

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 427**

51 Int. Cl.:

C07K 7/04	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2009 PCT/US2009/063746**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10054326**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2009 E 09825560 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2344519**

54 Título: **Fragmentos C-terminales de péptido glucagonoide 1 (GLP-1)**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112341 P
05.05.2009 US 175543 P
28.05.2009 US 181849 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2017

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US

72 Inventor/es:

HABENER, JOEL F.;
YANO, TATSUYA y
FALCO, EVA TOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 614 427 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

Fragmentos C-terminales de péptido glucagonoide 1 (GLP-1)

Antecedentes

5 La β -oxidación es el proceso metabólico por el que los ácidos grasos, derivados de la grasa por las acciones de las lipasas, se convierten en glucosa a través de la formación de acetyl-CoA (Bebernitz y Schuster, Curr Pharm Des 8:1199-1227, 2002). Una fuente principal de acetyl-CoA es la oxidación de ácidos grasos. La acetyl-CoA es un potente inhibidor de la oxidación de glucosa a través de la activación de piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), un inhibidor de la enzima glucolítica complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH-C). La PDH es la enzima limitativa de la velocidad en la oxidación de glucosa al convertir piruvato, derivado de glucosa en ciclo glucolítico, en acetyl-CoA. Una norma principal del metabolismo energético es que la glucosa es el combustible preferido, siendo la excepción el corazón y el cerebro que se basan en FAO para el 70% de su energía. Cuando la glucosa se limita, tal como en estados de resistencia a insulina, el sustrato para la combustión se cambia de glucosa a ácidos grasos. Esta regla se conoce como la hipótesis de Randle (Diabetes Metab Rev 14:263-283, 1998). De forma importante, según la hipótesis de Randle, la inhibición del metabolismo (transporte y/u oxidación) de ácidos grasos da como resultado la estimulación de la oxidación de glucosa y la inhibición de la producción de glucosa (gluconeogénesis). Esto es particularmente importante en el hígado, la principal zona de gluconeogénesis.

20 El documento WO 2007/051987 A1 se refiere a análogos y composiciones de péptido insulínico glucagonoide (GLP-1).

Hupe-Sodmann y cols., Regulatory Peptides, 58 (1995), páginas 149-156, se refiere al procesamiento de un fragmento de GLP-1 mediante endopeptidasa neutra humana 24.11.

25 El documento WO 96/06628 A1 divulga formas truncadas N-terminalmente de GLP-1.

Sumario

30 La presente invención se define mediante la reivindicación independiente 1 dirigida a una composición terapéutica para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad.

35 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que péptidos C-terminales pequeños de GLP-1 tienen la capacidad de reducir la obesidad inducida por la dieta, probablemente como resultado de inhibir la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria.

Así, la invención incluye péptidos que comprender nueve o diez aminoácidos del extremo C de GLP-1 para el uso en el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas con la obesidad tales como la diabetes y el síndrome metabólico.

40 Así, en un primer aspecto, la invención proporciona péptidos aislados que consisten en una secuencia (Phe/Tyr)-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-(Lys/Arg)-Gly-Arg-Xaa (SEQ ID N°: 1), en la que Xaa puede ser Gly, Gly-Arg, Gly-Arg-Gly o estar ausente, para el uso en el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas con la obesidad.

45 En algunas realizaciones, si el extremo C es una Arg, el péptido está amidado. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos se modifican mediante la ligazón de un ácido graso, p. ej., palmitato u oleato.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona péptidos de fusión que comprenden una primera porción que consiste en una secuencia: (Phe/Tyr)-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-(Lys/Arg)-Gly-Arg-Xaa (SEQ ID N°: 1), en la que Xaa puede ser Gly, Gly-Arg, Gly-Arg-Gly o estar ausente, fusionada a un péptido que penetra en las células. En algunas realizaciones, el péptido que penetra en las células se fusiona en el extremo C del péptido. En algunas realizaciones, el péptido que penetra en las células se selecciona del grupo que consiste en péptido TAT derivado de VIH, penetratinas, transportanos, péptidos SS y péptido que penetra en las células derivado de hCT.

55 En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones terapéuticas que incluyen los péptidos que se describe en la presente en un portador fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen además al menos un agente que penetra en las células, p. ej., un liposoma catiónico.

60 También se proporciona en la presente el uso de los péptidos o péptidos de fusión descritos en la presente en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la obesidad es la diabetes o el síndrome metabólico.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto normal en la especialidad a la que pertenece esta

invención. Se describen en la presente métodos y materiales para el uso en la presente invención; también se pueden usar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la especialidad. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, domina la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un modelo que representa un proceso en los hepatocitos, y otros tejidos sensibles a insulina, a través del cual el GLP-1 (SEQ ID N°: 2) sufre dos escisiones proteolíticas selectivas de un sitio que dan como resultado la generación de un nonapéptido bioactivo, dando como resultado la GLP-1(28-36)amida la inhibición de la oxidación de ácidos grasos.

La FIG. 2 es un diagrama del acoplamiento de los ciclos metabólicos de la glucosa y los ácidos grasos en el hígado (hepatocitos) y la interacción propuesta de GLP-1 (9-36)amida en el metabolismo de los ácidos grasos (véase la FIG. 1). Este diagrama representa las rutas enzimáticas y los ciclos por los que se acoplan los ciclos de oxidación de ácidos grasos y glucosa.

La FIG. 3 es un gráfico lineal que muestra los resultados de que la infusión de GLP-1(28-36) en ratones alimentados con una dieta muy alta en grasas (VHFD, 60% de grasa) atenúa el aumento de peso. Se sometieron ratones a VHFD o a una dieta de control LFD a las 6 semanas de edad. La infusión continua de GLP-1(28-36)amida, 6,5 nanomoles/24 h/kg de peso corporal a través de osmóbombas se inició a las diez semanas de edad y se continuó durante 3 semanas. Los pesos corporales se midieron antes y durante estas tres semanas. Los valores son medias y D. E., de cuatro ratones en cada grupo.

Las FIG. 4A-4C son gráficos de barras que muestran la regulación de PEPCK (4A) y la expresión de proteína de ACC (las formas tanto fosforilada (pACC) como no fosforilada (ACC) (4B) en presencia y ausencia del péptido GLP-1(28-36), así como el efecto del péptido sobre las relaciones de ACC fosforilada a no fosforilada (4C).

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra que GLP-1(9-36)amida estimula la lipólisis en adipocitos 3T3-L1 de un modo dependiente de la dosis.

Descripción detallada

El complejo receptor de GLP-1 (GLP-1RC) consiste en tres proteínas esenciales: el receptor acoplado a proteína G de GLP-1 (GPCR), el receptor de translocasa/multifuncional de ácidos grasos CD36/FAT y el CD26 de diaminopeptidil peptidasa (Dpp4). El complejo receptor de GLP-1 (GLP-1RC) regula funciones receptoras dobles: 1) activación de la ruta de la proteína cinasa A dependiente de cAMP y 2) la ruta de translocasa de ácidos grasos CD36/FAT, lo que da como resultado una inhibición de la oxidación de ácidos grasos.

Los agonistas de GLP-1 insulíntrópicos, tales como GLP-1(7-36)amida, GLP-1(7-37) y exendina-4, se unen al GPCR de GLP-1 con gran afinidad (nM) y activan la ruta cAMP/PKA dando como resultado las respuestas insulíntrópicas celulares conocidas de GLP-1 (Kieffer y Habener, *Endocr Revs* 20:876-913, 1999; Drucker, *Cell Metab* 3:153-165, 2006). CD26 (Dpp4), una diaminopeptidil peptidasa, en el complejo escinde la GLP-1(7-36)amida de la hormona insulíntrópica hasta la GLP-1(9-36)amida de hormona insulíntrópica acortada aminoterminalmente (De Meester y cols. *Immunol Today* 20:367-375, 1999; Lambeir y cols. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40:209-294, 2003). La GLP-1(9-36)amida, que está presente en el sitio receptor en altas concentraciones (microM), puede imitar a un ácido graso de cadena larga (LCFA) a través de una hélice α anfipática situada en la región C-terminal (AKEFIAWLVKGRamida (SEQ ID N°: 3) o AKEFIAWLVKamida (SEQ ID N°: 4) o variantes de las mismas), y se cree que se une al receptor de CD36/FAT asociado al complejo/transportador de ácidos grasos. A continuación, CD36/FAT puede transportar la GLP-1(9-36)amida en endosomas, quizás en asociación con una proteína de unión a ácidos grasos.

