 40 mg/dl (1.036 mmol/l) en hombres y <50 mg/dl (1.295 mmol/l) en mujeres.
4. presión arterial alta: $\geq 130/85$ mm Hg.
- 5 5. niveles altos de glucosa en ayunas: ≥ 110 mg/dl (≥ 6.1 mmol/l).
6. BMI > 28.8 k/m².

El síndrome metabólico se puede caracterizar también por la diabetes, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucosa en ayunas, o resistencia a la insulina además dos o más de las siguientes anomalías:

1. Presión arterial alta: $\geq 160/90$ mm Hg.
- 10 2. Hiperlipidemia: concentración de triglicéridos ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/l) y/o colesterol HDL <35 mg/dl (0.9 mmol/l) en hombres y <39 mg/dl (1.0 mmol/l) en mujeres.
3. Obesidad central: relación cintura-cadera > 0.90 en hombres o > 0.85 en las mujeres y/o índice de masa corporal (BMI) > 30 kg/m².
- 15 4. La microalbuminuria: la velocidad de excreción urinaria de albúmina ≥ 90 μ g/min o una relación de albúmina-creatinina ≥ 90 mg/g.

Los presentes inventores han descubierto que los péptidos aromáticos catiónicos pueden prevenir o tratar el síndrome metabólico en sujetos mamíferos. En algunos casos, el síndrome metabólico puede ser debido a una dieta alta en grasas o, más generalmente, la sobrealimentación y la falta de ejercicio. Los péptidos aromáticos catiónicos pueden reducir uno o más signos o síntomas de síndrome metabólico, incluyendo, pero no limitando a, dislipidemia, obesidad central, trastornos de lípidos en sangre, y resistencia a la insulina.

Sin pretender limitar la invención a un mecanismo de acción particular, se cree que la pérdida de la integridad mitocondrial y el vástago de sensibilidad a la insulina de un trastorno metabólico común, es decir, el estrés oxidativo. El exceso de nutrición, especialmente de las dietas altas en grasas puede aumentar especies reactivas del oxígeno mitocondrial de emisión (ROS) y el estrés oxidativo en general, lo que lleva a la disfunción mitocondrial aguda y crónica y el desarrollo del síndrome metabólico. Los péptidos aromáticos catiónicos mitigan estos efectos, mejorando así la función mitocondrial en diversos tejidos del cuerpo, mejorando de este modo uno o más de los factores de riesgo asociados con el síndrome metabólico.

La presente tecnología se refiere a la reducción de los síntomas del síndrome metabólico mediante la administración de ciertos péptidos aromático-catiónicos. Los péptidos aromáticos catiónicos son solubles en agua y altamente polar. A pesar de estas propiedades, los péptidos pueden penetrar fácilmente las membranas celulares. Los péptidos aromáticos catiónicos incluyen por lo general un mínimo de tres aminoácidos o un mínimo de cuatro aminoácidos, covalentemente unidos por enlaces peptídicos. El número máximo de aminoácidos presentes en los péptidos aromáticos catiónicos es de unos veinte aminoácidos covalentemente unidos por enlaces peptídicos. Adecuadamente, el número máximo de aminoácidos es aproximadamente doce, aproximadamente nueve, o aproximadamente seis.

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

Los péptidos contienen opcionalmente uno o más aminoácidos de origen no natural. De manera óptima, el péptido no tiene aminoácidos que son de origen natural. Los aminoácidos de origen no natural pueden ser levógiro (L-), dextrógiro (D-), o mezclas de los mismos. Los aminoácidos no naturales son aquellos aminoácidos que normalmente no son sintetizados en los procesos metabólicos normales en los organismos vivos, y no se producen de forma natural en las proteínas. Además, los aminoácidos de origen no natural adecuadamente tampoco son reconocidos por las proteasas comunes. El aminoácido de origen no natural puede estar presente en cualquier posición en el péptido. Por ejemplo, el aminoácido de origen no natural puede estar en el terminal N, el terminal C, o en cualquier posición entre el terminal N y el terminal C.

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

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

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

Los aminoácidos de origen no natural son preferiblemente resistentes, y más preferiblemente insensibles, a las proteasas comunes. Los ejemplos de aminoácidos no naturales que son resistentes o insensibles a las proteasas incluyen la forma dextrógira (D-) de cualquiera de los aminoácidos-L de origen natural, así como aminoácidos L- y/o D- no naturales antes mencionados. Los aminoácidos D no ocurren normalmente en proteínas, a pesar de que se encuentran en ciertos antibióticos peptídicos que se sintetizan por medios distintos de la maquinaria de síntesis de proteína ribosomal normal de la célula. Como se usa en este documento, los D-aminoácidos se consideran aminoácidos de origen no natural.

Con el fin de reducir al mínimo la sensibilidad de la proteasa, los péptidos deberían tener menos de cinco, menos de cuatro, menos de tres, o menos de dos L-aminoácidos contiguos reconocidos por las proteasas comunes, independientemente de si los aminoácidos son de origen natural o no. En una realización, el péptido tiene solamente D-aminoácidos, y no L-aminoácidos. Si el péptido contiene secuencias sensibles de la proteasa de aminoácidos, al menos uno de los aminoácidos puede ser un D-aminoácido de origen no natural, confiriendo de esta manera resistencia a la proteasa. Un ejemplo de una secuencia sensible a proteasas incluye dos o más aminoácidos básicos contiguos que son fácilmente escindidos por las proteasas comunes, tales como endopeptidasas y tripsina. Los ejemplos de aminoácidos básicos incluyen arginina, lisina e histidina.

Los péptidos aromáticos catiónicos deben tener un número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico, en comparación con el número total de residuos de aminoácidos en el péptido. El número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico se hará referencia a continuación como (p_m). El número total de residuos de aminoácidos en el péptido se hará referencia a continuación como (r). El número mínimo de cargas positivas netas se discuten a continuación son todos a pH fisiológico. El término "pH fisiológico" tal como se utiliza en este documento se refiere al pH normal en las células de los tejidos y órganos del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo, el pH fisiológico de un ser humano es normalmente de aproximadamente 7,4, pero el pH fisiológico normal en los mamíferos puede ser cualquier pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.8.

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

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

15 En una realización, los péptidos aromáticos catiónicos tienen una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) en donde $3p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$. En esta realización, la relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) es la siguiente:

Tabla 1. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($3p_m \leq p+1$)

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

20 En otra realización, los péptidos aromáticos catiónicos tienen una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) en donde $2p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$. En esta realización, la relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) es la siguiente:

Tabla 2. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($2p_m \leq p+1$)

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

25 En una realización, el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) son iguales. En otra realización, los péptidos tienen tres o cuatro residuos de aminoácidos y un mínimo de una carga neta positiva, preferiblemente, un mínimo de dos cargas positivas netas y más preferiblemente un mínimo de tres cargas positivas netas.

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

35 Los péptidos aromáticos catiónicos también deben tener una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas a pH fisiológico (p_t) en donde $3a$ es el número más grande que es menor que o igual a $p_t + 1$, excepto que cuando p_t es 1, a también puede ser 1. En esta realización, la relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) es el siguiente:

Tabla 3. Grupos aromáticos y cargas positivas netas ($3a \leq p_t+1$ o $a = p_t=1$)

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂

D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂

Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe

Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe

5 Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂

Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr

Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys

Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂

Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly

10 D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂

Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe

His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂

Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp

Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂

15 Un ejemplo de un péptido aromático catiónico es Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (denominado en este documento como "SS-20"). Un ejemplo de otro péptido aromático catiónico es D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31).

Variantes de sustitución apropiadas del péptido incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo a sus características físico-químicas de la siguiente manera:

(a) aminoácidos no polares: Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys (C);

20 (b) aminoácidos ácidos: Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);

(c) aminoácidos básicos: His(H) Arg(R) Lys(K);

(d) los aminoácidos hidrófobos: Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V); y

(e) aminoácidos aromáticos: Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His (H).

25 Las sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en el mismo grupo se conocen como una sustitución conservadora y pueden preservar las características físico-químicas del péptido original. Por el contrario, las sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en un grupo diferente es generalmente más probable que altere las características del péptido original.

Ejemplos de análogos que activan los receptores mu-opioides incluyen, pero no se limitan a, los péptidos aromáticos catiónicos que se muestran en la Tabla 5.

