(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 638 192**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2008** **PCT/EP2008/007338**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009** **WO09030499**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2008** **E 08785845 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2197478**

(54) Título: **Uso de análogos de glp-1 para el tratamiento de trastornos asociados con transmisión sináptica disfuncional**

(30) Prioridad:

07.09.2007 GB 0717399

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2017

(73) Titular/es:

UUTECH LIMITED (100.0%)
SCIENCE INNOVATION CENTRE UNIVERSITY OF ULSTER CROMORE ROAD
COLERAINE, COUNTY LONDONDERRY, GB

(72) Inventor/es:

FLATT, PETER RAYMOND;
HOLSCHER, CHRISTIAN y
GAULT, VICTOR, ALAN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 638 192 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

Uso de análogos de glp-1 para el tratamiento de trastornos asociados con transmisión sináptica disfuncional

Antecedentes

El péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) se deriva del producto de transcripción del gen del *proglucagón*, que en seres humanos se sabe que se expresa en el páncreas y el intestino delgado. La expresión de *proglucagón* en células α pancreáticas da como resultado el péptido glucagón de 29 aminoácidos, el péptido pancreático relacionado con el glucagón (GRPP), y el fragmento proglucagón fundamental. Sin embargo, en células endocrinas intestinales, se sintetizan péptido pancreático relacionado con el glucagón (GRPP), oxintomodulina, GLP-1 y GLP-2 a partir del gen del *proglucagón*. El péptido GLP-1 endógeno de 30 aminoácidos pertenece a la familia de hormonas de la incretina, y desempeña múltiples papeles en la homeostasis metabólica después de la absorción de nutrientes. La fuente fundamental de GLP-1 en el cuerpo es la célula L intestinal, que secreta GLP-1 como una hormona intestinal en respuesta a la ingestión de nutrientes. La secreción de GLP-1 por las células L depende de la presencia de nutrientes en la luz del intestino delgado. Los secretágogos de esta hormona incluyen nutrientes fundamentales tales como carbohidrato, proteína y lípido. Las formas biológicamente activas de GLP-1 son GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)amida. Las actividades biológicas de GLP-1 incluyen la inhibición de la secreción de glucagón a partir del páncreas, el vaciado gástrico y la inhibición de la ingesta de alimentos incrementando la saciedad. En particular, el GLP-1 tiene efectos moduladores sobre la liberación de insulina. La estimulación del receptor de GLP-1 intensifica la biosíntesis de insulina, la proliferación de células beta, la secreción de insulina dependiente de glucosa a partir del páncreas, y rebaja la glucemia en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 (Gault *y col*., 2003). El descubrimiento de que el GLP-1 rebaja la glucemia en pacientes con diabetes, tomado junto con sugerencias de que el GLP-1 puede restaurar la sensibilidad de células beta a secretágogos exógenos, sugiere que aumentar la señalización de GLP-1 es una estrategia útil para el tratamiento de pacientes diabéticos.

La neuroplasticidad es un proceso que implica la formación continua de nuevas conexiones neurales, y que se produce durante la (re-)organización del cerebro en respuesta a la actividad y la experiencia. La plasticidad sináptica dependiente de la actividad desempeña un papel vital en el modelado de conexiones sinápticas durante el desarrollo. Sin embargo, aunque se sabe bien que se produce durante el desarrollo, el proceso es también una característica central del cerebro adulto. La naturaleza plástica de las conexiones neuronales permite que el cerebro se desarrolle de forma continua en respuesta a la experiencia, y eluda la señalización neuronal deteriorada que se produce como consecuencia de traumatismo o daño a las neuronas.

Hay dos tipos de modificaciones que se cree que se producen en el cerebro durante este proceso: 1) cambios morfológicos de las propias neuronas, específicamente en el área de la sinapsis; y 2) un aumento del número de sinapsis entre neuronas. La eficiencia de la señalización sináptica a menudo depende de cualquiera (o ambas) de estas modificaciones. De hecho, está ampliamente aceptado que procesos tales como la formación de la memoria y la capacidad de aprendizaje dependen de alteraciones de la eficiencia sináptica que permiten un refuerzo de asociaciones entre neuronas. Además, se cree que la plasticidad sináptica en ciertas sinapsis es tanto necesaria como suficiente para el proceso de almacenar información en el cerebro.

La potenciación a largo plazo (LTP) se ha propuesto durante mucho tiempo como un modelo para el mecanismo mediante el cual puede conseguirse el refuerzo de las conexiones sinápticas. Se ha demostrado ampliamente que la estimulación de alta frecuencia puede causar un aumento sostenido de la eficiencia de la transmisión sináptica. Basándose en este descubrimiento, se cree que los cambios sinápticos que apuntalan al menos ciertas formas de aprendizaje y memoria son similares a aquellos cambios requeridos para la expresión de LTP.

Además, está ampliamente aceptado que la LTP deteriorada está asociada a menudo con el deterioro de la función cognitiva. A este respecto, desde hace ya unos años, los estudios han notificado déficits cognitivos en ratas de edad avanzada. En particular, se ha mostrado que las ratas de edad avanzada exhiben déficits en el procesamiento de la información espacial. Correlacionado con déficits en el rendimiento del aprendizaje espacial, había un déficit en LTP en la región CA1 del cerebro del roedor; donde animales con un deterioro grave no sostuvieron la LTP, mientras que se observó LTP sostenida en aquellos animales que estaban relativamente sin deterioro en el aprendizaje espacial.

Por lo tanto, los déficits cognitivos son una marca distintiva de una serie de trastornos neurológicos. Por ejemplo, los síntomas de deterioro de memoria asociado a la edad son, a menudo, similares a aquellos síntomas asociados con las fases tempranas de enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer. Claramente, un

objetivo fundamental en el campo de la neurociencia es sostener la LTP en circunstancias donde la LTP está alterada, bien por la edad, causas asociadas a una enfermedad, o por cualquier otro aspecto que dé como resultado transmisión sináptica deteriorada.

Sin embargo, hay cada vez más indicios de que las neuronas maduras también pueden poseer mecanismos para prevenir el refuerzo de sinapsis de entrada. Dicha regulación homeostática garantiza que una neurona funciona dentro de un rango de actividad óptima, un proceso que es integral para mantener la naturaleza altamente plástica del cerebro. Esto es evidente en el hipocampo, donde células piramidales de la región CA1 reciben, cada una, miles de entradas excitadoras con el potencial para intensificación dependiente de la actividad de la transmisión sináptica. En ausencia de un mecanismo para limitar el reforzamiento sináptico, el equilibrio fisiológico puede estar comprometido, dando como resultado que el proceso de LTP se detenga, y causando, en última instancia, una capacidad reducida de todo el circuito neuronal para almacenar información. Por lo tanto, el proceso de despotenciación también actúa como mediador crítico en la regulación de la homeostasis neuronal y garantizando el control coordinado de la fuerza de la transmisión sináptica. Actualmente se cree que la despotenciación desempeña un papel en la retirada de información redundante de la memoria. Por lo tanto, la despotenciación podría actuar como una potencial medida terapéutica en trastornos asociados con procesos cognitivos hiperactivos.

Es un objetivo de la presente invención prevenir, mejorar o invertir profilácticamente la función cognitiva disminuida asociada con estos tipos de trastornos, aumentando (o sosteniendo) la LTP de la transmisión sináptica. Además, sostener LTP puede resultar útil en la profilaxis de una enfermedad neurológica retardando la aparición de procesos cognitivos deteriorados, y podrían servir como un tratamiento, no solamente para la función cognitiva disminuida causada por la neurodegeneración, sino también para los procesos cognitivos disfuncionales asociados con traumatismo o la edad.

Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso en el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por la disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1, y una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; caracterizado porque la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en adición de L- o D-Glu, y/o adición de un ácido graso; y la sustitución de aminoácido en la posición 34 es L- o D-Arg.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por la disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1, y una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; caracterizado porque la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en adición de L- o D-Glu, y/o adición de un ácido graso; y la sustitución de aminoácido en la posición 34 es L- o D-Arg.

También se divulga el uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por, o asociados con, la disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1; y que comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 7, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 8, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 9, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; con la condición de que, si hay una única sustitución de aminoácido en la posición 8, entonces X_2 no es L-Ala o L-Gly.

También se divulga el uso de un análogo peptídico, comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo

peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1; y que comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 7, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 8, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 9, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; con la condición de que, si hay una única sustitución de aminoácido en la posición 8, entonces X no es L-Ala o L-Gly, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por, o asociados con, disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica.