Según se describe en la presente, se cree que dentro de los endosomas la GLP-1(9-36)amida es escindida adicionalmente por una endopeptidasa neutra, tal como NEP24.11, liberando de ese modo un fragmento C-terminal de GLP-1(9-36)amida que consiste en la región helicoidal anfipática prevista, por ejemplo, para ser GLP-1(28-36)amida, FIAWLVKGRamida (SEQ ID N°: 5) o, posiblemente, FIAWLVKamida (SEQ ID N°: 6), o variantes extendidas aminoterminalmente de las mismas, por ejemplo, AKEFAWLVKGRamida (SEQ ID N°: 3) o AKEFIAWLVKamida (SEQ ID N°: 4) (Figura 1). La estructura molecular de la GLP-1(28-36)amida imita a la de un ácido graso de cadena media/larga y a continuación es acetilada por la enzima acetil-CoA ligasa en el grupo amino ϵ de la lisina en la GLP-1(28-36)amida (en negrita en las estructuras de aminoácido representadas anteriormente). El péptido así ligado a acetil-CoA es probablemente transportado a la mitocondria (y peroxisomas) donde se cree que es introducido en e interactúa con los componentes enzimáticos implicados en la oxidación de ácidos grasos, conocida como β -oxidación, que consiste en un complejo enzimático que incluye la proteína trifuncional que consiste

en las subunidades α y β , (HADHA y HADHB) (véase la Figure 2). Puesto que la GLP-1(9-36)amida es un mimético de LCFA, y los carbonos están enlazados por enlaces peptídicos y ahora alcanos, es escasamente reconocida por la maquinaria de oxidación de ácidos grasos y de ese modo inhibe la β -oxidación.

5 Se muestra en la Figura 1 un modelo hipotético, que no presente ser vinculante, que presenta la hipótesis de que en los hepatocitos, y otros tejidos sensibles a insulina, el GLP-1 sufre dos escisiones proteolíticas selectivas de un sitio que dan como resultado la generación de un nonapéptido bioactivo, GLP-1(28-36)amida que se supone que es por inhibición de la oxidación de ácidos grasos. El modelo ilustra el concepto de que la hormona insulínica originaria, GLP-1(7-36)amida, se une a receptores acoplados a proteína G de alta afinidad (GLP-1R) en la
10 membrana plasmática, es escindida por la diaminopeptidil peptidasa CD26 (Dpp-4) adyacente para dar la hormona insulínica troncada aminoterminal GLP-1(9-36)amida que a continuación se une al receptor eliminador de afinidad inferior CD36/FAT en la membrana plasmática. La GLP-1(9-36)amida se transporta dentro de la ruta de transporte de ácidos grasos hacia dentro de la célula, junto con una proteína de unión a ácidos grasos (FABP) donde entra en los endosomas. Los endosomas contienen una endopeptidasa neutra, que se supone que es por ejemplo NEP24.11, también conocida como CD10 o CALLA, que escinde GLP-1(9-36)amida en un péptido fragmentario carboxilterminal, GLP-1(28-36)amida. La GLP-1(28-36)amida imita a un ácido graso en su estructura y es reconocida por la AcilCoA ligasa como un ácido graso que acila GLP-1(28-36)amida sobre el grupo amino ϵ de la lisina en la posición 34. Este péptido mimético de una acil(graso)CoA se lleva al interior del núcleo de la mitocondria hasta la maquinaria de oxidación β donde interactúa con la proteína trifuncional. Puesto que el péptido se une a la
20 GLP-1(28-36)amida no se escinde en dos cadenas de carbonos que constituyen la acetil-CoA, el producto de la β -oxidación de ácidos grasos, actúa como un inhibidor de la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación).

Una ilustración hipotética del acoplamiento de los ciclos metabólicos de la glucosa y los ácidos grasos en el hígado (hepatocitos) y la interacción propuesta de GLP-1 (9-36)amida en el metabolismo de los ácidos grasos se muestra
25 en la Figura 2, que representa las rutas y los ciclos enzimáticos por los que se acoplan los ciclos de oxidación de ácidos grasos y glucosa. De forma importante: la acetil-CoA es la moneda energética que alimenta el ciclo de TCA. La malonil-CoA es un potente inhibidor de la oxidación de ácidos grasos. La acetil-CoA es un activador de piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) que es un potente inhibidor del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDHC), la principal enzima responsable de la oxidación de glucosa. Por otra parte, la acetil-CoA es un potente activador de piruvato carboxilasa (PC), la importante primera etapa en la utilización de piruvato para producir glucosa en la ruta gluconeogénica, la inversa de la ruta de oxidación glucolítica/de glucosa. La insulina es el principal activador hormonal de PDHC (oxidación de glucosa). Indicado simplemente, las rutas de oxidación de glucosa y oxidación de ácidos grasos están acopladas. En condiciones en las que la oxidación de glucosa está limitada, tales como durante el ayuno, y/o estados de resistencia a/deficiencia de insulina, y niveles elevados de glucagón, se incrementa la
35 oxidación de ácidos grasos y se invierte la oxidación de glucosa (ciclo glucolítico) hasta la producción de glucosa (gluconeogénesis).

Endopeptidasa neutra-24.11 (NEP24.11, CD10)

40 Se espera que la escisión propuesta de GLP-1 (9-36) en los endosomas mediante endopeptidasas neutras tales como NEP24.11/CD10 forme fragmentos C-terminales de aproximadamente 9 a 12 aminoácidos que consiste en la hélice α anfipática, todavía unida a CD36/FAT. Esta escisión es análoga a la escisión de glucagón hasta miniglucagón, según se presenta por Authier y cols. (Endocrinology 144:5353-5364, 2003). Puesto que es probable que el fragmento C-terminal de GLP-1 actúe como un LCFA sustituto, no es eficaz como LCFA y así tiene una acción inhibitoria neta sobre las funciones de CD36 en el transporte y la oxidación de ácidos grasos (LCFA) (Koonen y cols., Diabetes 56:2863-2871, 2007). Hupe-Sodmann y cols. (Regul Pept 58:149-156, 1995) mostraron que la endopeptidasa neutra, NEP24.11, escinde fácilmente GLP-1(7-36)amida in vitro hasta un péptido C-terminal con la secuencia, FIAWLKGRamida (SEQ ID N°: 5) (véase la Tabla 2 en la página 153 de Hupe-Sodmann y cols.). Por otra parte, la endopeptidasa NEP24.11 está ampliamente distribuida en tejidos de todo el cuerpo (Roques y cols., Pharmacol Rev 45:87-146, 1993). Según se describe en la presente, la infusión de los péptidos C-terminales de GLP-1 inhibían el aumento de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasas.

Regiones superenrolladas helicoidales anfífilas C-terminales compartidas comunes en varias hormonas peptídicas

55 Graham Baldwin y colaboradores describen la unión de péptido de gastrina C-terminales a HADHA, la subunidad α de 78 kDa de la proteína trifuncional, que es el corazón del complejo enzimático de β -oxidación (Murphy y cols., Int J Biochem Cell Biol 28:1233-1240, 1996). Los péptidos C-terminales de gastrina se unen a e inhiben las subunidades α y β de la proteína trifuncional implicada en la oxidación de ácidos grasos. (Hashimoto y cols., J Biochem 119:1196-1201, 1996). Anteriormente, se creía que HADHA era el receptor de gastrina. Posteriormente, se identificó un receptor acoplado proteína G (GPCR) para la gastrina, y para CCK, y la significación de HADHA y la proteína trifuncional en interacciones con gastrina sigue siendo desconocida. Se presenta que la gastrina estimula las transiciones epiteliales-mesenquimales de las células (Ferrand y cols., Exp Cell Res 301:128-138, 2004). Hasta ahora, todavía no se ha establecido una conexión entre gastrina/CCK y CD36. Las acciones de la gastrina que se producen independientemente de su GPCR se consideran mediadas por un "nuevo" receptor. De forma interesante,
65 la secuencia pentapeptídica C-terminal comparte fuertes similitudes de la secuencia de aminoácidos con la región similar en GLP-1, y varias otras hormonas peptídicas incluyendo exendina-4, polipéptido inhibidor gástrico (GIP),

glucagón, péptido liberador de hormona del crecimiento (GHRP), colecistocinica (CCK), grelina y el secretagogo de hormona del crecimiento sintético (hexarelina) (véase la Tabla 4).