30 Tabla 5. Análogos peptídicos con actividad mu-opioides

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂

ES 2 576 746 T3

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
Tvr	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-dns	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-atn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(ácido 2-aminoheptanoico)	NH ₂
Bio-2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lvs	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tvr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab	NH ₂

ES 2 576 746 T3

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tvr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lvs	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tvr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn	NH ₂

ES 2 576 746 T3

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys NH ₂	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg	NH ₂

ES 2 576 746 T3

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lvs	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lvs	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂

ES 2 576 746 T3

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Modificación Terminal-C
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂

Dab = diaminobutírico
Dap = ácido diaminopropiónico
Dmt = dimetiltirosina
Mmt = 2' metiltirosina
Tmt = N, 2', 6'-trimetiltirosina
Hmt = 2'-hidroxi, 6'-metiltirosina
dnsDap = ácido β-dansil-L-α, β diaminopropiónico
atnDap = ácido β-antraniloil-L-α, β-diaminopropiónico
Bio = biotina

Los ejemplos de análogos que no activan los receptores mu-opioides incluyen, pero no están limitados a, los péptidos aromáticos catiónicos mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Análogos de péptidos carentes de actividad mu-opioides

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Aminoácidos posición 5	Aminoácidos posición 6	Aminoácidos posición 7	Modificación Terminal-C
D-Arg	Dmt	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt				NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH ₂
Phe	Dmt	Lys	D-Arg				NH ₂
Lys	Phe	D-Arg	Dmt				NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg				NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg				NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Ttp				NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH ₂

Aminoácidos posición 1	Aminoácidos posición 2	Aminoácidos posición 3	Aminoácidos posición 4	Aminoácidos posición 5	Aminoácidos posición 6	Aminoácidos posición 7	Modificación Terminal-C
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

Cha = ciclohexil alanina

Los aminoácidos de los péptidos mostrados en la Tabla 5 y 6 pueden tener ya sea la configuración L- o D-.

5 Los péptidos se pueden sintetizar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos apropiados para la síntesis química de la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart and Young in Solid Phase Péptido Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984), y en Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, New York (1997).

Usos profilácticos y terapéuticos de péptidos aromáticos catiónicos.

10 General. Los péptidos aromáticos catiónicos descritos en este documento son útiles para prevenir o tratar la enfermedad. Específicamente, la divulgación proporciona para ambos métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) síndrome metabólico. El síndrome metabólico se asocia generalmente con la diabetes de tipo II, enfermedad de la arteria coronaria, disfunción renal, aterosclerosis, obesidad, dislipidemia e hipertensión esencial. De acuerdo con lo anterior, los presentes métodos proporcionan la prevención y/o tratamiento de síndrome metabólico o afecciones asociadas en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un péptido aromático catiónico a un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, a un sujeto se le puede administrar un péptido aromático catiónico en un esfuerzo para mejorar uno o más de los factores que contribuyen al síndrome metabólico.

20 En un aspecto, la tecnología proporciona un método de tratamiento o prevención de los trastornos específicos asociados con el síndrome metabólico, tales como obesidad, diabetes, hipertensión e hiperlipidemia, en un mamífero mediante la administración de un péptido catiónico aromático. En ciertas realizaciones, el trastorno específico es la obesidad. En ciertas realizaciones, el trastorno específico es la dislipidemia (esto es, hiperlipidemia).

25 Determinación del efecto biológico del agente terapéutico a base de péptidos aromáticos catiónicos. En diversas realizaciones, ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo* se llevan a cabo para determinar el efecto de un agente terapéutico a base de péptidos aromáticos catiónicos específico y si su administración está indicada para el tratamiento del síndrome metabólico. En diversas realizaciones, se pueden realizar ensayos *in vitro* con células representativas del tipo (s) implicado en el trastorno del sujeto, para determinar si un agente terapéutico basado en péptido aromático catiónico dado ejerce el efecto deseado sobre el(los) tipo(s) de célula. Los compuestos para uso en terapia se pueden probar en sistemas de modelos animales apropiados incluyendo, pero no limitado a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, y similares, antes de la prueba en sujetos humanos. Del mismo modo, para las pruebas *in vivo*, cualquiera de los sistemas de modelo animal conocidos en la técnica se puede utilizar antes de la administración a sujetos humanos. Las afecciones asociadas con el síndrome metabólico se pueden detectar fácilmente mediante la cuantificación de peso corporal, ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (OGTT), niveles de colesterol y triglicéridos, presión arterial, sensibilidad muscular por insulina *in vitro*,

5 marcadores de señalización de la insulina (por ejemplo, Akt-P, IRS-P), función mitocondrial (por ejemplo, respiración o emisión de H₂O₂), marcadores de estrés oxidativo intracelular (por ejemplo, peroxidación de lípidos, relación GSH/GSSG o actividad aconitasa) o actividad de la enzima mitocondrial. Los niveles de ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (OGTT), colesterol y triglicéridos se pueden medir utilizando técnicas de laboratorio clínico estándar como se puede encontrar en Tietz Textbook of Clinical Chemistry, fourth edition. Burtis CA and Ashwood ER eds., 2005.

10 En una realización, la administración de un péptido aromático catiónico a un sujeto que presenta una o más afecciones asociadas con el síndrome metabólico se causará una mejora en una o más de estas condiciones. Por ejemplo, un sujeto puede presentar al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 50% de reducción en peso corporal en comparación con el sujeto antes de recibir el péptido aromático catiónico. En una realización, un sujeto puede presentar al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 50% de reducción en el colesterol HDL y/o al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 50% de aumento en el colesterol LDL en comparación con el sujeto antes de recibir el péptido aromático catiónico. En una realización, un sujeto puede presentar al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 50% de reducción en triglicéridos séricos. al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 50% de mejora en la tolerancia a la glucosa oral (OGTT). En algunas realizaciones, el sujeto puede mostrar una mejora observable en más de una afección asociada con síndrome metabólico.

25 Métodos profilácticos. En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con el síndrome metabólico en los tejidos del músculo esquelético, por administración al sujeto de un péptido aromático catiónico que modula una o más señales o marcadores del síndrome metabólico, por ejemplo, peso corporal, triglicéridos o colesterol en suero, ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (OGTT), in vitro sensibilidad muscular por insulina, marcadores de señalización de la insulina (por ejemplo, Akt-P, IRS-P), función mitocondrial (por ejemplo, respiración o emisión de H₂O₂), marcadores de estrés oxidativo intracelular (por ejemplo, peroxidación lipídica, relación GSH/GSSG o actividad aconitasa) o actividad de la enzima mitocondrial. El ácido graso libre/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (OGTT), niveles de colesterol y triglicéridos, etc. se puede medir utilizando técnicas de laboratorio clínico estándar como se puede encontrar en Tietz Textbook of Clinical Chemistry, fourth ed., Burtis C A y Ashwood E R eds., 2005.

35 Los sujetos con riesgo de síndrome metabólico se pueden identificar, por ejemplo, por cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico como se describe en este documento. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos de péptidos aromáticos catiónicos se administran a un sujeto susceptible a, o de otra manera en riesgo de una enfermedad o afección en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo bioquímica, histológica y/o síntomas conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que presentan durante el desarrollo de la enfermedad. La administración de un péptido catiónico aromático-profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, tal que se impide una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa su progreso. Dependiendo del tipo de aberración, por ejemplo, un péptido aromático catiónico que actúa para aumentar o mejorar la función mitocondrial se puede utilizar para tratar el sujeto. El compuesto apropiado se puede determinar basándose en ensayos de selección descritos en este documento.

45 Métodos terapéuticos. Otro aspecto de la tecnología incluye métodos para reducir los síntomas asociados con el síndrome metabólico en un sujeto con fines terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un sujeto que se sospecha de, o que ya sufre de una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Como tal, la invención proporciona métodos de tratamiento de un individuo aquejado de síndrome metabólico o una enfermedad asociada al síndrome metabólico o trastorno.

50 La presente divulgación contempla terapias de combinación de los péptidos aromáticos catiónicos con uno o más tratamientos para la presión arterial, los niveles de triglicéridos en la sangre, o colesterol alto. El tratamiento para el síndrome metabólico, obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, dislipidemia, etc., también puede incluir una variedad de otros enfoques, incluyendo pérdida de peso y ejercicio, y cambios en la dieta. Estos cambios en la dieta incluyen: mantenimiento de una dieta que limita los carbohidratos a 50 por ciento o menos de las calorías totales; el consumo de alimentos definidos como los carbohidratos complejos, tal como el pan de grano entero (en vez de blanco), arroz integral (en vez de blanco), azúcares que son sin refinar, aumento del consumo de fibra comiendo legumbres (por ejemplo, alubias), granos enteros, frutas y verduras, reducir el consumo de carnes rojas y aves de corral, consumo de grasas "saludables", tales como las de aceite de oliva, aceite de linaza y nueces, limitar

la ingesta de alcohol, etc. Además, el tratamiento de la presión arterial y los niveles de triglicéridos en la sangre pueden ser controlado por una variedad de medicamentos disponibles (por ejemplo, fármacos de modulación de colesterol), igual que pueden ser trastornos de la coagulación (por ejemplo, a través de la terapia de aspirina) y en general, estados protrombóticos o proinflamatorias. Si el síndrome metabólico conduce a la diabetes, hay, por supuesto, muchos tratamientos disponibles para esta enfermedad.