También se divulga un procedimiento de tratamiento de trastornos neurológicos causados por, o asociados con, disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; donde el procedimiento comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente aceptable de un análogo peptídico, comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ NO: 1; y que comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 7, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 8, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 9, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; con la condición de que, si hay una única sustitución de aminoácido en la posición 8, entonces X no es L-Ala o L-Gly, a un sujeto que padece un trastorno neurológico causado por, o asociados con, potenciación a largo plazo disfuncional de la transmisión sináptica.

La secuencia de aminoácidos del análogo peptídico comprende al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1; y que comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34.

La sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 se selecciona independientemente de entre el grupo que comprende la adición de un aminoácido, y/o la adición de un radical acilo, opcionalmente un ácido graso. Además opcionalmente, el aminoácido es L- o D-Glu, y el ácido graso es un grupo palmitoílo de C-16.

La sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34 es L-o D-Arg.

Opcionalmente, el análogo peptídico es Arg(34)Lys(26)-(N-épsilon-(gamma-Glu)(N-alfa-hexadecanoil))GLP-1(7-37), también conocido como Liraglutida. La secuencia de aminoácidos de Liraglutida se deriva de la secuencia de aminoácidos básica, tal como se ilustra en la SEQ ID NO: 6.

Por el término "disfunción" se entiende cualquier alteración que da como resultado el funcionamiento anormal de un proceso, con lo que el proceso ya no sigue un patrón funcional convencional. El funcionamiento anormal del proceso implica LTP deteriorada, donde el tratamiento comprende intensificación de la LTP.

También se divulga un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde X_2 comprende un L- o D-aminoácido seleccionado de entre el grupo que incluye: Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.

También se divulga un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde X_2 comprende un L- o D-aminoácido hidrófobo. Más preferentemente, X_2 comprende un L- o D-aminoácido alifático. De la forma más preferente, X_2 comprende L- o D-Val. Opcionalmente, el análogo peptídico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 2; y comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 7, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 9.

También se divulga un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde X_1 se selecciona de

entre cualquier aminoácido de origen natural. Más preferentemente, X_1 comprende L- o D-Asp, tal como se ilustra en la SEQ ID NO: 3.

También se divulga un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde X_2 se selecciona de entre cualquier aminoácido de origen natural. Más preferentemente, X_2 comprende L- o D-Val, tal como se ilustra en la SEQ ID NO: 4.

También se divulga un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde X_3 se selecciona de entre cualquier aminoácido de origen natural. Más preferentemente, X_3 comprende L- o D-Pro, tal como se ilustra en la SEQ ID NO: 5.

Un fragmento del análogo peptídico puede comprender al menos 10 residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1; y comprende además una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 7, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 8, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 9, una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; con la condición de que, si hay una única sustitución de aminoácido en la posición 8, entonces X_2 no es L-Ala o L-Gly.

El análogo peptídico de GLP-1 es opcionalmente un análogo de GLP-1 humano.

Preferentemente, el análogo peptídico es resistente a la degradación por dipeptidil peptidasa IV (DPP IV).

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende además al menos una modificación de aminoácido, comprendiendo dicha al menos una sustitución o modificación de aminoácido que comprende la fijación de un resto polimérico de la fórmula general $\mathbf{HO\text{-}(CH_2\text{-}O\text{-}CH_2)_n\text{-}H}$, en la que n es un número entero entre 1 y aproximadamente 22.

Opcionalmente, el resto polimérico tiene un peso molecular promedio de no más de 1000 Da. Preferentemente, el resto polimérico tiene un peso molecular promedio de no menos de 1000 Da.

Preferentemente, n es un número entero entre 1 y aproximadamente 10. Más preferentemente, n es un número entero entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5.

Opcionalmente, el resto polimérico tiene una estructura ramificada. La estructura ramificada puede comprender la fijación de al menos dos restos poliméricos de estructura lineal. Como alternativa, el punto de ramificación puede estar ubicado dentro de la estructura de cada resto polimérico. Como alternativa, el resto polimérico tiene una estructura lineal.

Algunos o todos los monómeros del resto polimérico pueden estar asociados con moléculas de agua. La fijación del resto polimérico puede conseguirse mediante un enlace covalente. Opcionalmente, el enlace covalente es un enlace covalente estable. Como alternativa, el enlace covalente es reversible. El enlace covalente puede ser hidrolizable.

El o cada resto polimérico puede estar fijado adyacente al aminoácido N-terminal del análogo peptídico; adyacente al aminoácido C-terminal del análogo peptídico; o a un aminoácido de origen natural seleccionado de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina. Como alternativa, el análogo peptídico comprende además la sustitución de un aminoácido de origen natural con un aminoácido seleccionado de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina; estando el o cada resto polimérico fijado al o cada aminoácido sustituido. Opcionalmente, el o cada resto polimérico está fijado adyacente al aminoácido C-terminal. Más opcionalmente, el o cada resto polimérico está fijado al aminoácido C-terminal.

Opcionalmente, el o cada resto polimérico está fijado a un residuo de lisina. El o cada resto polimérico puede estar fijado a los grupos amino alfa o épsilon de lisina. El residuo de lisina puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en Lys(26) y Lys(34).

Tal como se usa en toda la memoria, el término "mini-PEG" (o "mPEG") pretende ser sinónimo con un polímero

fijado de polietilenglicol tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento en el que n es un número entero entre 1 y aproximadamente 22.

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende una modificación de aminoácido en la posición 7, donde la modificación de aminoácido es una acilación tal como, pero sin limitarse a, una acetilación. El análogo peptídico puede estar acilado (opcionalmente acetilado) adyacente al extremo N. Opcionalmente, el análogo peptídico está acilado (opcionalmente acetilado) en la alfa-amina N-terminal.

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende:

(a) glucosilación N-terminal y una sustitución de aminoácido en una, dos o todas de las posiciones 7, 8 y 9;
(b) sustitución y/o modificación de aminoácido en cada una de las posiciones 7, 8 y 9; y
(c) sustitución y/o modificación de aminoácido en una de las posiciones 7, 8 y 9; donde la sustitución o modificación de aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en:

(i) glucosilación en la posición 7, 8 o 9;
(ii) alquilación en la posición 7, 8 o 9;
(iii) acetilación en la posición 7, 8 o 9;
(iv) acilación en la posición 7, 8 o 9;
(v) la adición de un grupo isopropilo en la posición 7, 8 o 9;
(vi) la adición de un ácido piroglutámico en la posición 7, 8 o 9;
(vii) sustitución en la posición 7 por un D-aminoácido;
(viii) sustitución en la posición 7 por un L-aminoácido;
(ix) sustitución en la posición 8 por un L-aminoácido, con la condición de que, el L-aminoácido no sea L-Ala o L-Gly;
(vii) sustitución en la posición 9 por un D-aminoácido;
(x) sustitución en la posición 9 por un L-aminoácido;
(xi) sustitución en la posición 7, 8 o 9 por ácido aminoisobutírico o sarcosina;
(xii) sustitución en la posición 8 por un D-aminoácido;
(xiii) conversión del enlace Ala(8)-Glu(9) en un enlace ψ[CH_2NH];
(xiv) conversión del enlace Ala(8)-Glu(9) en un enlace isóstero estable;
(xv) sustitución en la posición 7, 8 o 9 por beta-alanina, un omega-aminoácido, ácido 3-aminopropiónico, ácido 4-aminobutírico, ornitina, citrulina, homoarginina, t-butilalanina, t-butilglicina, N-metilisoleucina, fenilglicina y ciclohexilalanina, norleucina, ácido cisteico y sulfóxido de metionina;

(d) modificación de aminoácido que comprende la fijación de un resto polimérico de la fórmula general HO-$(CH_2\text{-}O\text{-}CH_2)_n$-H; y
(e) modificación por adición de un radical acilo, opcionalmente adición de un ácido graso, en un grupo amino épsilon de un residuo de aminoácido.

También se divulga un análogo peptídico que consiste en 10 residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el análogo peptídico conserva la actividad biológica de GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)amida.

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende una modificación que comprende adición de al menos un radical acilo, opcionalmente una molécula de ácido graso, en un grupo amino de al menos un residuo de aminoácido. Opcionalmente, la o cada molécula de ácido graso está fijada a un residuo de lisina. La o cada molécula de ácido graso puede estar fijada a los grupos amino alfa o épsilon de lisina. El residuo de lisina puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en Lys(26) y Lys(34).