Péptidos C-terminales, péptidos de fusión, peptidomiméticos y modificaciones de GLP-1

5 Los péptidos C-terminales de GLP-1 descritos en la presente incluyen la secuencia FIAWLVKGRamida (SEQ ID N°: 5), o una variante de la misma. Las variantes incluyen péptidos en los que la secuencia se extiende C-terminalmente, p. ej., FIAWLVKGRG (SEQ ID N°: 7), FIAWLVKGRGR (SEQ ID N°: 8) o FIAWLVKGRGRamida (SEQ ID N°: 9), o en los que uno o más aminoácidos se sustituyen conservativamente, por ejemplo FIAWRVKGRamida (SEQ ID N°: 10), en la que la Lisina 32 (la numeración se refiere al GLP-1 de longitud total) se cambia por Arginina, o en la que la Fenilalanina 28 se cambia por Tirosina (YIAWLVKGRamida (SEQ ID N°: 11)). Péptidos ejemplares también incluyen la secuencia AKE en el extremo N.

15 Péptidos ejemplares descritos en la presente pueden tener la secuencia Xaa1-(Phe/Tyr)-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-(Lys/Arg)-Gly-Arg-Xaa2 (SEQ ID N°: 12), en la que Xaa1 puede ser Ala-Lys-Glu o estar ausente, y Xaa2 puede ser Gly, Gly-Arg, Gly-Arg-Gly o estar ausente.

20 En algunas realizaciones, los péptidos descritos en la presente pueden tener la secuencia (Phe/Tyr)-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-(Lys/Arg)-Gly-Arg-Xaa (SEQ ID N°: 1), en la que Xaa puede ser Gly, Gly-Arg, Gly-Arg-Gly o estar ausente.

Se conocen en la especialidad métodos para elaborar estos péptidos, p. ej., usando síntesis química o expresión en un célula hospedadora.

Péptidos de fusión

25 En algunas realizaciones, los péptidos también incluyen un resto que penetra en las células que facilita el aporte de los péptidos al espacio intracelular, p. ej., péptido TAT derivado de VIH, penetratinas, transportanos, péptidos SS (residuos aromáticos y aminoácidos básicos alternos (péptidos aromáticos-catiónicos)), péptidos SA, SM o SNL, o un péptido derivado de hCT que penetra en las células, véase, p. ej., Caron y cols., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi y cols., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; Lindgren y cols., Trends Pharmacol Sci. 21(3):99-103 (2000); Zhao y cols., J Biol Chem 279:34682-34690 (2004); Szeto, AAPS Journal 2006; 8 (2) Artículo 32; Deshayes y cols., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16):1839-49; Hom y cols., J Med. Chem., 46:1799 (2003); Bonny y cols., Diabetes, 50:77-82 (2001), las Pat. EE. UU. N° 6841535 y 7576058 y las referencias citadas allí. En algunas realizaciones el resto que penetra en las células está ligado al péptido, p. ej., como una sola proteína de fusión; así, la invención incluye proteínas de fusión que comprenden un péptido C-terminal de GLP-1 según se describe en la presente y un péptido que penetra en las células, p. ej., TAT, penetratinas, transportanos, o péptido que penetra en las células derivado de hCT. En algunas realizaciones, el péptido que penetra en las células está enlazado al extremo N del péptido C-terminal de GLP-1; en algunas realizaciones, el péptido que penetra en las células está enlazado al extremo C del péptido C-terminal de GLP-1. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un resto escindible como los conocidos en la especialidad entre el péptido que penetra en las células y el péptido C-terminal de GLP-1 que escinde el péptido que penetra en las células, dejando intacto el péptido C-terminal de GLP-1.

Peptidomiméticos

45 Los péptidos divulgados en la presente se pueden modificar según los métodos conocidos en la especialidad para producir peptidomiméticos. Véanse, p. ej., Kazmierski, W.M., ed., Peptidomimetics Protocols, Human Press (Totowa NJ 1998); Goodman y cols., eds., Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Thiele Verlag (New York 2003); y Mayo y cols., J. Biol. Chem., 278:45746 (2003). En algunos casos, estas versiones peptidomiméticas modificadas de los péptidos y fragmentos divulgados en la presente exhiben una estabilidad potenciada in vivo, con relación a los péptidos no peptidomiméticos.

55 Métodos para crear un peptidomimético incluyen sustituir uno o más, p. ej., la totalidad, de los aminoácidos en una secuencia peptídica con enantiómeros de D-aminoácidos. Tales secuencias se denominan en la presente secuencias "retro". En otro método, el orden de N-terminal a C-terminal de los residuos de aminoácido se invierte, de modo que el orden de residuos de aminoácido desde el extremo N hasta el extremo C del péptido original se convierte en el orden de residuos de aminoácido desde el extremo C hasta el extremo N en el peptidomimético modificado. Tales secuencias se pueden denominar secuencias "inverso".

60 Los peptidomiméticos pueden ser las versiones tanto retro como inverso, es decir, la versión "retro-inverso" de un péptido divulgado en la presente. Los nuevos peptidomiméticos pueden estar compuestos por D-aminoácidos dispuestos de modo que el orden de residuos de aminoácido desde el extremo N hasta el extremo C en el peptidomimético corresponde al orden de residuos de aminoácido desde el extremo C hasta el extremo N del péptido original.

65

Otros métodos para elaborar peptidomiméticos incluyen reemplazar uno o más residuos de aminoácido en un péptido por un análogo funcional químicamente distinto pero reconocido del aminoácido, es decir, un análogo de aminoácido artificial. Análogos de aminoácidos artificiales incluyen β -aminoácidos, β -aminoácidos sustituidos en β (" β -aminoácidos"), análogos fosforados de aminoácidos, tales como ácidos aminofosfónicos y ácidos aminofosfínicos, y aminoácidos que tienen enlaces no peptídicos. Se pueden usar aminoácidos artificiales para crear peptidomiméticos, tales como oligómeros peptoides (p. ej., análogos de amida o éster peptoides), β -péptidos, péptidos cíclicos, oligourea o péptidos de oligocarbamato; o moléculas anulares heterocíclicas. Peptidomiméticos retro-inverso ejemplares incluyen RGKVLWAIF (SEQ ID N°: 13), GRGKVLWAIF (SEQ ID N°: 14) o RGRGKVLWAIF (SEQ ID N°: 15), en los que las secuencias incluyen todos D-aminoácidos.

Modificaciones

Las secuencias peptídicas descritas en la presente se pueden modificar, p. ej., mediante la modificación de uno o más residuos de aminoácido de un péptido por medios químicos, bien con o bien sin una enzima, p. ej., mediante alquilación, acilación, formación de éster, formación de amida, p. ej., en el extremo carboxi, o biotilación, p. ej., del extremo amino. En algunas realizaciones, los péptidos se modifican mediante la adición de un sustituyente lipófilo (p. ej., un ácido graso) por un aminoácido, p. ej., por la Lisina. En algunas realizaciones, los péptidos incluyen uno o más grupos imidazol N-terminales, o un grupo amida C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo ϵ -amino de Lys34 se sustituye por un sustituyente lipófilo, p. ej., de aproximadamente 4-40 átomos de carbono, p. ej., 8-25 átomos de carbono. Ejemplos incluyen grupos acilo C6-C20 lineales y ramificados. Sustituyentes lipófilos ejemplares y métodos para enlazar los mismos (incluyendo a través de un conector opcional) se proporcionan en la Pat. EE. UU. 6268343 y Knudsen y cols., J. Med. Chem. 43:1664-1669 (2000). En algunas realizaciones, el sustituyente lipófilo es un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena lineal o ramificados, p. ej., ácido oleico, ácido caprílico, ácido palmítico y sales de los mismos.

En algunas realizaciones, las secuencias peptídicas se modifican al sustituir uno o más residuos de aminoácido del péptido originario por otro residuo de aminoácido. En algunas realizaciones, el número total de aminoácidos diferentes entre el péptido de secuencia modificada y la correspondiente forma natural del péptido C-terminal de GLP-1 es hasta cinco, p. ej., hasta cuatro residuos de aminoácido, hasta tres residuos de aminoácido, hasta dos residuos de aminoácido, o un residuo de aminoácido.

En algunas realizaciones, el número total de aminoácidos diferentes no superaba cuatro. En algunas realizaciones, el número de aminoácidos diferentes es tres, dos o uno. A fin de determinar el número de aminoácidos diferentes, se debe comparar la secuencia de aminoácidos del derivado de GLP-1 de secuencia modificada con el correspondiente fragmento C-terminal de GLP-1 natural.

Se describe en la especialidad un número de análogos y modificaciones de secuencia de GLP-1 adecuados, véanse, p. ej., los documentos EP 0708179; WO 91/11457; Pat. EE. UU. N° 6268343)

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras

Se describen en la presente ácidos nucleicos que codifican un péptido o péptido modificado C-terminal de GLP-1. Por ejemplo, se describen en la presente ácidos nucleicos que codifican péptidos que incluyen la secuencia SEQ ID N°: 1 o 12. Ácidos nucleicos descritos en la presente también incluyen ácidos nucleicos que codifican ciertos péptidos C-terminales de GLP-1 modificados, p. ej., retro-péptidos C-terminales de GLP-1, péptidos C-terminales de GLP-1 conectados a una secuencia (portadora) de internalización celular y retro-péptidos C-terminales de GLP-1 conectados a una secuencia portadora.