Los modos de administración y dosis efectiva

Cualquier método conocido por los de la técnica para poner en contacto una célula, órgano o tejido con un péptido se pueden emplear. Los métodos apropiados incluyen métodos in vitro, ex vivo, o in vivo. Los métodos in vivo incluyen por lo general la administración de un péptido aromático-catiónico, tal como los descritos anteriormente, a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Cuando se usa in vivo para terapia, los péptidos aromáticos catiónicos se administran al sujeto en cantidades eficaces (esto es, cantidades que han deseado efecto terapéutico). El régimen de dosis y la dosis dependerán del grado de síndrome metabólico en el sujeto, las características del péptido aromático catiónico particular utilizado, por ejemplo, su índice terapéutico, el sujeto, y la historia del sujeto.

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

Los péptidos aromáticos catiónicos descritos en este documento se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para la administración, por separado o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno descrito en este documento. Tales composiciones incluyen por lo general el agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en este documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

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

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos apropiados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina estandarizada con fosfato (PBS). En todos los casos, una composición para administración parenteral debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

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

incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

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

10 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para su uso como un enjuague bucal. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, 15 píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

20 Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,468,798.

25 La administración sistémica de un compuesto terapéutico como se describe en este documento también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para administración por vía transmucosa o transdérmica, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear, en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de sprays nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. En una realización, la administración transdérmica se puede realizar por iontoforesis.

30 Una proteína o péptido terapéutico se pueden formular en un sistema portador. El vehículo puede ser un sistema coloidal. El sistema coloidal puede ser un liposoma, un vehículo de doble capa de fosfolípidos. En una realización, el péptido terapéutico se encapsula en un liposoma, manteniendo la integridad del péptido. Como un experto en el arte apreciará, existe una variedad de métodos para preparar liposomas. (Véase Lichtenberg et al., *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988); Anselem et al., *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). Formulaciones de liposomas pueden retrasar el aclaramiento y aumentar la captación celular (Véase Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8):915-923 (2000)).

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

40 45 50 55 En algunas realizaciones, los compuestos terapéuticos se preparan con portadores que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Tales formulaciones se pueden preparar utilizando técnicas conocidas. Los materiales también se

5 pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células específicas con anticuerpos monoclonales para antígenos específicos de células) se pueden utilizar también como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en el arte, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,522,811.

10 Los compuestos terapéuticos se pueden formular también para mejorar la administración intracelular. Por ejemplo, sistemas de suministro liposomal son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Chonn and Cullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems," *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708 (1995); Weiner, "Liposomes for Proteína Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes," *Immunomethods* 4 (3) 201-9 (1994); y Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems", *Trends Biotechnol.* 13 (12):527-37 (1995). Mizguchi et al., *Cancer Lett.* 100:63-69 (1996), describe el uso de liposomas fusogénicos para entregar una proteína a las células, tanto *in vivo* como *in vitro*.

15 La dosis, toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Aunque se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

20 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye el IC50 (esto es, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

25 Por lo general, una cantidad eficaz de los péptidos aromáticos catiónicos, suficiente para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico, intervalo de aproximadamente 0.000001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal por día. Preferiblemente, los intervalos de dosificación son desde aproximadamente 0.0001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal cada día, cada dos días o cada tres días o dentro del rango de 1-10 mg/kg cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. En una realización, una dosis única de péptido varía de 0.1-10.000 microgramos por kg de peso corporal. En una realización, las concentraciones de péptido aromático-catiónico en un rango de portador desde 0.2 a 2000 microgramos por mililitro suministrado. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez al día o una vez a la semana. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos a veces se requiere hasta la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el sujeto muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, el paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

35 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aromático catiónico se puede definir como una concentración de péptido en el tejido diana de 10^{-11} a 10^{-6} molar, por ejemplo, aproximadamente 10^{-7} molar. Esta concentración puede ser entregada por dosis sistémicas de 0.001 a 100 mg/kg o dosis equivalente por área de superficie corporal. El calendario de dosis se optimiza para mantener la concentración terapéutica en el tejido diana, lo más preferiblemente mediante la administración diaria o semanal individual, pero también incluyendo la administración continua (por ejemplo, infusión parenteral o aplicación transdérmica).

40 En algunas realizaciones, se proporciona la dosis del péptido aromático-catiónica a un nivel de dosis "bajo", "medio" o "alto". En una realización, la dosis baja se proporciona desde aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 0.5 mg/kg/h, adecuadamente desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 mg/kg/h. En una realización, la mitad de la dosis se proporciona desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.0 mg/kg/h, adecuadamente desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 mg/kg/h. En una realización, la dosis alta se proporciona desde aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mg/kg/h, adecuadamente desde aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 mg/kg/h.

5 El experto en el arte apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyendo, pero no limitado a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas descritas en este documento puede incluir un tratamiento único o un número de tratamientos.

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

10 **Ejemplos**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Ejemplo 1 - Tratamiento del síndrome metabólico en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas

15 Los efectos de los péptidos aromático-catiónicos en el tratamiento de un sujeto que padece síndrome metabólico se investigaron en un modelo de rata Sprague-Dawley durante un período de cuatro semanas. El ejemplo describe los resultados de tales experimentos.

Modelos in vivo. Un modelo de rata del síndrome metabólico fue establecido por combinación de 6-semanas HFD y dosis bajas de inyección de STZ (40 mg /kg) en ratas SD. Las ratas del mismo lote alimentadas con comida normal (NRC) se utilizaron como control.

20 Grupos de estudio. Grupo A: NRC + PBS s.c. q.d. (Lunes a viernes) *, n=5; Grupo B:HFD + STZ + PBS s.c. q.d. (Lunes a viernes), n=8; Grupo C:HFD + STZ + SS-31 10 mg/kg s.c. q.d. (Lunes a viernes), n=8; Grupo D: HFD + STZ + SS-20 10 mg/kg s.c. q.d. (Lunes a viernes), n=8. El esquema terapéutico se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Esquema terapéutico y protocolo experimental

Duración	Objetivo	grupos diabéticos (B, C, D)	Grupo de control (A)
1ª semana	Aclimatación	Comida normal para ratas	
2ª-7ª semana	Manipulación de la dieta	Dieta alta en grasa	Comida normal para ratas
Fin de la 7ª semana	Inyección de STZ	STZ 40 mg/kg, i.p., una vez	Solución reguladora de citrato 2 mL/kg, i.p., una vez
8ª – 12ª semana	Inducción de diabetes	Continuar con la dieta alta en grasas	Continuar con comida normal para ratas
13ª- 22ª semana	Tratamiento con péptido	Grupo B: PBS 2 mL/kg/día Grupo C: SS-31 10 mg/kg/día Grupo D: SS-20 10 mg/kg/día s.c., 5 días por semana	Grupo A: PBS 2 mL/kg/día s.c., 5 días por semana
23ª semana	Órganos y tejidos recogidos		

25 Preparación y administración de los compuestos de ensayo. SS-31 o SS-20 se disolvió en PBS 0.01 M (pH 7.0). El tratamiento de 10 semanas se administró una vez al día (5 días a la semana) con sitio de inyección s.c. alternado. La concentración de SS-31 y SS-20 fue 5.0 mg/mL. El volumen de inyección (0.2 ml/100 g) para cada animal de prueba se ajustó de acuerdo con el peso corporal tomada en el comienzo de cada semana. STZ se disolvió en solución reguladora de citrato 0.1 M (pH 4.5) a la concentración de 20 mg/mL. STZ se inyecta por vía intraperitoneal.

30 Glucosa en sangre. La glucosa en sangre fue probada por medidor de glucosa en sangre ACCU-CHEK® Advantage™ y tiras reactivas Accu-Chek® de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). Manipulación de la muestra de sangre. Las muestras de sangre se recogieron por recorte de cola. En algunos casos, cuando el recorte

de cola no proporcionó suficiente volumen, las muestras de sangre se recogieron de seno retro-orbital. Las muestras de sangre recogidas se fijaron a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la coagulación antes de ser centrifugadas a 1,200 x g durante 10 min. El sobrenadante se recoge y se volvió a centrifugar a 1,200 x g durante otros 5 minutos para generar el suero. Las muestras de suero se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta ser utilizado en el análisis.