Opcionalmente, el ácido graso es un ácido graso saturado. Además opcionalmente, la modificación comprende la adición de un ácido graso seleccionado de entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, un grupo octanoílo de C-8, un grupo decanoílo de C-10, un grupo lauroílo de C-12, un grupo miristoílo de C-14, un grupo palmitoílo de C-16, un grupo estearoílo de C-18 o un grupo acilo de C-20.

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende un aminoácido N-glucosilado en la posición 7. Además opcionalmente, el análogo peptídico comprende un residuo His N-glucosilado en la posición 7.

Opcionalmente, el análogo peptídico comprende un aminoácido N-alquilado en la posición 7. Además opcionalmente, el análogo peptídico comprende la adición de un grupo isopropilo N-terminal en la posición 7. Además opcionalmente, el análogo peptídico comprende la adición de un ácido piroglutámico N-terminal en la posición 7. Además opcionalmente, el análogo peptídico comprende además una modificación mediante adición de ácido graso en un grupo amino épsilon de al menos un residuo de lisina, y una sustitución o modificación de aminoácido en una, dos o todas de las posiciones 7, 8 y 9.

Opcionalmente, la sustitución de aminoácidos en la posición 7 da como resultado un residuo de Asp. Opcionalmente, la sustitución de aminoácidos en la posición 8 da como resultado un residuo de Val. Opcionalmente, la sustitución de aminoácidos en la posición 9 da como resultado un residuo de Pro.

El análogo peptídico comprende además una modificación que comprende adición de al menos un aminoácido en un grupo amino de al menos un residuo de aminoácido. Preferentemente, el aminoácido añadido es un Glu. Opcionalmente, el o cada aminoácido está fijado a un residuo de lisina. El o cada aminoácido puede estar fijado a los grupos amino alfa o épsilon de lisina. El residuo de lisina puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en Lys(26) y Lys(34).

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención, se proporciona el uso de Liraglutida para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por, o asociados con, disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, se entiende que esta invención no está limitada a los procedimientos específicos, regímenes de tratamiento o procedimientos particulares, que, como tales, pueden variar. Además, la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante.

Tal como se usa en toda la memoria, el término "péptido similar al glucagón de tipo 1" (o "GLP-1") pretende ser sinónimo de GLP-1 de longitud completa, GLP-1(7-36) y GLP-1(7-36)amida. Preferentemente, el término se refiere a GLP-1 humano.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento de forma sinónima con el término péptido.

Por el término "sujeto", se entiende un individuo. Preferentemente, el sujeto es un mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Para los fines de esta memoria descriptiva, se entiende que la posición 7 se refiere al aminoácido N-terminal del análogo peptídico, y que las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento son sinónimas con las posiciones de aminoácidos tal como se ilustran en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán realizaciones, a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 ilustra las secuencias polipeptídicas de GLP-1(7-36) humano (SEQ ID NO: 1), y análogos peptídicos de GLP-1 (SEQ ID NO: 2-5);
La figura 2 ilustra el efecto de beta-amiloide(25-35) sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 3A ilustra el efecto de GLP-1 sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 3B ilustra el efecto de Val(8)GLP-1 sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 4A ilustra el efecto de coadministrar Val(8)GLP-1 y beta-amiloide(25-35) sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 4B ilustra el efecto de administrar Val(8)GLP-1 15 minutos antes de beta-amiloide(25-35) sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 4C ilustra el efecto de administrar Val(8)GLP-1 30 minutos antes de beta-amiloide(25-35) sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 5 ilustra el efecto de Asp(7)GLP-1 sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 6 ilustra el efecto de GLP-1 [N-glucosilado] sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica;
La figura 7 ilustra el efecto de Pro(9)GLP-1 sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; y

La figura 8 ilustra el efecto de Liraglutida sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica.

Materiales y métodos

Cirugía y protocolos de inducción de LTP

Se anestesiaron ratas Wistar macho que pesaban 220-280 g con uretano (carbamato de etilo, 1,8 g/kg, intraperitoneal, (i.p.)) durante la duración de todos los experimentos. Los animales habían sido obtenidos de Harlan, Reino Unido (RU). Una cánula (calibre 22, 0,7 mm de diámetro externo, 11 mm de longitud, Bilaney, Kent, RU) se implantó (1,5 mm anterior al bregma, 0,5 mm lateral a la línea media y 3,55 mm ventral) en el hemisferio izquierdo para inyecciones intracerebroventriculares (icv). Se implantaron electrodos (tungsteno con revestimiento de Teflon®, Bilaney, Kent, RU) de forma unilateral 3,4 mm posterior y 2,5 mm lateral a la línea media, y el electrodo de estimulación 4,2 mm posterior al bregma y 3,8 mm lateral a la línea media. Los electrodos se hicieron descender lentamente a través de la corteza y las capas superiores del hipocampo y al interior de la región CA1 hasta la aparición de un potencial postsináptico excitador (EPSP) de desviación negativa que tenía una latencia de aprox. 10 ms. Se realizaron registros de EPSP a partir del estrato radiado en la región CA1 del hemisferio derecho del hipocampo en respuesta a estimulación de la ruta colateral/comisural de Schaffer. Se registraron EPSP de campo en una unidad de estimulación y registro computarizada (PowerLab, ADI instruments, RU) en el que el umbral de disparo era ajustable. La unidad disparada activó una unidad de aislamiento de estímulo a corriente constante (Neurolog, RU). El sistema de adquisición de datos se disparó simultáneamente para registrar todos los acontecimientos. La velocidad de muestreo era a 20 kHz de registro de EPSP.

El protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS) 'fuerte' para inducir potenciación a largo plazo (LTP) consistía en 3 trenes de 200 estímulos, intervalo inter-estímulo 5 ms (200 Hz), intervalo inter-tren 2 s. Se ha mostrado que esta HFS estándar induce LTP máxima en estas condiciones de registro (Hölscher *y col*., 1997). El protocolo de HFS 'débil' para inducir LTP consistía en 10 trenes de 10 estímulos, intervalo inter-estímulo 5 ms (200 Hz). El HFS fuerte se usó para ensayar los efectos de péptidos que deterioran la LTP (beta-amiloide), y el HFS débil se usó para ensayar péptidos que facilitan la LTP. En esta forma de LTP, el grupo de control no es potenciado a una velocidad máxima, y la LTP puede decaer lentamente a lo largo del tiempo. La intensidad de estimulación fue del 70 % del EPSP máximo. La LTP se midió como el % de la pendiente de EPSP inicial registrada durante un periodo de 30 minutos antes de la inyección del fármaco y 60 minutos antes de la aplicación de HFS. Se registró el valor inicial durante 30 minutos y se promedió. Este valor se tomó como el 100 % de la pendiente de EPSP y todos los valores registrados se normalizaron respecto a este valor inicial. Todos los experimentos contaban con licencia de acuerdo con las normativas del Ministerio del Interior del RU, y se siguieron los "Principles of laboratory animal care" (publicación NIH No. 86-23, revisada en 1985).

Péptidos

El beta-amiloide (25-35) y otros péptidos usados en este estudio se sintetizaron en un sintetizador de péptidos automatizado de Applied Biosystems (Modelo 432A) usando protocolos Fmoc en fase sólida estándar. Los péptidos se consideraron puros mediante HPLC de fase inversa en un sistema de cromatografía Millenium 2010 de Waters, y los péptidos se caracterizaron posteriormente usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) tal como se ha descrito anteriormente (Gengler *y col*,. 2006; Holscher *y col*., 2007). Los péptidos se almacenaron en forma seca y se disolvieron en agua destilada doble antes de los experimentos. Se inyectaron icv 5 µl de solución de péptidos.

Estadísticas

Cada grupo consistía en 6 animales. Los datos se analizaron usando una ANOVA de dos vías de medidas repetidas, o una ANOVA de dos vías de tres niveles de medidas repetidas con ensayos post-hoc para discriminar entre grupos (PRISM, GraphPad software Inc; Estados Unidos).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se describen en el presente documento para proporcionar a los expertos en la materia una completa divulgación y descripción de la invención, y pretenden ser puramente ejemplares de la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Secuencia peptídica

Las secuencias de aminoácidos de GLP-1 humano, y análogos del mismo, se dan en la figura 1. Los aminoácidos se numeran a continuación.

La SEQ ID NO: 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano;
La SEQ ID NO: 2 ilustra la secuencia de aminoácidos de un análogo de GLP-1 humano, que está modificada por una sustitución de aminoácido en la posición 7 (indicada mediante X_1), posición 8 (indicada mediante X_2), y/o posición 9 (indicada mediante X3);
La SEQ ID NO: 3 ilustra la secuencia de aminoácidos del análogo Asp(7)GLP-1;
La SEQ ID NO: 4 ilustra la secuencia de aminoácidos del análogo Val(8)GLP-1;
La SEQ ID NO: 5 ilustra la secuencia de aminoácidos del análogo Pro(9)GLP-1; y
La SEQ ID NO: 6 ilustra la secuencia de aminoácidos del análogo Liraglutida.