Ácidos nucleicos divulgados en la presente también incluyen tanto ARN como ADN, incluyendo ADN genómico y ADN sintético (p. ej., sintetizado químicamente). Los ácidos nucleicos puede ser de doble hebra o de una sola hebra. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar usando análogos o derivados oligonucleotídicos (p. ej., nucleótidos de inosina o fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos con resistencia a nucleasas incrementada.

También se describe en la presente construcciones genéticas (p. ej., vectores y plásmidos) que incluyen un ácido nucleico que codifica un péptido descrito en la presente conectado operativamente a una secuencia de transcripción y/o traducción que permite la expresión del péptido, p. ej., vectores de expresión. Un ácido nucleico seleccionado, p. ej., una molécula de ADN que codifica un péptido descrito en la presente, está "conectado operativamente" a otra molécula de ácido nucleico, p. ej., un promotor, cuando está situado bien adyacente a la otra molécula o bien en la misma u otra posición de modo que la otra molécula pueda dirigir la transcripción y/o traducción del ácido nucleico seleccionado.

También se describen en la presente diversas células manipuladas, p. ej., células hospedadoras transformadas, que contienen un ácido nucleico divulgado en la presente. Una célula transformada es una célula en la que (o en un progenitor de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico que codifica un péptido descrito en la presente que se une a HSP-90 y/o induce apoptosis en una célula tumoral. Pueden ser

células hospedadoras células tanto procarióticas como eucarióticas, p. ej., células de mamífero (p. ej., célula tumoral), levaduras, hongos y bacterias (tales como *Escherichia coli*). Una célula manipulada ejemplar del tipo descrito en la presente es una célula tumoral que expresa un péptido C-terminal de GLP-1.

5 Métodos de tratamiento

Los métodos descritos en la presente incluyen métodos para el tratamiento de la obesidad y trastornos asociados con la obesidad, p. ej., diabetes y síndrome metabólico. En algunos ejemplos, el trastorno es obesidad inducida por la dieta, p. ej., obesidad inducida por una dieta alta en calorías o alta en grasas. Generalmente, los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido C-terminal de GLP-1 o peptidomimético según se describe en la presente a un sujeto que necesite, o que se ha determinado que necesita, tal tratamiento.

Según se usa en este contexto, "tratar" significa mejorar al menos un síntoma de la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. A menudo, la obesidad da como resultado hiperglicemia; así, un tratamiento puede dar como resultado una reducción en los niveles de glucosa en sangre y un retorno o aproximación a la normoglucemia. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente para el tratamiento de la obesidad dará como resultado una disminución en el peso o la grasa corporal.

20 Dosificación

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéutica es una que alcanza el efecto terapéutico deseado. Esta cantidad puede ser igual o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para evitar el comienzo de una enfermedad p síntomas de enfermedad. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico (es decir, una dosificación eficaz) depende de los compuestos terapéuticos seleccionados. Las composiciones se pueden administrar de una o más veces al día a una o más veces a la semana; incluyendo un día sí y uno no. El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y la cronología requeridas para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero no limitados a, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Por otra parte, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos terapéuticos descritos en la presente puede incluir un solo tratamiento o una serie de tratamientos.

La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéuticas de los compuestos terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren compuestos que exhiban índices terapéuticos altos. Aunque se pueden usar compuestos que exhiban efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de aporte que dirija tales compuestos al sitio de tejido afectado a fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular una gama de dosificaciones para el uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación 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 ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluye la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en el cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar más exactamente dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

55 Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los métodos descritos en la presente incluyen la fabricación y el uso de composiciones farmacéuticas, que incluyen péptidos C-terminales de GLP-1 descritos en la presente como ingredientes activos. También se incluyen las propias composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente un portador farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos complementarios.

65

Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para ser compatibles con su vía de administración pretendida. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

5 Se conocen en la especialidad métodos para formular composiciones farmacéuticas adecuada, véanse, p. ej., los libros de la serie Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY). Por ejemplo, las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol
10 bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones 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 sódico. La preparación parenteral se pueden encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

15 Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estériles y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se
20 puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede alcanzar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo al incluir en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera,
35 seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar 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 de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una solución del mismo previamente filtrada estérilmente.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas, p. ej., cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se
45 pueden preparar usando un portador fluido para el uso como un colutorio. También se pueden incluir como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, las pastillas para chupar y similares pueden contener cualesquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de 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 algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato magnésico o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como hierbabuena, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se pueden aportar en la forma de un pulverizador de aerosol desde un recipiente o dosificador presurizado que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la Patente de EE. UU. N° 6.468.798.

La administración sistémica de un compuesto terapéutico según se describe en la presente también puede ser mediante medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Tales penetrantes generalmente son conocidos en la especialidad, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fúscico. La administración tras mucosa se puede efectuar a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o creas como se sabe generalmente en la especialidad.

65

Las composiciones farmacéuticas también se pueden preparar en la forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el aporte rectal.

- 5 En algunas realizaciones, los péptidos C-terminales de GLP-1 se formulan con un agente que penetra en las células que se conoce en la especialidad, p. ej., liposomas o micelas. También se pueden usar sistemas de aporte en forma de micropartículas o nanopartículas biodegradables que incrementan la captación intracelular, p. ej., nanopartículas poliméricas y modificadas superficialmente como las descritas en el documento US 2009/0136585. Ejemplos incluyen nanopartículas de poli-DL-láctido-co-glicólido (PLGA), p. ej., modificadas superficialmente con agentes modificadores superficiales conocidos, tales como heparina, bromuro de dodecilmetilamonio (DMAB), DEAE-dextrano, lipofectina y fibrinógeno (véanse, p. ej. Song y cols., J. Control. Release, 54:201-211 (1998); Labhassetwar y cols., J. Pharm. Sci., 87:1229-34 (1998); Lee y cols., Biomaterials 29(9): 1224-1232 (2008); y el documento US 2009/0136585.
- 10
- 15 En una realización, los compuestos terapéuticos se preparan con portadores que protegerán a los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de aporte microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Tales formulaciones se pueden preparar usando técnicas estándar, u obtenerse comercialmente, p. ej., de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células seleccionadas con anticuerpos monoclonal para antígenos celulares) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la especialidad, por ejemplo, como los descritos en la Patente de EE. UU. N° 4.522.811.
- 20
- 25 Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un envase, paquete o dosificador junto con instrucciones para la administración.

Ejemplos

- 30 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Proteínas reticuladas con GLP-1

- 35 Se analizaron proteínas reticuladas mediante GLP-1(7-36) con un marcador fluorescente (FITC) en la región C-terminal en adipocitos 3T3-L1. Las proteínas reticuladas se fraccionaron mediante SDS-PAGE y las proteínas marcadas fluorescentemente se aislaron y se sometieron a análisis proteínicos e identificación de espectrometría de masas MALDI-TOF usando metodología estándar.
- 40 Esencialmente todas las proteínas, algunas 20+ de ellas, eran componentes de la maquinaria de transporte y oxidación de ácidos grasos. Las proteínas identificadas mediante estos métodos y conocidas por estar implicadas en el transporte y la oxidación de ácidos grasos se listan en la Tabla 1.

- 45 Tabla 1. Proteínas implicadas en el transporte y la oxidación de ácidos grasos reticuladas mediante GLP-1(7-36) en adipocitos 3T3-L1

Ácido graso de cadena larga CoA ligasa 1
Proteína trifuncional α HADHA
Proteína trifuncional β HADHB
Succinato deshidrogenasa ubiquinona flavoproteína
Acil CoA deshidrogenasa 9
3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa tipo II
Aldehído deshidrogenasa 6
NADH ubiquinona oxidorreductasa 75 kDa
Ácidos grasos 27a4 portadores de soluto
Acil CoA deshidrogenasa específica de cadenas muy largas
Carnitina palmitoil transferasa 2
Acil CoA desaturasa

Acil CoA deshidrogenasa, específica de cadenas cortas/ramificadas
Acil CoA deshidrogenasa, específica de cadenas medias
Cadena larga de ácido graso CoA ligasa 6
Metilcrotonil CoA carboxilasa 2
Deshidrogenasa/reductasa SDR1
Esteroides deshidrogenasa putativa
Succinil CoA ligasa β
Similar a aldehído graso deshidrogenasa
Acetil Coenzima A carboxilasa
Serina palmitoiltransferasa 1
Piruvato carboxilasa

5 Notablemente, el GLP-1 reticula fuertemente las dos subunidades de la proteína trifuncional (HADHA y HADHB), que son enzimas situadas en la matriz de la mitocondria que comprenden el núcleo de la maquinaria de β -oxidación, así como varias enzimas implicadas en el transporte y el metabolismo mitocondriales de los ácidos grasos, tales como AcilCoA deshidrogenasas, AcilCoA ligasa y carnitina palmitoil transferasa 2; la carnitina palmitoil transferasa 2 y las AcilCoA deshidrogenasas están situadas en la membrana interna de la mitocondria. Es probable que la Dpp4 presente en las células 3T3 procesara la GLP-1(7-36)amida marcada hasta GLP-1(9-36)amida bastante eficazmente. Notablemente, los adipocitos 3T3-L1 consuman glucosa procedente del medio de cultivo a una velocidad muy alta (Carlson y cols., Mol Cell Biol. 13(8):4736-44 (1993)) de modo que es probable que estas células estén privadas de glucosa en el momento de la incubación con GLP-1(7-36)amida y la reticulación. Por otra parte, los adipocitos contienen altas cantidades de triglicérido almacenado que sirve como el sustrato para la oxidación de ácidos grasos.