5 Estadística: Análisis estadístico de prueba t y ANOVA de una vía se realizó mediante el software de análisis SPSS (Statistical Package for the Social Science).

10 De acuerdo con el protocolo experimental que se acaba de describir, se demostraron los efectos de los péptidos aromáticos catiónicos en las condiciones de tratamiento asociadas con el síndrome metabólico en un modelo de rata SD. Los resultados son los siguientes:

15 Efectos de SS-31 o SS-20 sobre el peso corporal de las ratas diabéticas. El peso corporal se incrementó en un 23.3% en el grupo NRC y la ganancia de peso corporal permaneció tan baja como el 3.6% en ratas de control HFD/STZ durante el período de tratamiento de 10 semanas (Fig. 1). En contraste, las ratas tratadas con SS-31 mostraron una recuperación gradual en el peso corporal (P <0.05 en la 6ª semana y P <0.01 desde la semana 7ª a la 10ª), que aumentó en un 16.3%, a finales de la semana 10ª. Las ratas tratadas con SS-20 mostraron una tendencia similar de mejora en el peso corporal (9.0% a finales de la semana 10ª).

20 Efectos de la SS-31 o SS-20 en la glucosa en sangre de ratas diabéticas. En comparación con las ratas NRC, la glucosa en sangre en ratas de vehículos HFD/STZ se mantuvo significativamente más alta durante el periodo de tratamiento. Las ratas tratadas con SS-31 y SS-20 mostraron un efecto de reducción de la expresión de glucosa en la sangre en la semana 4 después del tratamiento del péptido (P <0.05 y P <0.01, respectivamente, frente a las ratas vehículo HFD/STZ, Fig. 2).

25 En resumen, estos resultados establecen colectivamente que los péptidos aromáticos catiónicos, ya sea para prevenir o compensar la disfunción metabólica que se desarrolla con sobre nutrición. Como tal, la administración de los péptidos aromáticos catiónicos es útil en métodos de prevención o tratamiento de afecciones asociadas con el síndrome metabólico en sujetos mamíferos.

Ejemplo 2 - Efectos de la SS-20 y SS-31 en el síndrome metabólico

30 Este estudio se inició para investigar los efectos de SS-31 y SS-20 en un modelo de síndrome metabólico durante un periodo de 10 semanas. Las ratas fueron alimentadas con una dieta alta en grasas durante 6 semanas y después se administra una dosis única de STZ (30 mg/kg). Las ratas se mantuvieron en un HFD hasta 14 semanas después de la administración de STZ. Las ratas control alimentadas con comida normal para ratas (NRC) durante 6 semanas, se administraron solución reguladora citrato sin STZ. Después de 5 meses, las ratas diabéticas se trataron con SS-31 (10 mg/kg, 3 mg/kg, 1 mg/kg s.c. una vez al día), SS-20 (10 mg/kg, 3 mg/kg s.c. una vez al día) o vehículo (solución salina) 5 días a la semana durante 10 semanas. Los grupos de estudio fueron los siguientes:

- 35 Grupo A: HFD/STZ+SS-31 10 mg/kg s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=12;
- Grupo B: HFD/STZ+ SS-31 3 mg/kg s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=12;
- Grupo C: HFD/STZ+ SS-31 1 mg/kg s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=10;
- Grupo D: HFD/STZ+SS-20 10 mg/kg s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=10;
- Grupo E: HFD/STZ+SS-20 3 mg/kg s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=10;
- Grupo F: HFD/STZ+ vehículo s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=10;
- 40 Grupo G: NRC + vehículo s.c. q.d. (lunes a viernes.), n=10.

Tabla 8. Horario terapéutico

Duración	Objetivo	Grupos diabéticos A, B, C, D, E, F	Grupo de control (G)
1ª semana	Aclimatación	Comida normal para ratas	

Duración	Objetivo	Grupos diabéticos A, B, C, D, E, F	Grupo de control (G)
2 ^a -7 ^a semana	Manipulación de la dieta	Dieta alta en grasa	Comida normal para ratas
Fin de la 7 ^a semana	Inyección de STZ	STZ 30 mg/kg, i.p., una vez	Solución reguladora de citrato 2 mL/kg, i.p., una vez
8 ^a -27 ^a semana	Inducción de diabetes	Continuar con la dieta alta en grasas-semana 21 ^a se detiene	Continuar con comida normal para ratas
28 ^a -37 ^a semana	Tratamiento con péptido	Grupo A: MTP-131 10mg/kg/día Grupo B: MTP-131 3mg/kg/día Grupo C: MTP-131 1mg/kg/día Grupo D: SS-20 10mg/kg/día Grupo E: SS-20 3mg/kg/día Grupo F: PBS2mL/kg/día s.c., 5 días por semana	Grupo G: PBS 2 mL/kg/día s.c., 5 días por semana
38 ^a semana	Órganos y tejidos recogidos		

5 Alimentación HFD durante 6 semanas, produjo el aumento obvio de peso corporal (452.9 ± 3.8 g en el grupo HFD frente a 425.5 ± 7.1 g; $p < 0.01$) y la administración de STZ aumento la glucosa en sangre (26.5 ± 0.5 mmol/L en ratas HFD/STZ frente a 9.8 ± 0.5 mmol/L en ratas NRC, $P < 0.001$) e hiperlipidemia ($P < 0.01$), lo que indica un trastorno similar a síndrome metabólico en estos sujetos de prueba. Por lo tanto, el modelo experimental se estableció con éxito para el síndrome metabólico.

10 Durante el período de 10 semanas de tratamiento con péptido, no se encontraron cambios evidentes en el peso corporal y la glucosa en la sangre ni en los grupos SS-31 ni SS-20. La glucosa en sangre del grupo NRC se quedó en un rango normal, mientras que la de los grupos de tratamiento con STZ se mantuvo mayor que 20 mmol/L a lo largo del período de 10 semanas de tratamiento con péptido (Fig. 3).

15 La figura 3 muestra que el nivel de TG ratas HFD/STZ fue mucho mayor que las ratas NRC antes del tratamiento con péptidos. Después del tratamiento de 10 semanas con péptidos, el nivel de TG disminuyó en los grupos tratados con SS-20 y SS-31 en comparación con el grupo HFD/STZ. El nivel de TG de las ratas en los grupos de tratamiento SS-31 y SS-20 se redujo de 3.77 ± 0.38 mM a 1.75 ± 0.33 mM en grupo SS-31 10 mg/kg, desde 4.17 ± 0.88 mM a 2.46 ± 0.52 mM en grupo SS-31 3mg/kg, desde 4.17 ± 1.02 mM a 1.97 ± 0.46 mM en grupo SS-20 10mg/kg, desde 4.66 ± 1.40 mM a 2.43 ± 0.47 mM en grupo SS-20 3mg/kg, desde 3.90 ± 0.65 mM a 3.70 ± 1.16 mM en grupo SS-20 3 mg/kg. Pero el nivel de TG de ratas en el grupo HFD/STZ no se redujo ($3.90 \pm 0,65$ mM frente $3.70 \pm 1,16$ mM). Por lo tanto, SS-31 y SS-20 tienen efectos beneficiosos sobre el metabolismo de los lípidos.

Ejemplo 3 - Efectos de la SS-20 y SS-31 sobre la obesidad inducida por dieta

20 Para analizar los efectos farmacodinámicos de SS-31 y SS-20 contra la obesidad inducida por dieta (DIO) en ratones C57BL/6, los sujetos de prueba fueron alimentados ya sea con una dieta normal o una dieta alta en grasa que tiene la composición mostrada en Tabla 9.

Tabla 9. Composición de la dieta

Ingredientes	NRC		Dieta alta en grasa (HFD)	
	% gm	% kcal	% gm	% kcal
Proteína	19	20	26	20
Carbohidrato	67	70	26	20
Grasa (manteca de cerdo)	4	10	35	60

ES 2 576 746 T3

Después de varios días de aclimatación, los animales fueron pesados y asignados al azar a los siguientes grupos de tratamiento.