Ejemplo 2. Efectos *in vivo* del tratamiento con beta-amiloide(25-35)

A ratas Wistar macho se les inyectó por vía intracerebroventricular (icv) una versión de secuencia peptídica desordenada inactiva de beta-amiloide (βA)(25-35) (Control,) 10 nmoles (O) o 100 nmoles (◆) βA(25-35). La LTP se indujo 15 min post-inyección usando la HFS (protocolo fuerte), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP (figura 2). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de tres niveles descubrió una diferencia global entre grupos ($DF_{2,16}$; F=6,2, p<0,001) y tiempo ($DF_{2,119}$; F=1,9; p<0,01). La interacción entre factores no fue significativa. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de 100 nmoles y el control ($DF_{1,10;}$ F= 16,1; p<0,005) y a lo largo del tiempo $DF_{1,119}$; F= 1,5; p<0,001). La interacción entre factores no fue significativa. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de 10 nmoles y el control ($DF_{1,10;}$ F= 9,1; p<0,01) y a lo largo del tiempo $DF_{1,119}$; F= 1,38; p<0,005). La interacción entre factores no fue significativa. No había ninguna diferencia entre el grupo de 10 nmoles y el de 100 nmoles. N=6 por grupo. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-HFS y 1 h post-HFS. Estos EPSP son ejemplos para demostrar la calidad del registro. Tal como se muestra, los EPSP cambiaron claramente después de la estimulación y son de alta calidad con muy poco ruido. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV vertical. Todos los grupos n=6.

Estos resultados demuestran los efectos perjudiciales de βA(25-35) sobre la LTP. Los mecanismos subyacentes de este deterioro incluyen el cambio de la actividad del canal de K+, la reducción de la actividad del canal de calcio dependiente del voltaje (VDCC), y un flujo de entrada de Ca2+, que, a su vez, afecta a la actividad enzimática sensible a Ca2+, y reduce la liberación de vesículas. Curiosamente, estudios previos han mostrado que la liberación de beta-amiloide está afectada y reducida por GLP-1.

Ejemplo 3. Efectos *in vivo* del tratamiento con GLP-1(7-36)amida, GLP-1(9-36)amida y Val(8)GLP-1

La hormona natural GLP-1(7-36)amida se inyectó (15 nmoles en 5 µl icv.) para ensayar los efectos sobre la LTP usando un protocolo de estimulación débil (figura 3A). Además, una forma inactiva de GLP-1, GLP-1(9-36)amida, se había inyectado como control (15 nmoles en 5 µl icv.). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de tres niveles descubrió una diferencia global entre grupos ($DF_{2,16}$; F=7,4, p<0,001) y tiempo ($DF_{2,119}$; F=3,6; p<0,001). La interacción entre factores no fue significativa. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de GLP-1(7-36)amida y el control ($DF_{1,10;}$ F= 12,1; p<0,01) y a lo largo del tiempo $DF_{1,119}$; F= 1,6; p<0,001). La interacción entre factores no fue significativa. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de GLP-1(7-36)amida y el grupo de GLP-1(9-36)amida ($DF_{1,10;}$ F= 12,1; p<0,01) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F= 1,7; p<0,001). La interacción entre factores no fue significativa. No había ninguna diferencia entre el grupo de GLP-1(9-36)amida y el grupo de control. Todos los grupos n=6.

A ratas Wistar macho se les inyectó icv bien vehículo (Control,) o bien 15 nmoles de Val(8)GLP-1 (◆). La LTP se indujo 30 min post-inyección usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP (figura 3B). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de Val(8)GLP-1 y el control ($DF_{1,10;}$ F= 17,1; p<0,003) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F= 1,8; p<0,006). La interacción entre factores no fue significativa. Todos los grupos n=6. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-tétanos y 1 h post-tétanos. Estos EPSP son ejemplos para demostrar la calidad del registro. Tal como se muestra, los EPSP cambiaron claramente después de la estimulación

y son de alta calidad con muy poco ruido. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV vertical.

Estos resultados muestran por primera vez que Val (8) GLP-1 tiene efectos moduladores directos y agudos sobre la transmisión sináptica y puede intensificar la inducción de LTP. Este efecto es diferente de los efectos observados después de la activación del receptor de crecimiento, que tienen una evolución temporal mucho más larga. Por lo tanto, se interpretan los resultados que los efectos rápidos sobre LTP pueden ser disparados por la activación de receptores de GLP-1 en las neuronas, de la forma más probable en el sitio pre-sináptico donde podrían modular directamente la liberación de vesículas. Sin estar ligados por la teoría, se postula que el mecanismo por el que GLP-1 aumenta la liberación de insulina en el páncreas es similar a los efectos sobre la LTP y la transmisión sináptica observados en el presente estudio en el cerebro.

Ejemplo 4. Efecto *in vivo* del tratamiento con Val(8)GLP-1 y beta-amiloide(25-35)

A ratas Wistar macho se les inyectó icv vehículo (Control,), 100 nmoles de βA(25-35) (◆), o una combinación de 15 nmoles de Val(8)GLP-1 y 100 nmoles de βA(25-35) (O). βA(25-35) y Val(8)GLP-1 se inyectaron simultáneamente, y la LTP se indujo 15 minutos post-inyección de βA(25-35) usando el HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en la LTP (figura 4A). Dado que este experimento era para ensayar si Val(8)GLP-1 puede prevenir el deterioro inducido por ßA de la LTP, se usó un protocolo de HFS fuerte para obtener LTP máxima. Por lo tanto, Val(8)GLP-1 no se ensayó por sí mismo en este protocolo, dado que la LTP ya estaba inducida al máximo nivel y no podía intensificarse más mediante Val(8)GLP-1. Se ha ensayado Val(8)GLP-1 por sí mismo usando un protocolo de HFS débil, lo que mostró una intensificación de la LTP (véase el ejemplo 3). Cuando se inyecta Val(8)GLP-1 (15 nmoles in 5 µl icv) simultáneamente con beta-amiloide(25-35) (100 nmoles en 5 µl icv), el efecto de deterioro de beta-amiloide sobre la LTP no resultó afectado. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de tres niveles descubrió una diferencia global entre grupos ($DF_{2,16}$; F=3,9, p<0,0001) y a lo largo del tiempo ($DF_{2,119}$; F=16,5; p<0,001). La interacción también fue significativa ($DF_{2,240;}$ F=1,8; p<0,001). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de beta-amiloide(25-35) y el control ($DF_{1,10;}$ F= 17,1; p<0,001) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F= 4,5; p<0,001). No se descubrió ninguna diferencia entre el grupo de combinación y el grupo de beta-amiloide(25-35). Todos los grupos n=6.

Se inyectó βA(25-35) 15 minutos después de Val(8)GLP-1, y la LTP se indujo 15 minutos post-inyección de βA(25-35) usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en la LTP (figura 4B). Cuando se inyecta Val(8)GLP-1 (15 nmoles in 5 µl icv) 15 minutos antes de beta-amiloide(25-35) (100 nmoles en 5 µl icv), el efecto de deterioro de beta-amiloide sobre la LTP no resultó significativamente afectado, pero una tendencia se hizo visible. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de tres niveles descubrió una diferencia global entre grupos ($DF_{2,16}$; F=6, p<0,01) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F=5,7; p<0,001). La interacción también fue significativa ($DF_{1,238;}$ F=1,3; p<0,001). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de beta-amiloide(25-35) y el control ($DF_{1,10;}$ F= 11,3; p<0,01) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F= 5,7; p<0,0001). No se descubrió ninguna diferencia entre el grupo de combinación y el grupo de beta-amiloide(25-35). Todos los grupos n=6.

Se inyectó βA(25-35) 30 minutos después de Val(8)GLP-1, y la LTP se indujo 15 minutos post-inyección de βA(25-35) usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en la LTP (figura 4C). Cuando se inyecta Val(8)GLP-1 (15 nmoles in 5 µl icv) 30 minutos antes de beta-amiloide(25-35) (100 nmoles en 5 µl icv), el efecto de deterioro de beta-amiloide sobre la LTP se invirtió completamente. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de tres niveles descubrió una diferencia global entre grupos ($DF_{2,16}$; F=9,8, p<0,001) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F=3,8; p<0,001). Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías de dos niveles mostró una diferencia entre el grupo de beta-amiloide(25-35) y el control ($DF_{1,10;}$ F= 18; p<0,001) y a lo largo del tiempo ($DF_{1,119}$; F= 1,8; p<0,001). No se descubrió ninguna diferencia entre el grupo de control y el grupo de combinación de fármacos. Todos los grupos n=6.