15 Los resultados mostraban que los péptidos que incluían el extremo C de GLP-1 se reticulan predominantemente a proteínas mitocondriales implicadas en el transporte y la oxidación de ácidos grasos .

Estos resultados implican una acción de GLP-1 o fragmentos del mismo en la oxidación de ácidos grasos.

20 Ejemplo 2. El nonapéptido carboxiloterminale de péptido glucagonoide-1, GLP-1(28-36)amida, previene el aumento de peso en ratones con alimentación alta en grasas

El péptido glucagonoide-1 (GLP-1) es un péptido insulínico que estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa (Kieffer y Habener, Endocr Rev.20(6):876-913 (1999)). El péptido insulínico, GLP-1(7-36)amida, es rápidamente inactivado en la circulación por la diaminodipeptidil peptidasa-4 (Dpp4) para dar la GLP-1(9-36)amida (Drucker, Cell Metab. 3(3):153-65 (2006)). Los agonistas de GLP-1 y los inhibidores de Dpp4 para potenciar los niveles plasmáticos de GLP-1(7-36)amida insulínica endógena se están usando para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Lovshin y cols., Nat Rev Endocrinol. 5(5):262-9 (2009)). Aunque generalmente se cree que el metabolito de GLP-1(9-36)amida es biológicamente inactivo, una evidencia reciente indica que ejerce acciones cardioprotectoras (Ban y cols., Circulation. 117(18):2340-50 (2008)) e inhibe la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) (Elahi y cols., Obesity (Silver Spring). 16(7):1501-9 (2008)). Debido a que en estudios preliminares en hepatocitos aislados los presentes inventores solo encontraron acciones débiles de GLP-1(9-36)amida en concentraciones altas (micromolares) sobre la gluconeogénesis hepática, se estableció como hipótesis que GLP-1(9-36)amida podría ser un precursor de un péptido activo menor codificado dentro de la secuencia de aminoácidos de GLP-1(9-36)amida. Se propone que la endopeptidasa neutra, NEP 24.11, sea responsable de la degradación de GLP-1, por mucho que se hubiera pensado en la Dpp4 como una enzima degradante de péptido para GLP-1 (Plamboeck y cols., Diabetologia. 48(9):1882-90 (2005)). La secuencia carboxiloterminale de GLP-1, FIAWLVKGRamida, GLP-1(28-36)amida, es un producto peptídico principal de la escisión de GLP-1 por NEP 24.11 (Hupe-Sodmann y cols., Regul Pept. 58(3):149-56 (1995)). Por lo tanto, la GLP-1(28-36)amida se infundió en ratones alimentados tanto con una dieta de comida normal (LFD) como con una dieta muy alta en grasas (VHFD) durante tres semanas. Notablemente, la GLP-1(28-36)amida prevenía completamente el aumento de peso normal y la adipogénesis observados en los ratones con alimentación alta en grasas sin diferencias observables en la ingesta de alimento (véase la Fig. 3).

45 Se realizó un examen de los perfiles de expresión génica en los hígados de ratones tratados con GLP-1(28-36)amida. Se realizaron medidas de los niveles de ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) en hígados de ratones alimentados con una dieta muy alta en grasas (VHFD) o una dieta baja en grasas (LFD) normal durante semanas seguida por infusiones subcutáneas con osmóbomba bien de vehículo o

bien de GLP-1(28-36)amida durante tres semanas adicionales. Los datos de la Tabla 2, posteriormente, muestran cambios en los niveles de ARNm en los grupos LFD y VHFD de ratones comparando el vehículo frente a GLP-1(28-36)amida, donde el vehículo se fija a una valor de 1,0. La Tabla 3 muestra los datos normalizados para los ratones LFD como 1,0. Se observaron cambios importantes en los niveles de ARNm para PEPCK (fosfopiruvato carboxinasa), PPAR γ (receptor de activación por proliferación de peroxisomas γ), CD36 (determinante cCuster 36/translocador de ácidos grasos), SCD-1 (esterol CoA deshidrogenasa), SREBIPc (proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c), FASN (ácido graso sintasa) y PPAR α (receptor activador de la proliferación de peroxisomas α). La GLP-1(28-36)amida parece regular PEPCK, PPAR γ , CD36, SCD1, SREBP1c, FASN y PPAR α .

- 5
- 10 Los resultados demostraban que el péptido (28-36) regulaba los ARNm para esteroil CoA saturasa, carnitina palmitoil transferasa 1, AcilCoA oxidasa, AcilCoA carboxilasa, ácido graso sintasa y fosfopiruvato caboxinasa y los niveles de proteína y fosfoproteína de acetilCoA carboxilasa, sugiriendo la modulación de la oxidación de ácidos grasos (véanse las Tablas 2 y 3).

15 Tabla 2. Diferencia en número de veces en comparación con el PÉPTIDO (28-36)

ARNm/QPCR	LFD	LFD/28-36	VHFD	VHFD/28-36
PEPCK	1	1,6	1	1,5
ACOX	1	1,4	1	1,04
PPAR γ	1	1,54	1	1,4
PGC1 α	1	1,4	1	1,2
CD36	1	1,25	1	1,7
SCD-1	1	(2)	1	3,05
CPT1	1	1,21	1	1,02
SREBP-1c	1	1,1	1	1,3
FASN	1	1	1	1,2
PPAR α	1	1,2	1	1,35

Los valores entre paréntesis indican regulación a la baja.

Tabla 3. Diferencia en número de veces en comparación con LFD

ARNm/QPCR	LFD	LFD/28-36	VHFD	VHFD/28-36
PEPCK	1	1,6	1,07	1,6
ACOX	1	1,4	1,14	1,2
PPAR γ	1	1,54	1,6	2,2
PGC1 α	1	1,35	(1,7)	(1,4)
CD36	1	1,25	1	1,7
SCD-1	1	(2)	(50)	(15)
CPT1	1	1,2	1,7	1,74
SREBP-1c	1	1	(1,2)	1
FASN	1	1	(5)	(4)
PPAR α	1	1,2	1,4	1,9

- 20 Los valores entre paréntesis indican regulación a la baja.

25 Según se muestra en las Figs. 4A-4C, la infusión de GLP-1(28-36)amida durante tres semanas en ratones alimentados con una dieta muy alta en grasas daba como resultado una disminución en fosfoACC (pACC, fosfo-acetilCoA carboxilasa) hepática, véase, p. ej., la Fig. 4C, indicando un incremento en la bioactividad de ACC (la fosforilación de ACC inactiva la actividad enzimática). Esto es importante debido a que la ACC está altamente regulada en el hígado y es la enzima clave responsable de la síntesis de malonil CoA a partir de acetilCoA y es un precursor de la síntesis de ácidos grasos y un potente inhibidor de CPT1 (carnitina palmitoil transferasa 1), la enzima limitativa de la velocidad en el transporte de ácidos grasos en la maquinaria de β -oxidación de la mitocondria. Esto significa que el GLP-1(28-36) está ejerciendo una inhibición sobre la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación). El incremento en la expresión de SCD1 en respuesta a la infusión de GLP-1(28-36)amida es coherente con un

- 30

incremento en la actividad de ACC ya que se cree que SCD1 inhibe AMP cinasas que es un inhibidor de ACC. El mecanismo actualmente propuesto para la prevención del aumento de peso mediante GLP-1(28-36)amida en ratones alimentados con una dieta muy alta en grasas implica un efecto doble de GLP-1(28-36)amida sobre el tejido adiposo para potenciar la lipólisis y la quema de grasas e inhibir la lipogénesis. La ciclación de ácidos grasos y la hipertrigliceridemia potencian la oxidación de ácidos grasos hepática con una consiguiente gluconeogénesis potenciada acoplada conducida por la quema de grasas potenciada. La expresión de PEPCK está bajo el control de la retroalimentación complejo y es una medida de la gluconeogénesis

Estudios preliminares del efecto de GLP-1(9-36) sobre la lipólisis también se realizaron en hepatocitos de ratón aislados y adipocitos 3T3-L1. La liberación de glicerol en el medio de cultivo se usó como una medida de lipólisis activa, y el isoproterenol sirve como un estimulador conocido de la lipólisis. En estos experimentos, la GLP-1(9-36)amida se añadió gota a gota (1-30 nM) sobre un fondo de isoproterenol 10 nM. Las incubaciones eran durante 60 min. Los resultados, mostrados en la Fig. 5, indican que la GLP-1(28-36)amida se dirige a la mitocondria y ejerce un fenotipo de quema de grasas al inhibir la lipogénesis, y estimular la lipólisis, sugiriendo el procesamiento de GLP-1(9-36)amida hasta GLP-1(28-36)amida en los adipocitos.