Tabla 10. Grupos de Tratamiento

Grupo	Tipo de animal	Animal #	Tratamiento	Dosis	Ruta
A	Regular	10	Vehículo	(N/A)	s.c.
B	DIO	10	Vehículo	(N/A)	s.c.
C	DIO	12	Rosiglitazona	2 mg/kg	
D	DIO	12	SS-31	3 mg/kg	s.c.
E	DIO	12	SS-31	10 mg/kg	s.c.
F	DIO	12	SS-20	3 mg/kg	s.c.
G	DIO	12	SS-20	10 mg/kg	s.c.
Grupo	Tipo de animal	Animal #	Tratamiento	Dosis	Ruta
H	DIO	12	SS-31 + Rosiglitazona	3 mg/kg + 2 mg/kg	s.c. + p.o.
I	DIO	12	SS-20 + Rosiglitazona	3 mg/kg + 2 mg/kg	s.c. + p.o.

- 5 A partir del primer día de tratamiento, los animales de los grupos B a I se cambiaron a HFD. Durante todo el período de tratamiento, las siguientes actividades se llevaron a cabo en días específicos.

Tabla 11. Horario terapéutico

Actividad		Fecha realizada
Medición del peso corporal		Cada semana desde inicio Día 1
Recogida de muestras de sangre	Medición TC	Día 0, 14, 29, 87, 103 (rápido)
	Medición TG	Día 103 (rápido)
	Medición HDL	Día 103 (rápido)
	Medición LDL	Día 103 (rápido)
	Medición ALT	Día 103 (rápido)
	Medición de insulina	(TBD)
Medición nivel de la glucosa en sangre	Rápido	Día 8, 22, 93
	Posprandial	Día 87, 99
IPGTT		Día 36, 100
IPITT		Día 43, 107

Sacrificio del Animal *	Peso de grasa	Día 23, 109
	Peso del hígado	Día 23, 109
	Medición de creatinina	Día 23
	peso de los riñones	Día 109
	Otro tejido recogido	Día 109
* El día 23, cuatro animales fueron sacrificados desde todos los grupos. Todos los animales restantes fueron sacrificados en el último día de estudio en la vida (día 109).		

5 Preparación y administración de la dosis. El tratamiento se administró una vez al día (5 días a la semana) con punto de inyección alternado. La concentración de SS-31 y SS-20 en dosis de 3 mg/kg fue de 0.6 mg/ml y la de 10 mg/kg fue de 2 mg/ml. El volumen de tratamiento (0.05 ml/10 g para s.c. y 0.2 ml/10 g para p.o.) para cada animal de prueba se ajustó de acuerdo con su peso corporal tomado en el comienzo de cada semana.

10 Recogida de muestras de sangre. Las muestras de sangre se recogieron por recorte de cola de acuerdo con Medicilon/MPI Preclinical Research (Shanghai) LLC SOP sobre Blood Collection Techniques. En algunos casos, cuando el recorte de la cola no logró garantizar un volumen suficiente, también se recogieron muestras de sangre del seno retro-orbital. Las muestras de sangre recogidas se fijaron a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la coagulación antes de ser centrifugada a 2,000 x g durante 10 min. Los sobrenadantes se recogieron y centrifugaron a 2,000 x g durante 10 min más., para generar el suero. Parte de las muestras de suero se utilizó para el análisis de colesterol total (TC) inmediatamente. El resto se almacenó a -20 °C hasta el momento de ser utilizado en el análisis de la insulina

15 La insulina, triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) en suero. Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando Kit Rat/Mouse Insulin ELISA de Millipore Corporation (Catálogo # EZRMI-13K, St. Charles, Missouri, USA). Los niveles de TG en suero se midieron por el analizador bioquímico automático. La figura 5A es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre los triglicéridos en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento. La figura 5B es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre el colesterol total en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento. La figura 5C es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre el colesterol HDL en un modelo murino de la obesidad inducida por dieta después de 14 semanas de tratamiento.

20 IPGTT. IPGTT se realizó de acuerdo con la Prueba de tolerancia a la glucosa Medicilon-MPI Preclinical Research (Shanghai) LLC SOP on Intraperitoneal (IP) con ligeras modificaciones. Los ratones se dejaron en ayuno desde la noche antes de que los niveles de glucosa de referencia evaluados en la mañana siguiente. Después de eso, se le dio una inyección IP de 1 g/kg de D-glucosa para cada animal y los niveles de glucosa en sangre fueron medidos los días 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección IP. Los resultados se muestran en la Tabla 12 más abajo, e indican que SS-20 y SS-31 mejoran significativamente la tolerancia a la glucosa en el modelo de ratón obeso.

30 Tabla 12. Tolerancia a la Glucosa

Grupo	n	Semana 5
Comida + vehículo	6	1213.6 ± 54.1
DIO = vehículo	6	1719.7 ± 56.8 ^{###}
DIO Rosi @ 2mg/kg	8	1487.5 ± 44.2*
DIO SS31 @ 3mg/kg	8	1460.6 ± 64.1 **

Grupo	n	Semana 5
DIO SS31 @ 10mg/kg	8	1584.3 ± 78.3
DIO SS20 @ 3mg/kg	8	1534.1 ± 53.3 *
DIO SS20 @ 10mg/kg	8	1494.5 ± 54.4 *
DIO SS31 + Rosiglitazona @ 3mg/kg+2mg/kg	8	1597.3 ± 54.0
DIO SS20+ Rosiglitazona @ 3mg/kg+2mg/kg	8	1673.8 ± 63.7
### <i>P</i> < 0.001 frente a Comida + vehículo		
* <i>P</i> < 0.05, ** <i>P</i> < 0.01 frente DIO + vehículo		

5 La figura 5A es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos sobre la grasa abdominal después de 14 semanas de tratamiento. La figura 5B es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento con péptidos en la grasa subcutánea después de 14 semanas de tratamiento. Los resultados muestran que el tratamiento con SS-31 o SS-20 es capaz de reducir el índice de grasa abdominal y el índice de grasa subcutánea de los sujetos de prueba.

Ejemplo 4 Efectos de SS-31 y SS-20 sobre el síndrome metabólico en Modelo de Diabetes STZ

El objetivo de este estudio fue explorar el efecto protector de SS-31 o SS-20 contra las complicaciones diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) y síndrome metabólico en ratas Sprague-Dawley macho.

10 Modelos de rata de diabetes de tipo 1 se establecieron mediante la administración de altas dosis de STZ (30 mg/kg). Las ratas del mismo lote alimentado con comida normal se utilizan como control normal. Los grupos de estudio incluyeron: Grupo A: STZ+SS-31 10 mg/kg s.c. q.d. (M.-F.), n=11; Grupo B: STZ+SS-20 10 mg/kg s.c. q.d. (M.-F.), n=11; Grupo C: STZ+ vehículo s.c. q.d. (M.-F.), n=10; Grupo D: NRC + vehículo s.c. q.d. (M.-F.), n=10. El esquema terapéutico se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Horario terapéutico

Duración	Objetivo	Grupos diabéticos (A, B, C)	Grupo de control (D)
1 ^a -3 ^a semana	Aclimatación	Comida normal para ratas	
Fin de la 3 ^a semana	Inyección de STZ	STZ 65 mg/kg, i.p., una vez	Solución reguladora de citrato 2 mL/kg, i.p., una vez
4 ^a -18 ^a semana	Inducción de diabetes	Comida normal para ratas	
19 ^a -28 ^a semana	Tratamiento con péptido	Grupo A: MTP-131 10mg/kg/día Grupo B: SS-20 10 mg/kg/día Grupo C: Solución salina 2 mL/kg/día s.c., 5 días por semana	Grupo D: Solución salina 2 mL/kg/día s.c., 5 días por semana
29 ^a semana	Órganos y tejidos recogidos		

15 Los compuestos se disolvieron en solución salina. El tratamiento se administra una vez al día (5 días a la semana) con punto de inyección que sea alterno. La concentración de SS-31 y SS-20 en dosis de 10 mg/kg es de 5 mg/ml. El volumen de tratamiento (0.2 ml/100 g para s.c.) para cada animal de prueba se ajustó de acuerdo con su peso corporal tomada en el comienzo de cada semana. STZ se disolvió en solución reguladora de citrato 0.1 M (pH 4.5) a la concentración de 20 mg/mL. STZ se inyectó por vía intraperitoneal.

20

La figura 6 muestra que el nivel de TG en grupos SS-31 y SS-20 aumentó menos que el grupo STZ/Solución salina después del tratamiento con péptidos durante 2 semanas o 4 semanas. Se indica que SS-31 y SS-20 tienen efectos en la regulación del metabolismo de los lípidos.