Ejemplo 5. Efectos *in vivo* del tratamiento con el análogo de GLP-1, Asp(7)GLP-1

A ratas Wistar macho se les inyectó icv bien vehículo (Control,) o bien 15 nmoles de *D*-Asp(7)GLP-1 (◆). La LTP se indujo 30 min post-inyección usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró una diferencia entre el grupo del fármaco y el control (p<0,001). Todos los grupos n=6. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-tétanos y 1 h post-tétanos. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV

vertical.

La inyección (icv) de 15 nmoles de Asp(7)GLP-1 intensificó la potenciación a largo plazo (LTP) en comparación con el control. Estos resultados demuestran que Asp(7)GLP-1 tiene efectos moduladores directos y agudos sobre la transmisión sináptica y puede intensificar la inducción de LTP.

Ejemplo 6. Efectos *in vivo* del tratamiento con el análogo de GLP-1, [Nglyc]GLP-1

A ratas Wistar macho se les inyectó icv bien vehículo (Control,) o bien 15 nmoles de *D*-Nglyc-GLP-1 (◆). La LTP se indujo 30 min post-inyección usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró una diferencia entre el grupo del fármaco y el control ($p<0,01$). Todos los grupos n=6. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-tétanos y 1 h post-tétanos. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV vertical.

La inyección (icv) de 15 nmoles de GLP-1 N-glucosilado intensificó la potenciación a largo plazo (LTP) en comparación con el control. Estos resultados demuestran que [Nglyc]GLP-1 tiene efectos moduladores directos y agudos sobre la transmisión sináptica y puede intensificar la inducción de LTP.

Ejemplo 7. Efectos *in vivo* del tratamiento con Pro(9)GLP-1

A ratas Wistar macho se les inyectó icv bien vehículo (Control,) o bien 15 nmoles de Pro(9)GLP-1 (◆). La LTP se indujo 30 min post-inyección usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró una diferencia entre el grupo del fármaco y el control ($p<0,001$). Todos los grupos n=6. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-tétanos y 1 h post-tétanos. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV vertical.

La inyección (icv) de 15 nmoles de Pro(9)GLP-1 intensificó la potenciación a largo plazo (LTP) en comparación con el control. Estos resultados demuestran que Pro(9)GLP-1 tiene efectos moduladores directos y agudos sobre la transmisión sináptica y puede intensificar la inducción de LTP.

Ejemplo 8. Efectos *in vivo* del tratamiento con el derivado de GLP-1, Liraglutida

A ratas Wistar macho se les inyectó icv bien vehículo (Control,) o bien 15 nmoles de Liraglutida (◆). La LTP se indujo 30 min post-inyección usando la HFS (protocolo débil), y el cambio de EPSP se valoró y se plasmó gráficamente para representar el cambio en LTP. Una ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró una diferencia entre el grupo del fármaco y el control ($p<0,005$). Todos los grupos n=6. Los EPSP promediados se muestran registradas 5 minutos pre-tétanos y 1 h post-tétanos. Las barras de calibración son 10 ms horizontal, 1 mV vertical.

La inyección (icv) de 15 nmoles del derivado de GLP-1, Liraglutida, intensificó la potenciación a largo plazo (LTP) en comparación con el control. Estos resultados demuestran que Liraglutida tiene efectos moduladores directos y agudos sobre la transmisión sináptica y puede intensificar la inducción de LTP.

Los resultados del presente estudio también muestran que los efectos facilitadores de GLP-1 y análogos del mismo, sobre la plasticidad sináptica pueden prevenir los efectos perjudiciales que los fragmentos βA(25-35) tienen sobre la LTP. El hecho de que Val (8) GLP-1 tenga que ser aplicado antes de beta-amiloide hace que sea poco probable que ambos compuestos actúen en los mismos sitios de unión sobre las neuronas. En cambio, parece que la activación de los receptores de GLP-1 dispara mecanismos que preparan a las sinapsis para una LTP aumentada y previenen o contrarrestan los efectos que el beta-amiloide tiene sobre la plasticidad sináptica mediante la alteración de VDCC y otra actividad de canal iónico. Val (8) GLP-1 podría elevar los niveles de AMPc en las neuronas de una manera similar a como aumenta los niveles de AMPc en las células beta pancreáticas. El aumento de AMPc inducido por Val (8) GLP-1 podría intensificar entonces la liberación de vesículas de esta manera y hacer a la actividad sináptica menos dependiente de la actividad de VDCC, que se ve afectada por la beta-amiloide. La actividad VDCC sería necesaria ordinariamente para intensificar los niveles de AMPc a través de nucleótido ciclasas sensibles Ca^{2+}, y esta etapa podría ser evitada por la acción de Val (8) GLP-1. Dado que el la activación aumentada de forma crónica de los canales de Ca^{2+} causa procesos neurotóxicos tales como el aumento de la producción de radicales libres, la

observación de que la activación del receptor de GLP-1 previene los efectos de la beta-amiloide sostiene la gran promesa de que los primeros efectos degenerativos de beta-amiloide pueden reducirse, y los procesos aguas abajo que causan la neurodegeneración pueden prevenirse. Además, los efectos similares al factor de crecimiento que el GLP-1 tiene sobre las neuronas mediante el aumento de la proliferación dendrítica y la regeneración neuronal podría ayudar a prevenir o reducir el daño a largo plazo inducida por la actividad de beta-amiloide y la gliosis inducida por placas. Estas propiedades de GLP-1 y análogos del mismo, sugieren que el tratamiento de pacientes con AD con análogos de de GLP-1 estables podría ser un tratamiento profiláctico eficaz de la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, las propiedades de análogos de GLP-1 descritos en el presente documento, sugieren que el tratamiento de sujetos con agonistas de GLP-1 estables podría ser un tratamiento profiláctico eficaz de trastornos neurológicos causados por, o asociados con, LTP deteriorada.

Lista de secuencias

Se observa que las posiciones de aminoácidos, tal como se ilustran en esta lista de secuencias han sido aplicadas automáticamente por PatentIn, que esa posición 7 se refiere al aminoácido N-terminal del análogo peptídico, y que las posiciones de los aminoácidos descritas en la descripción son sinónimos de las posiciones de aminoácidos tal como se ilustran en los dibujos adjuntos, y no de las posiciones de aminoácidos tal como se ilustran en esta lista de secuencias.

<110> UUTech Limited

<120> Uso de análogos de glp-1 para el tratamiento de trastornos asociados con

<130> P86201PC00

<150> GB 0717399.0
<151> 2007-09-07

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
            20                  25                  30
```

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Análogo peptídico derivado de GLP-1 humano

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

```
Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
            20                  25                  30
```

<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Análogo peptídico derivado de GLP-1 humano

<400> 3

```
Asp Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
            20                  25                  30
```

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Análogo peptídico derivado de GLP-1 humano

<400> 4