La GLP-1(7-36)amida con un marcador fluorescente (FITC) en la región C-terminal reticulaba proteínas mitocondriales implicadas en el transporte de ácidos grasos y la oxidación de ácidos grasos, incluyendo las subunidades α y β de la proteína trifuncional, ácido graso AcilCoA sintasa, acil grasoCoA deshidrogenasas y carnitina palmitoil transferasa 2. Notablemente, las comparaciones de las estructuras de GLP-1(28-36)amida con las de hexarelina y pentagastrina muestran similitudes sorprendentes (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Hélices α anfipáticas hidrófobas en regiones C-terminales de hormonas peptídicas que imitan la estructura de ácidos grasos de cadena corta y se predice que se unen a y son transportadas por la CD36 ácido graso translocasa

Péptido	Secuencia	ID SEQ N°
Hexarelina	H-W(Me)-A-W-F-Kamida	16
GLP-1	F-I-A-W-L-V	17
Exd4	F-I-E-W-L-K	18
GIP (3-31)	F-V-N-W-L-L	19
Glucagón	F-V-Q-W-L-M	20
Gastrina-C	A-Y-G-W-M-D-Famida	21
GHRP6	H-W-K-W-F-Kamida	22
CCK8	Y-M-G-W-M-D-Famida	23
Grelina (3)	S-M-L-W-M-D	24
	L-E-G-W-L-H	25
	D-I-L-W-E-V	26

Las secuencias de la Tabla 4 se alineaban basándose en la conservación conocida de residuos de triptófano en proteínas. Estas son secuencias anfipáticas helicoidales pequeñas hidrófobas y podrían imitar a una cadena de ácido graso.

En todas estas secuencias peptídicas hormonales C-terminales, el aminoácido triptófano (W) está altamente conservado. Se sabe que los residuos de triptófano en proteínas están entre los más altamente conservados de todos los aminoácidos en la evolución de secuencias proteínicas (Dayhoff y cols., Methods Enzymol 91:524-545, 1983). Por otra parte, las estructuras secundarias de estas secuencias peptídicas C-terminales mostradas en la Tabla 2 se modelan todas como hélices α anfipáticas. Se prevé que estas regiones de secuencia en las hormonas peptídicas estarían muy favorecidas para sumir una conformación helicoidal en el ambiente hidrófobo de los ácidos grasos cuando están presentes en una ruta de transporte de ácidos grasos.

Esto es de interés debido a que se presenta que la hexarelina promueve la biogénesis mitocondrial y un fenotipo de quema de grasas (Rodrigue-Way y cols., Endocrinology. 148(3):1009-18 (2007)) en adipocitos grasos y se muestra que la gastrina entra en las células y e interactúa con (inhibe) la subunidad α de la proteína trifuncional (HADHA) implicada en la β -oxidación (Hashimoto y cols., J Biochem. 119(6):1196-201 (1996)).

Los hallazgos descritos en la presente indican que la escisión de GLP-1 por NEP24.11 no degrada GLP-1 sino que en cambio genera una nueva bioactividad implicada en la regulación del metabolismo de las grasas y el balance de

energía. Estos hallazgos también pueden tener implicaciones potenciales para la patogénesis y el tratamiento de la obesidad, el síndrome metabólico.

Otras realizaciones

5 Se ha de entender que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción precedente está destinada a ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que es definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición terapéutica para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en donde la composición terapéutica comprende un péptido aislado en un portador fisiológicamente aceptable, consistiendo el péptido aislado en una secuencia:
- (Phe/Tyr)-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-(Lys/Arg)-Gly-Arg-Xaa (SEQ ID N°: 1),
- 10 en la que Xaa puede ser Gly, Gly-Arg, Gly-Arg-Gly o estar ausente.
2. La composición terapéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que si el extremo C es una Arg, el péptido está amidado.
- 15 3. La composición terapéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que uno o más aminoácidos están modificados mediante el enlace de un ácido graso.
- 20 4. La composición terapéutica según la reivindicación 3, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el ácido graso se selecciona del grupo que consiste en palmitato y oleato.
5. La composición terapéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el péptido está fusionado a un péptido que penetra en las células.
- 25 6. La composición terapéutica según la reivindicación 5, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el péptido que penetra en las células está fusionado al extremo C del péptido según la reivindicación 1.
- 30 7. La composición terapéutica según la reivindicación 5, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el péptido que penetra en las células se selecciona del grupo que consiste en péptido TAT derivado de VIH, penetrinas, transportanos, péptidos SS y péptido que penetra en las células derivado de hCT.
- 35 8. La composición terapéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, que comprende además al menos un agente que penetra en las células.
9. La composición terapéutica según la reivindicación 8, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el agente que penetra en las células es un liposoma catiónico.
- 40 10. La composición terapéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, en la que el trastorno relacionado con la obesidad es la diabetes o el síndrome metabólico.