5 **Ejemplo 5 - Prevención y tratamiento del síndrome metabólico por péptidos aromáticos catiónicos en el modelo de rata Zucker**

Para demostrar adicionalmente la prevención del síndrome metabólico, por una parte, y el tratamiento de síndrome metabólico por el contrario, los péptidos aromáticos catiónicos de la invención se ensayan en la rata Zucker grasa (fa/fa), un modelo de síndrome metabólico inducido por la dieta. En comparación con el modelo de rata Sprague-Dawley alimentada 6 semanas con alto contenido de grasa (como se usa en el Ejemplo 1), las ratas Zucker obesas desarrollan un grado mucho mayor de obesidad y resistencia a la insulina.

En primer lugar, para examinar los efectos de los péptidos aromáticos catiónicos en la prevención del síndrome metabólico, ratas Zucker jóvenes (~ 3-4 semanas de edad) se les administra un péptido aromático catiónico (por ejemplo, SS-20 o SS-31) durante aproximadamente 6 semanas. A medida que estas ratas jóvenes que aún no presentan signos o síntomas de síndrome metabólico; que proporcionan un modelo útil para evaluar la eficacia de los métodos de la prevención del síndrome metabólico. SS-31 o SS-20 (1.0 a 5.0 mg/kg peso corporal) se administra a las ratas vía i.p. o administración oral (esto es, agua de bebida o alimentación forzada).

Se prevé que la administración SS-31 va a atenuar o prevenir los síntomas del síndrome metabólico, que normalmente se desarrolla en ratas Zucker grasas (fa/fa). Los resultados medidos incluyen peso corporal, ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (PTOG), sensibilidad muscular por insulina in vitro (incubación), marcadores de señalización de la insulina (Akt-P, IRS-P), estudios de la función mitocondrial en fibras permeabilizadas (respiración, emisión de H₂O₂), marcadores de estrés oxidativo intracelular (peroxidación lipídica, relación GSH/GSSG, actividad aconitasa) y actividad de la enzima mitocondrial. Se hace una comparación entre las ratas de control y ratas fa/fa administrados con SS-31. Los controles incluyen ratas fa/fa y de tipo salvaje no administrados SS-31. La prevención con éxito de síndrome metabólico por los péptidos aromáticos catiónicos de la invención se indica por una reducción en uno o más de los marcadores asociados con el síndrome metabólico enumerados anteriormente.

En segundo lugar, para examinar los efectos de los péptidos aromáticos catiónicos de la invención en el tratamiento del síndrome metabólico, ratas Zucker (~ 12 semanas de edad) se administran con SS-31 durante aproximadamente 6 semanas. Como estas ratas muestran signos de la obesidad y el síndrome metabólico, proporcionan un modelo útil para evaluar la eficacia de los métodos de tratamiento de la resistencia a la insulina. SS-31 (1.0 – 5.0 mg/kg de peso corporal) se administra a las ratas vía i.p. o administración oral (esto es, agua o alimentación forzada de bebida).

Se prevé que la administración SS-31 va a mejorar o reduce el síndrome metabólico, que normalmente se desarrolla en estas ratas Zucker grasas mayores (fa/fa). Los resultados medidos incluyen el peso corporal, ácidos grasos libres/insulina/glucosa en ayunas, tolerancia a la glucosa (PTOG), sensibilidad muscular por insulina in vitro (incubación), marcadores de señalización de la insulina (Akt-P, el IRS-P), estudios de la función mitocondrial en fibras permeabilizadas (respiración, emisión H₂O₂), marcadores de estrés oxidativo intracelular (peroxidación lipídica, relación GSH/GSSG, actividad aconitasa) y actividad de la enzima mitocondrial. Se hace una comparación entre las ratas de control y las ratas fa/fa administradas con SS-31. Los controles incluyen ratas de tipo salvaje y fa/fa no administradas con SS- 31. El éxito del tratamiento de síndrome metabólico por los péptidos aromáticos catiónicos de la invención se indica por una reducción en uno o más de los marcadores asociados con el síndrome metabólico enumerados anteriormente.

Equivalentes

La presente invención no debe ser limitada en términos de las realizaciones particulares descritas en esta solicitud, que pretenden ser simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención. Muchas modificaciones y variaciones de esta invención se pueden hacer sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en el arte. Los métodos funcionalmente equivalentes y aparatos dentro del alcance de la invención, además de los enumerados en este documento, serán evidentes para los expertos en el arte a partir de las descripciones anteriores. Tales modificaciones y variaciones se pretenden que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La presente invención está limitada solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que tienen derecho tales reivindicaciones. Se debe entender que esta invención no se limita a métodos particulares, reactivos, compuestos de composiciones o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. Se debe entender también que la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

Además, cuando se describen características o aspectos de la divulgación en términos de grupos Markush, los expertos en el arte reconocerán que la divulgación también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

- 5 Tal como se comprenderá por un experto en el arte, por cualquiera y todos los fines, en particular en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos revelados en este documento también abarcan cualquier y todos los subintervalos y combinaciones de subintervalos posibles de los mismos. Cualquier rango enumerado se puede reconocer fácilmente como suficientemente descrito y permitiendo al mismo rango se descomponga en al menos iguales medios, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como un ejemplo no limitante, cada rango discutido en este documento se puede descomponer fácilmente en un tercero inferior, tercero medio y tercero superior, etc.
- 10 Como también se comprenderá por un experto en el arte todo el lenguaje tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que", y similares, incluye el número recitado y se refiere a intervalos que se pueden romper posteriormente hacia abajo en subintervalos como se discutió anteriormente. Finalmente, como se entenderá por un experto en el arte, un intervalo incluye cada miembro individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene de 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, o 3 células. Del mismo modo, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen
- 15 1, 2, 3, 4, o 5 células, y así sucesivamente.

REIVINDICACIONES

1. Péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ para su uso en el tratamiento o la prevención del síndrome metabólico en un sujeto mamífero.
- 5 2. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico está asociado con resistencia a la absorción de glucosa mediada por la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de colesterol LDL, aumento de VLDL, aumento de triglicéridos, disminución de colesterol HDL, aumento de los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) o hipertensión.
3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico se caracteriza por tres o más de los siguientes criterios:
 - 10 (a) obesidad abdominal: circunferencia de cintura > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres;
 - (b) hipertrigliceridemia: > 150 mg/dl (1.695 mmol/l);
 - (c) colesterol HDL bajo: < 40 mg/dl (1.036 mmol/l) en hombres y < 50 mg/dl (1.295 mmol/l) en mujeres;
 - (d) presión arterial alta: ≥ 130/85 mm Hg; y
 - (e) glucosa alta en ayunas: ≥110 mg/dl (> 6.1 mmol/l).
- 15 4. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico se caracteriza por diabetes, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucosa en ayunas, o resistencia a la insulina además de dos o más de las siguientes anomalías:
 - (a) presión arterial alta: ≥ 160/90 mm Hg;
 - 20 (b) hiperlipidemia: concentración de triglicéridos: ≥150 mg/dl (1.695 mmol/l) y/o colesterol HDL <35 mg/dl (0.9 mmol/l) en hombres y <39 mg/dl (1.0 mmol/l) en mujer;
 - (c) obesidad central: relación cintura-cadera de > 0.90 en hombres o > 0.85 en mujeres o BMI > 30 kg/m²; y
 - (d) microalbuminuria: velocidad de excreción de albúmina urinaria ≥ 20 µg/min o una relación albúmina con creatinina: ≥ 20 mg/g.
- 25 5. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico se caracteriza por tres o más de los siguientes criterios:
 - (a) triglicéridos > 150 mg/dl;
 - (b) presión arterial sistólica (BP) ≥130 mm Hg o presión arterial diastólica ≥85 mmHg o en tratamiento antihipertensivo;
 - (c) colesterol de lipoproteínas de alta densidad < 40 mg/dl;
 - 30 (d) azúcar en sangre en ayunas (FBS) > 110 mg/dl; y
 - (e) índice de masa corporal > 28.8 kg/m².
6. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico se trata a través de la mejora del metabolismo de lípidos en comparación con el metabolismo de los lípidos del sujeto antes de que se administre el péptido.
- 35 7. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la mejora en el metabolismo de los lípidos es la reducción del nivel de triglicéridos en la sangre en comparación con el nivel de triglicéridos en la sangre del sujeto antes de que se administre el péptido.
8. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la mejora en el metabolismo de los lípidos es la mejora de la relación de colesterol HDL/LDL en sangre en comparación con el colesterol en sangre HDL/LDL del sujeto antes de que se administre el péptido.
- 40

9. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico es tratado mediante la reducción de nivel de azúcar en sangre en comparación con el nivel de azúcar en la sangre del sujeto antes de que se administre el péptido.
- 5 10. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome metabólico es tratado por una reducción en el peso corporal en comparación con el peso corporal del sujeto antes de que se administre el péptido.
11. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un humano.
12. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se administra antes de la aparición de la diabetes tipo II.
- 10 13. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para ser administrado por vía oral, por vía sistémica, por vía intravenosa, subcutánea, o intramuscular.
14. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero se controla para el tratamiento o prevención del síndrome metabólico.