```
His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
            20                  25                  30
```

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Análogo peptídico derivado de GLP-1 humano

<400> 5

His Ala Pro Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Análogo peptídico derivado de GLP-1 humano

<400> 6

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso en el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por la disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1, y una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; **caracterizado porque** la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en adición de L- o D-Glu, y/o adición de un ácido graso; y la sustitución de aminoácido en la posición 34 es L- o D-Arg.

2. Uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos causados por la disfunción de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica; comprendiendo la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico al menos los 10 primeros aminoácidos desde el extremo N-terminal de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1, y una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26, y una sustitución o modificación de aminoácido en la posición 34; **caracterizado porque** la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en adición de L- o D-Glu, y/o adición de un ácido graso; y la sustitución de aminoácido en la posición 34 es L- o D-Arg.

3. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con la reivindicación 2, donde la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 es adición de L- o D-Glu.

4. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con la reivindicación 2, donde la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 es adición de un ácido graso palmitoílo de C-16.

5. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con la reivindicación 2, donde la sustitución o modificación de aminoácido en la posición 26 es adición de L- o D-Glu y adición de un ácido graso palmitoílo de C-16.

6. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con la reivindicación 2, donde el análogo peptídico es Arg(34)Lys(26)-(N-épsilon-(gamma-Glu)(N-alfa-hexadecanoil))GLP-1(7-37).

7. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el análogo peptídico comprende además al menos una modificación de aminoácido que comprende la fijación de un resto polimérico de la fórmula general HO-$\mathbf{(CH_2\text{-}O\text{-}CH_2)_n\text{-}H}$, en la que n es un número entero entre 1 y 22.

8. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el análogo peptídico comprende una acetilación en la alfa-amina N-terminal del aminoácido en la posición 7.

9. Un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o uso de un análogo peptídico del péptido similar al glucagón de tipo 1 (7-36) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el análogo peptídico comprende un aminoácido N-glucosilado en la posición 7.

SEQ ID NO: 1

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

7 8 9 17 27 36

SEQ ID NO: 2

$X_1X_2X_3$GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

7 8 9 17 27 36

SEQ ID NO: 3

DAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

7 8 9 17 27 36

SEQ ID NO: 4

HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

7 8 9 17 27 36

SEQ ID NO: 5

HAPGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

7 8 9 17 27 36