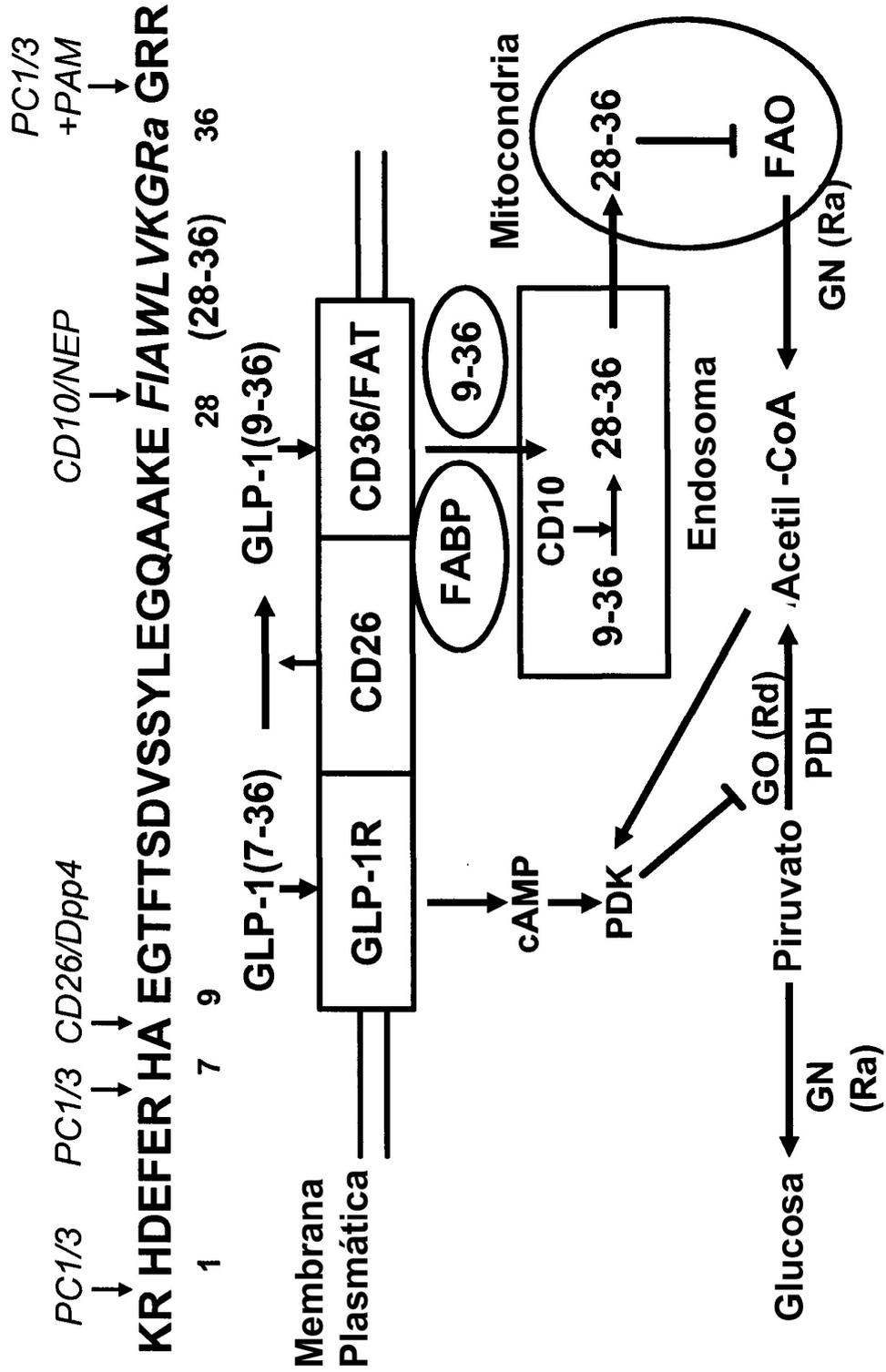


FIG. 1

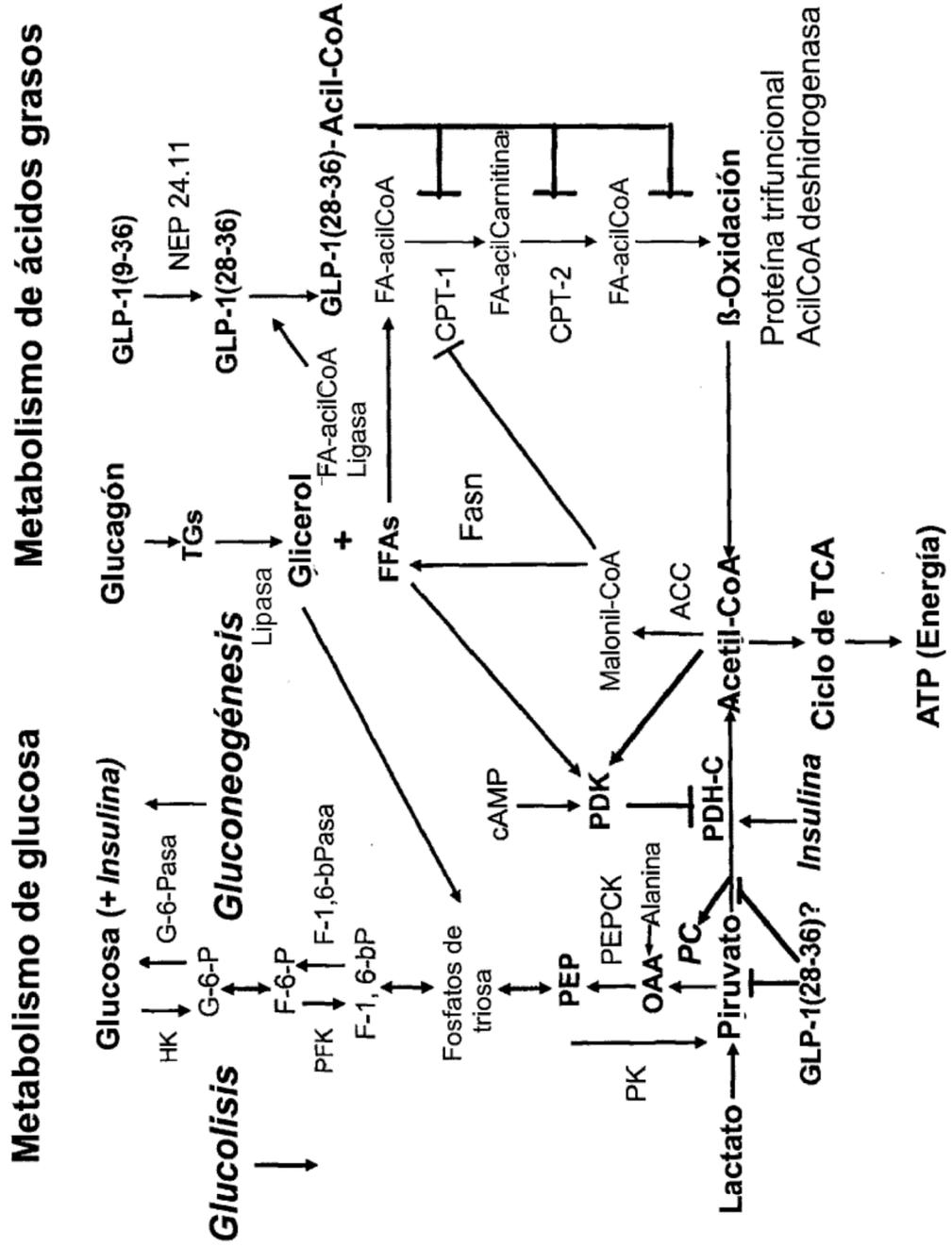


FIG. 2

Efectos de 28-36 sobre LFD frente a VHFD

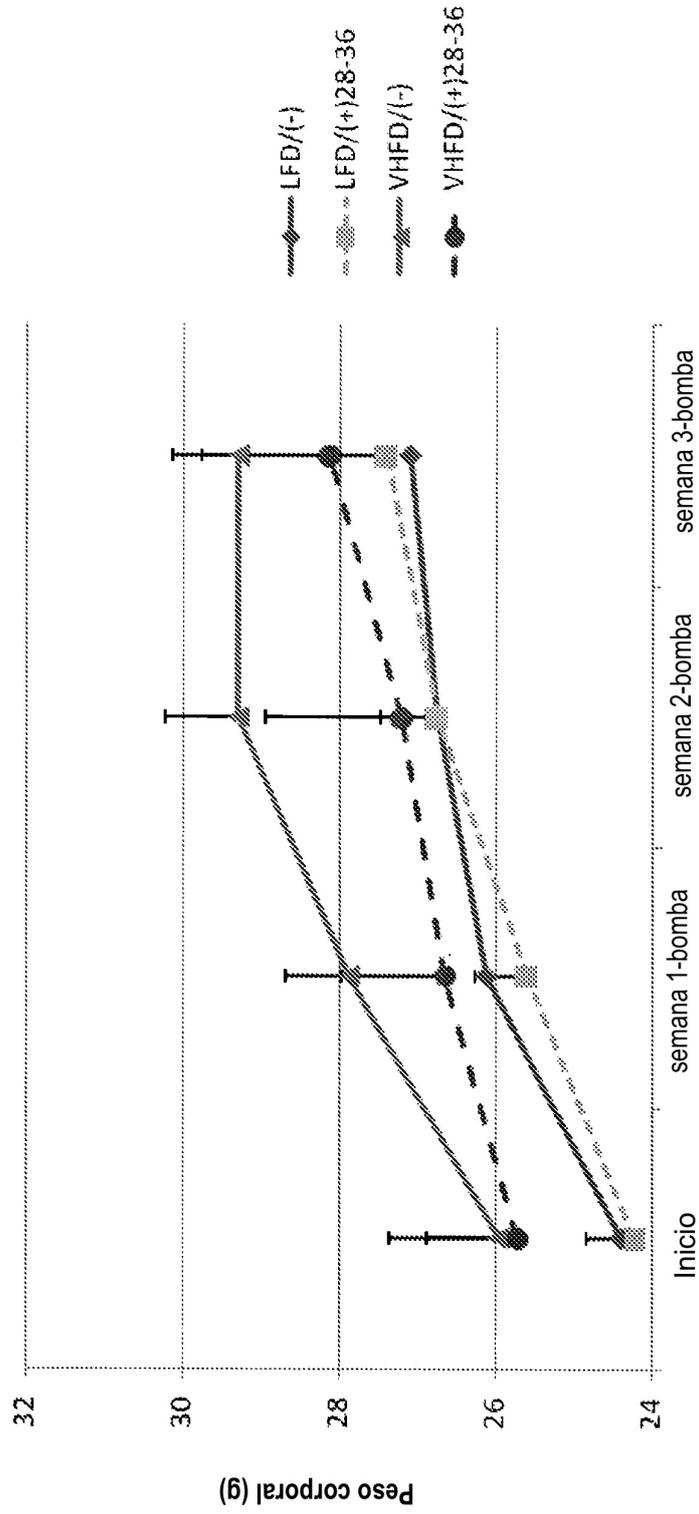


FIG. 3