FIG. 1

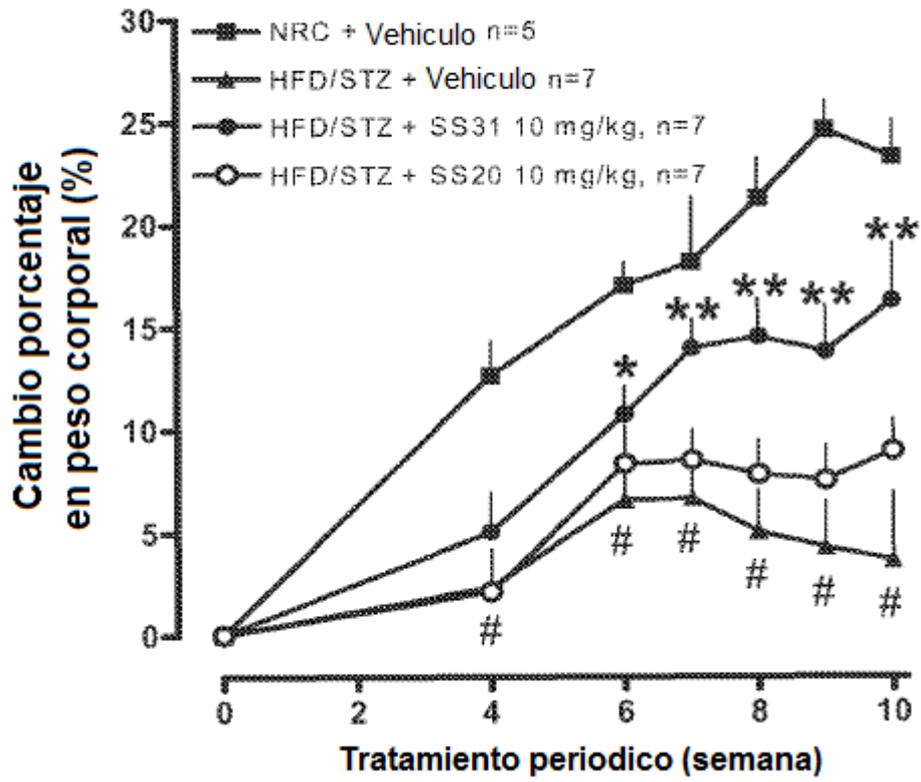


FIG. 2

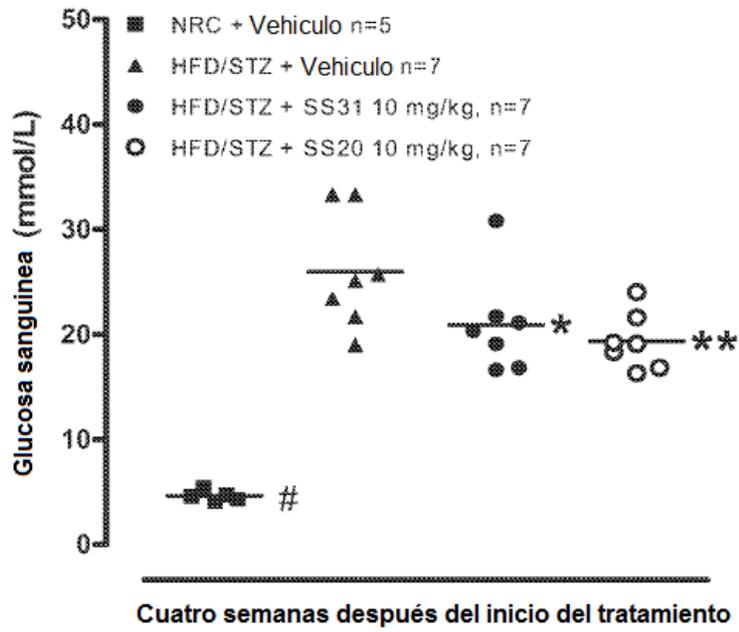


FIG. 3

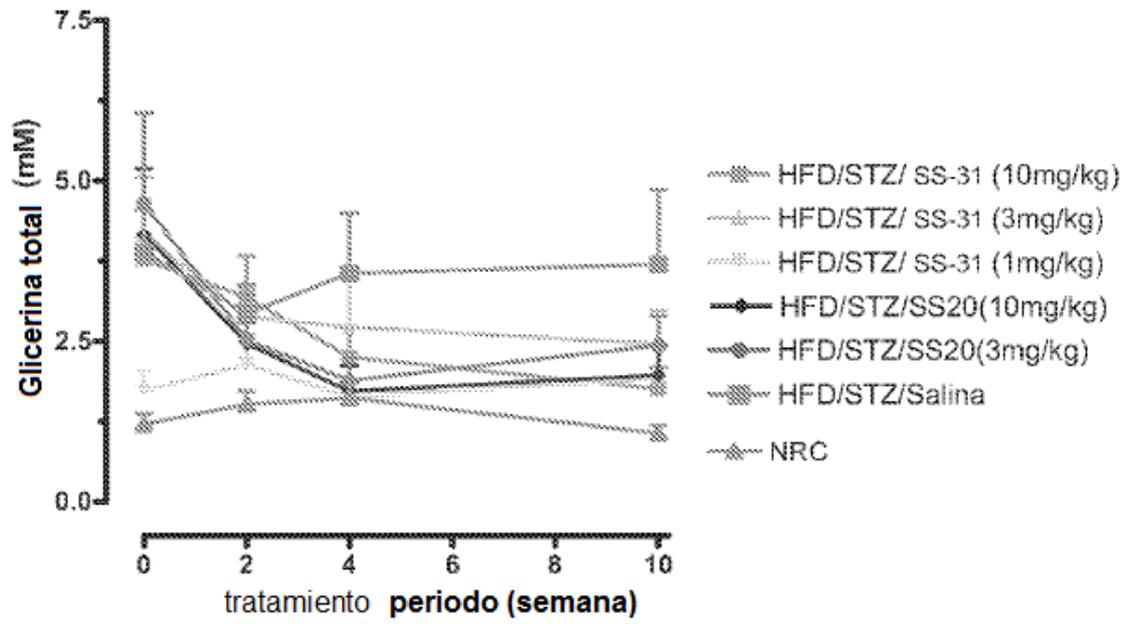
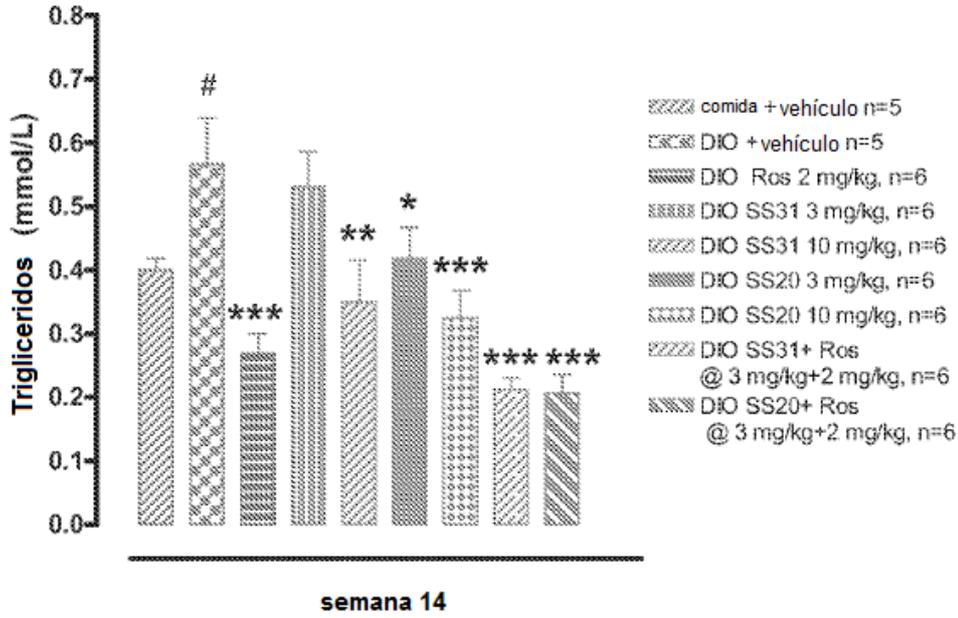