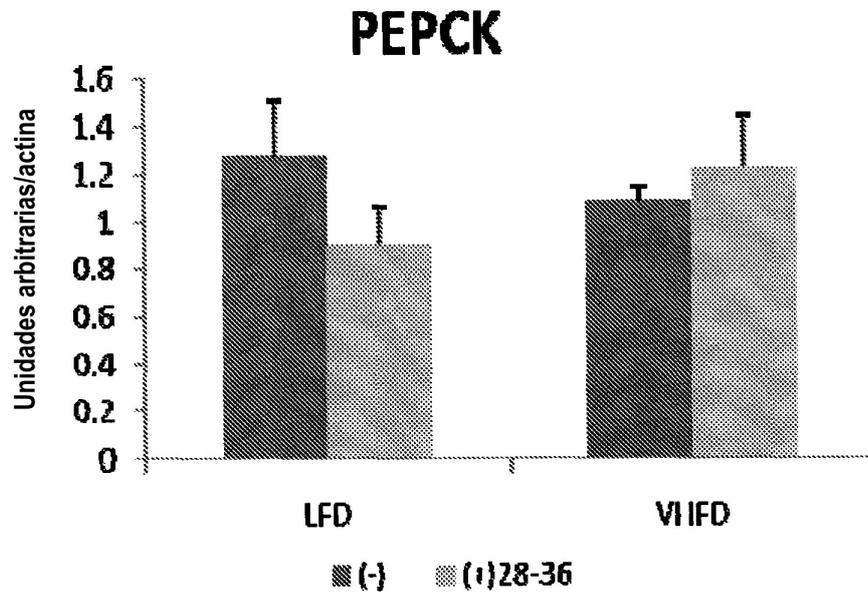


FIG. 4A

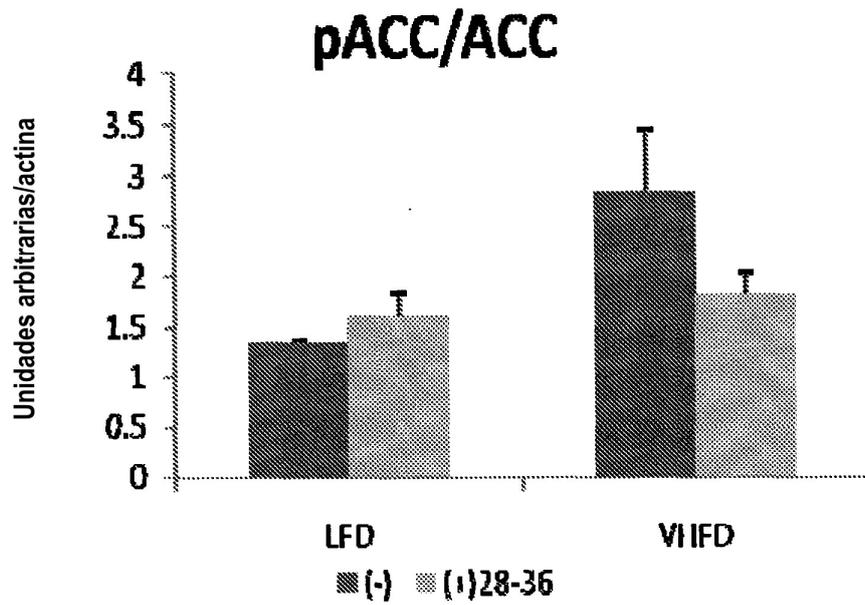


FIG. 4B

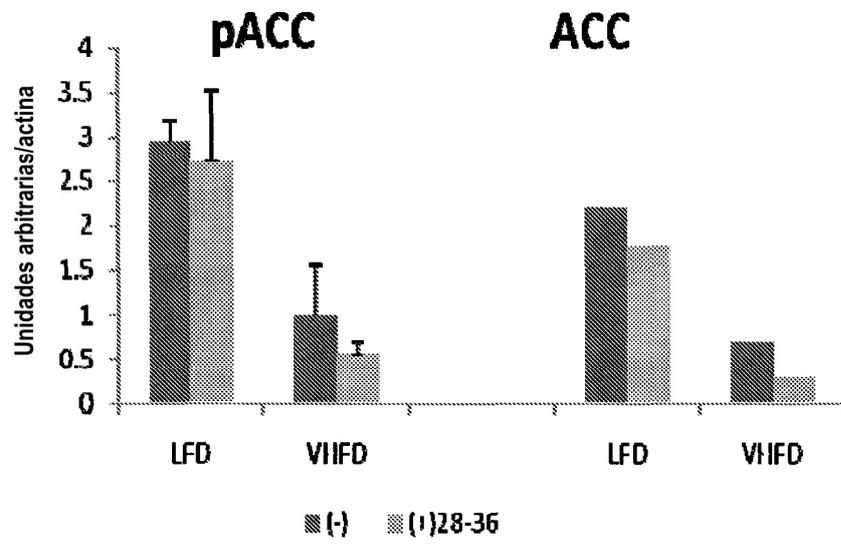


FIG. 4C

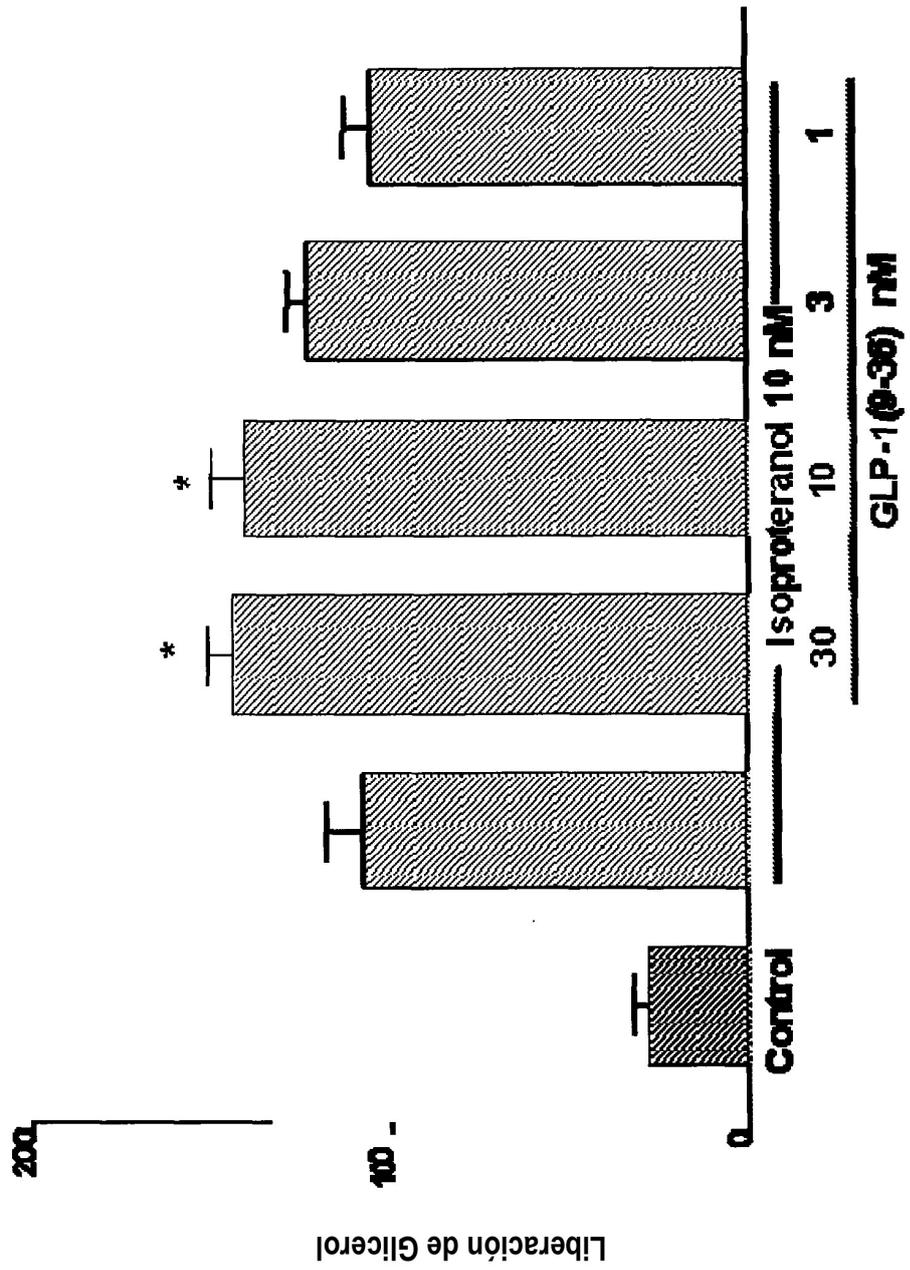


FIG. 5