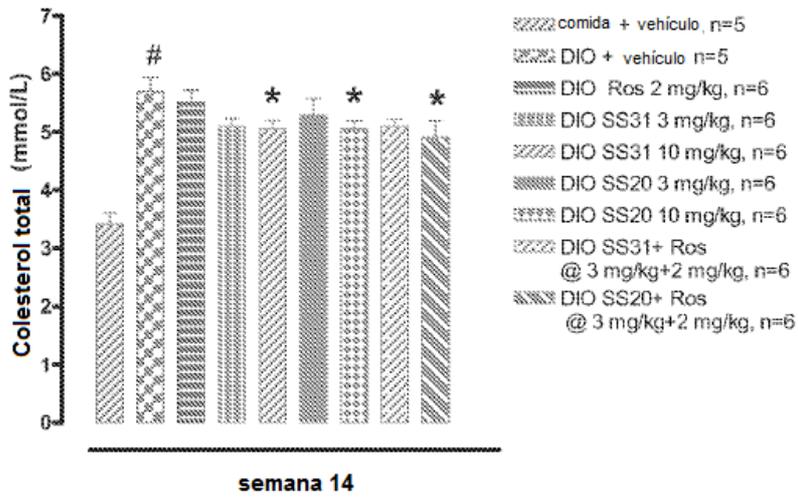
FIG. 4A



$P < 0.05$ vs. comida + vehiculo

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. DIO + vehiculo

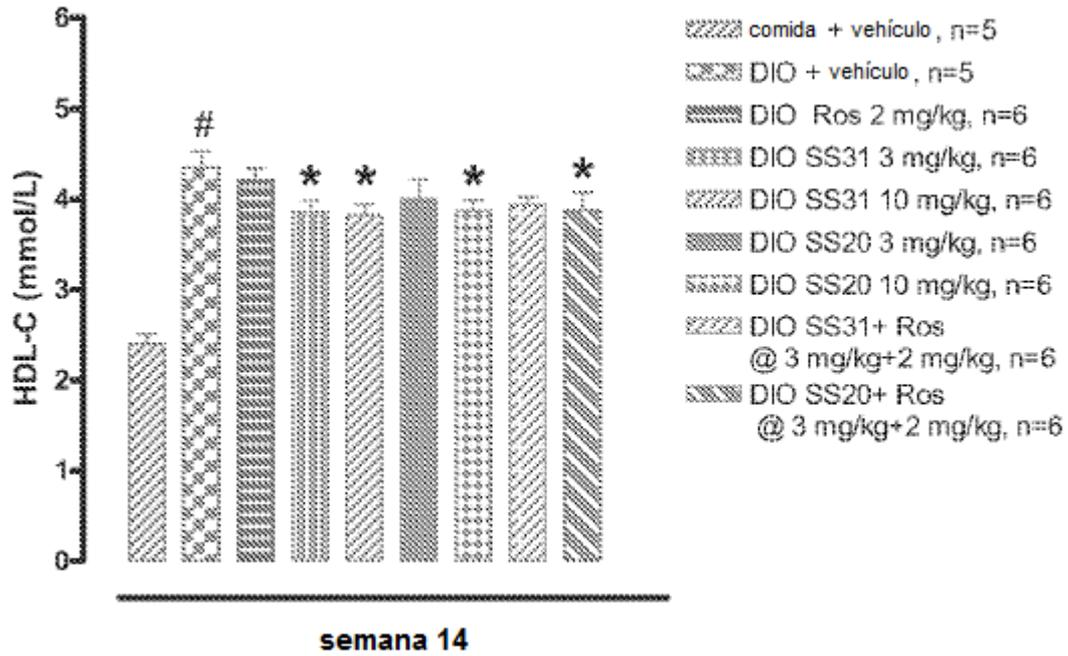
FIG. 4B



$P < 0.001$ vs. comida+ Vehiculo

* $P < 0.05$ vs. DIO + Vehiculo

FIG. 4C



$P < 0.05$ vs. comida + vehiculo

* $P < 0.05$ vs. DIO + vehiculo

FIG. 5A

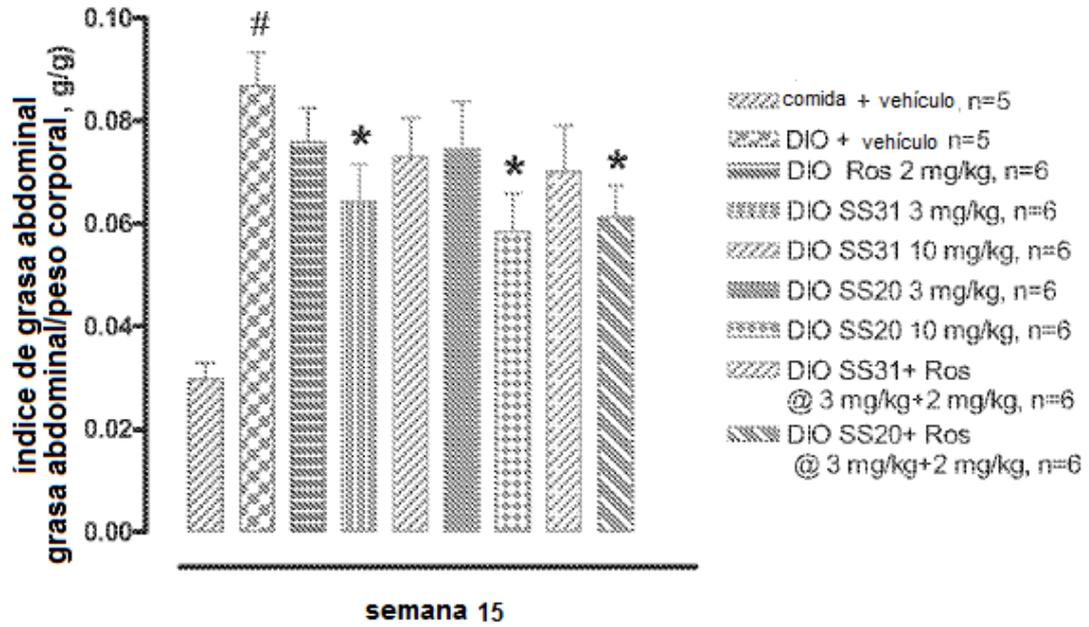


FIG. 5B

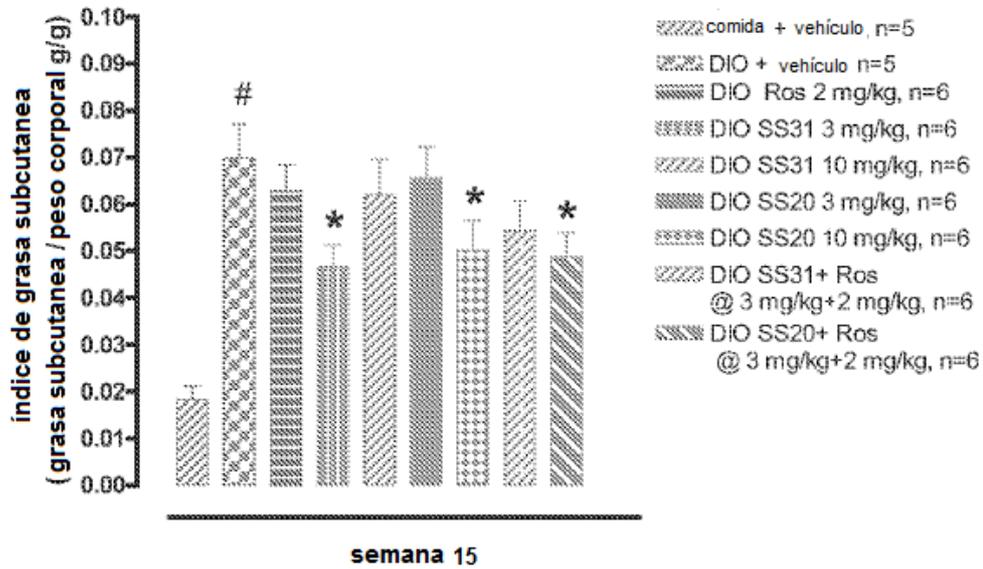


FIG. 6