SEQ ID NO: 6

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

7 8 9 17 27 37

Figura 1

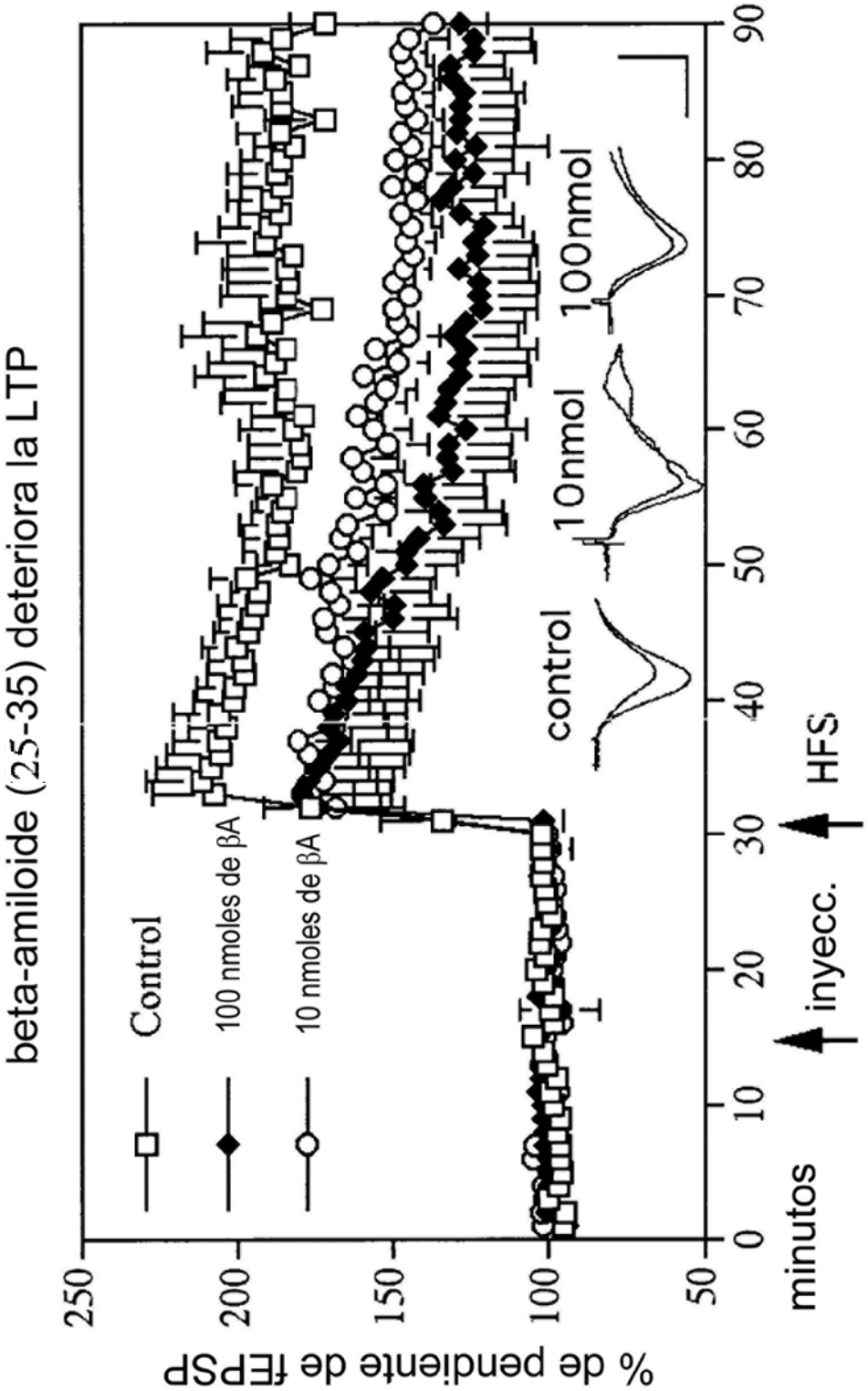
beta-amiloide (25-35) deteriora la LTP
Control
100 nmoles de βA
10 nmoles de βA
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
minutos
inyecc.
HFS
control
10nmol
100nmol

Figura 2

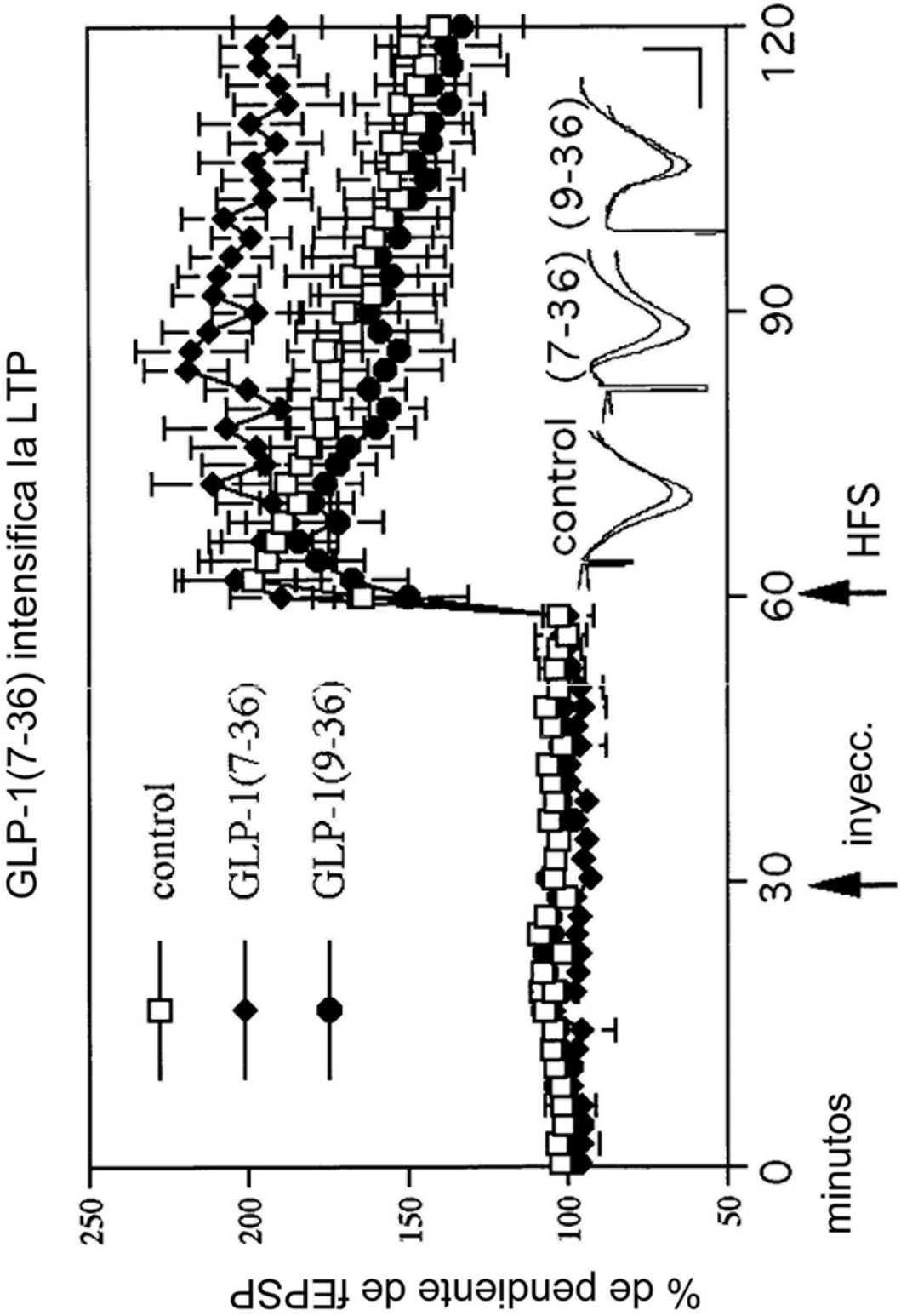
GLP-1(7-36) intensifica la LTP
control
GLP-1(7-36)
GLP-1(9-36)
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
minutos
inyecc.
HFS
control
(7-36)
(9-36)

Figura 3A

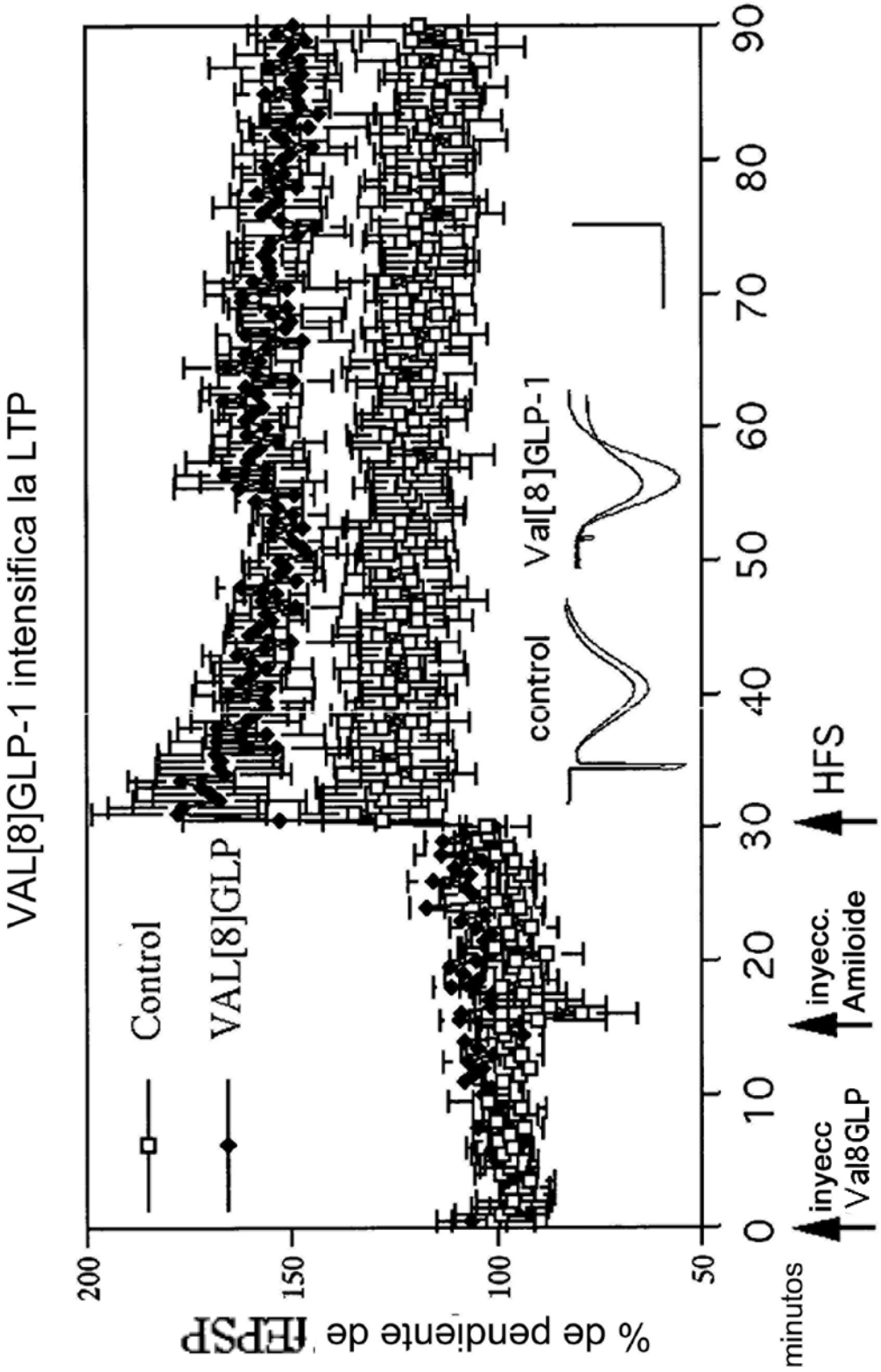
VAL[8]GLP-1 intensifica la LTP
Control
VAL[8]GLP
% de pendiente de fEPSP
200
150
100
50
minutos
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
inyecc Val8GLP
inyecc. Amiloide
HFS
control
Val[8]GLP-1

Figura 3B

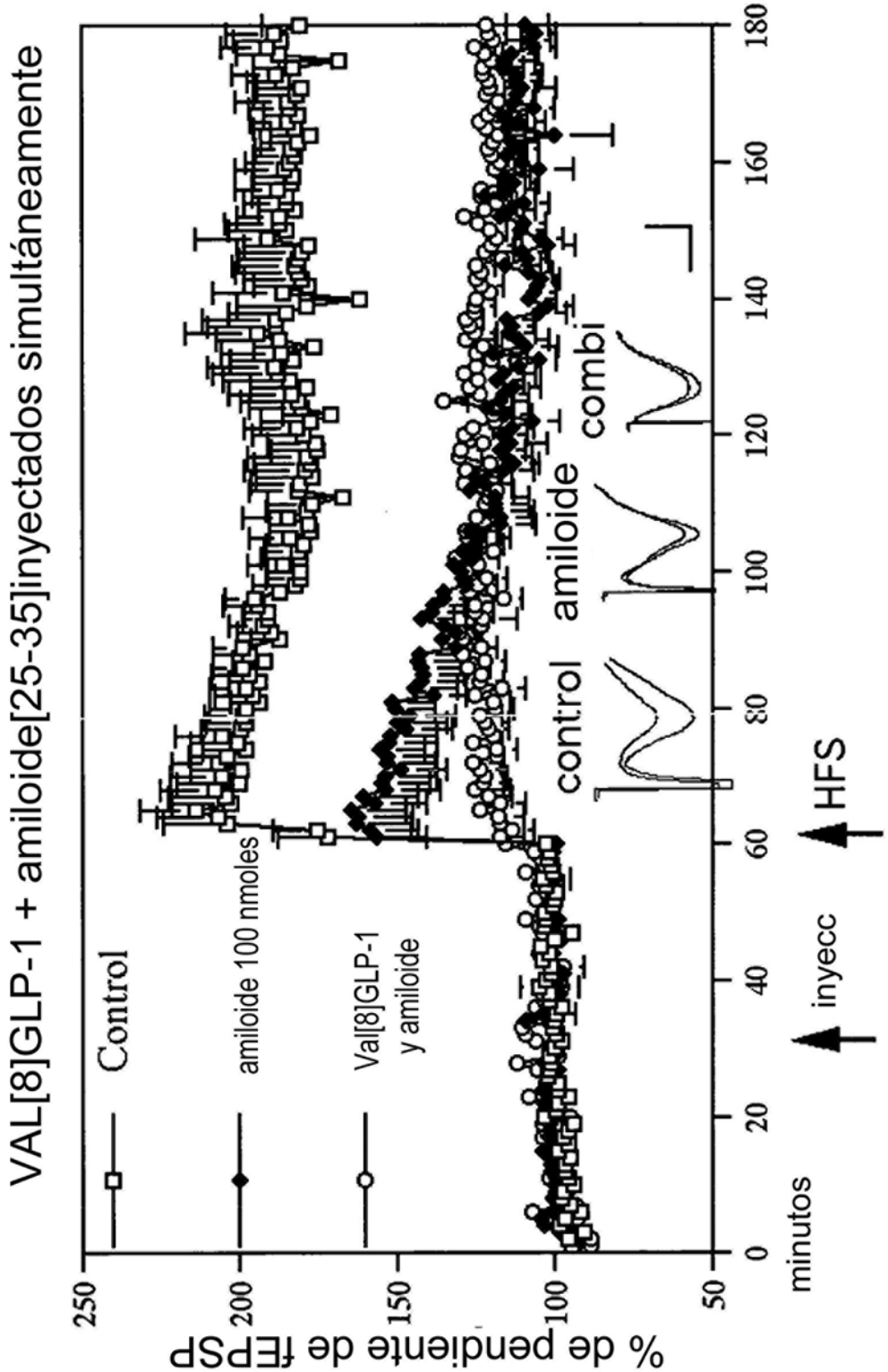
VAL[8]GLP-1 + amiloide[25-35]inyectados simultáneamente
Control
amiloide 100 nmoles
Val[8]GLP-1
y amiloide
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
minutos
inyecc
HFS
control
amiloide
combi

Figura 4A

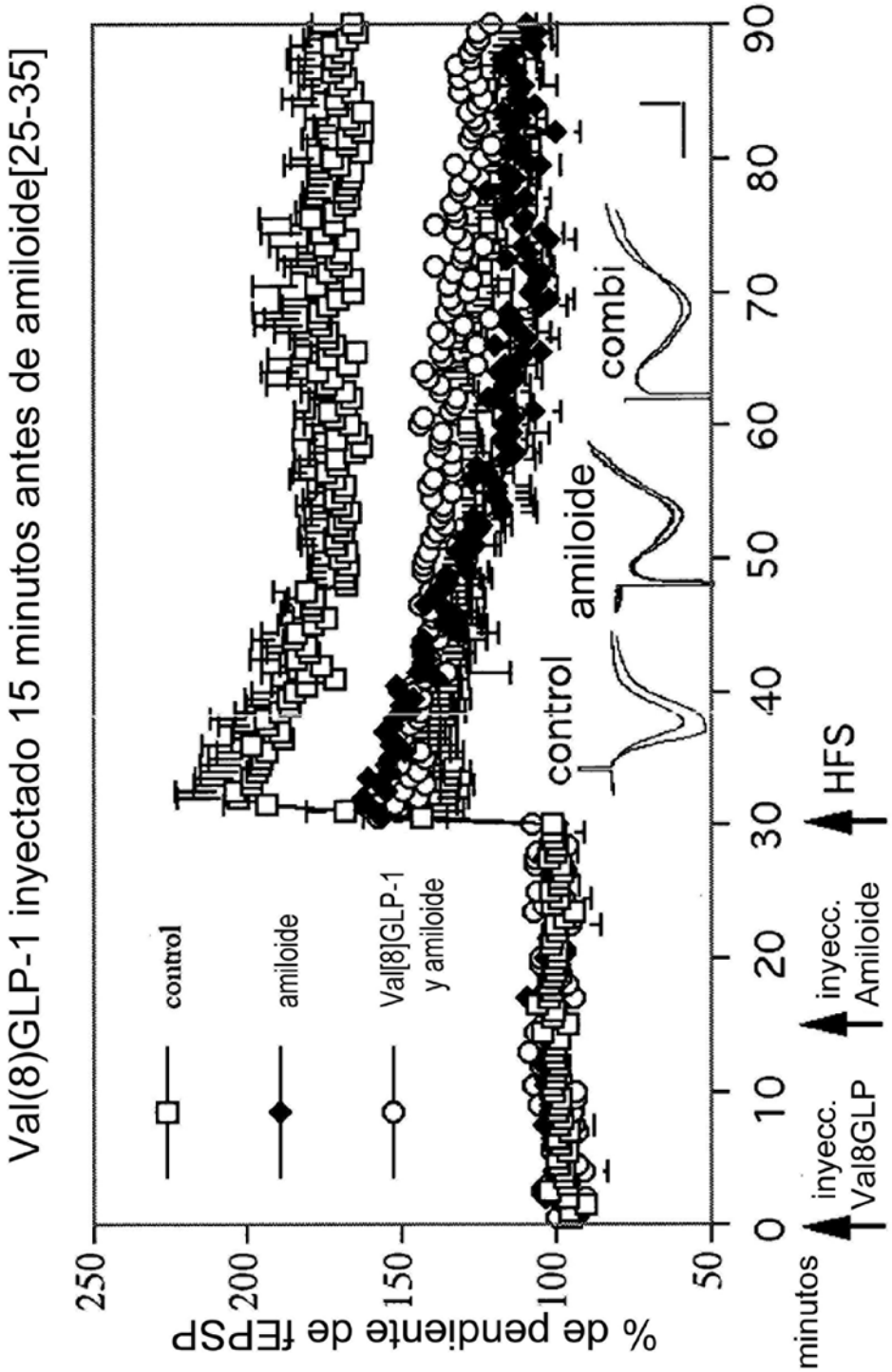
Val(8)GLP-1 inyectado 15 minutos antes de amiloide[25-35]
control
amiloide
Val[8]GLP-1
y amiloide
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
minutos
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
inyecc.
Val8GLP
inyecc.
Amiloide
HFS
control
amiloide
combi

Figura 4B

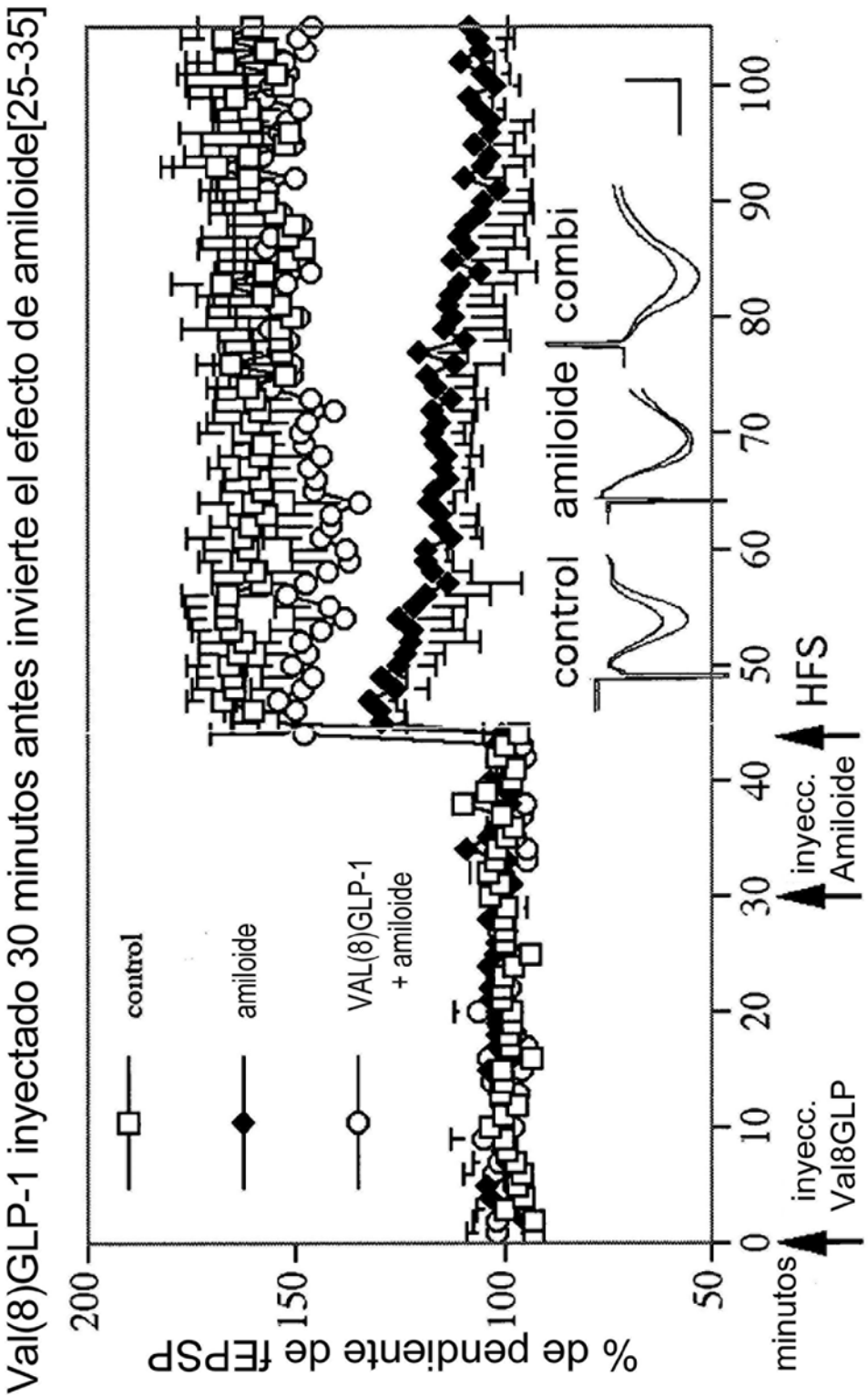
Val(8)GLP-1 inyectado 30 minutos antes invierte el efecto de amiloide[25-35]
control
amiloide
VAL(8)GLP-1
+ amiloide
% de pendiente de fEPSP
200
150
100
50
minutos
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
inyecc.
Val8GLP
inyecc.
Amiloide
HFS
control
amiloide
combi

Figura 4C

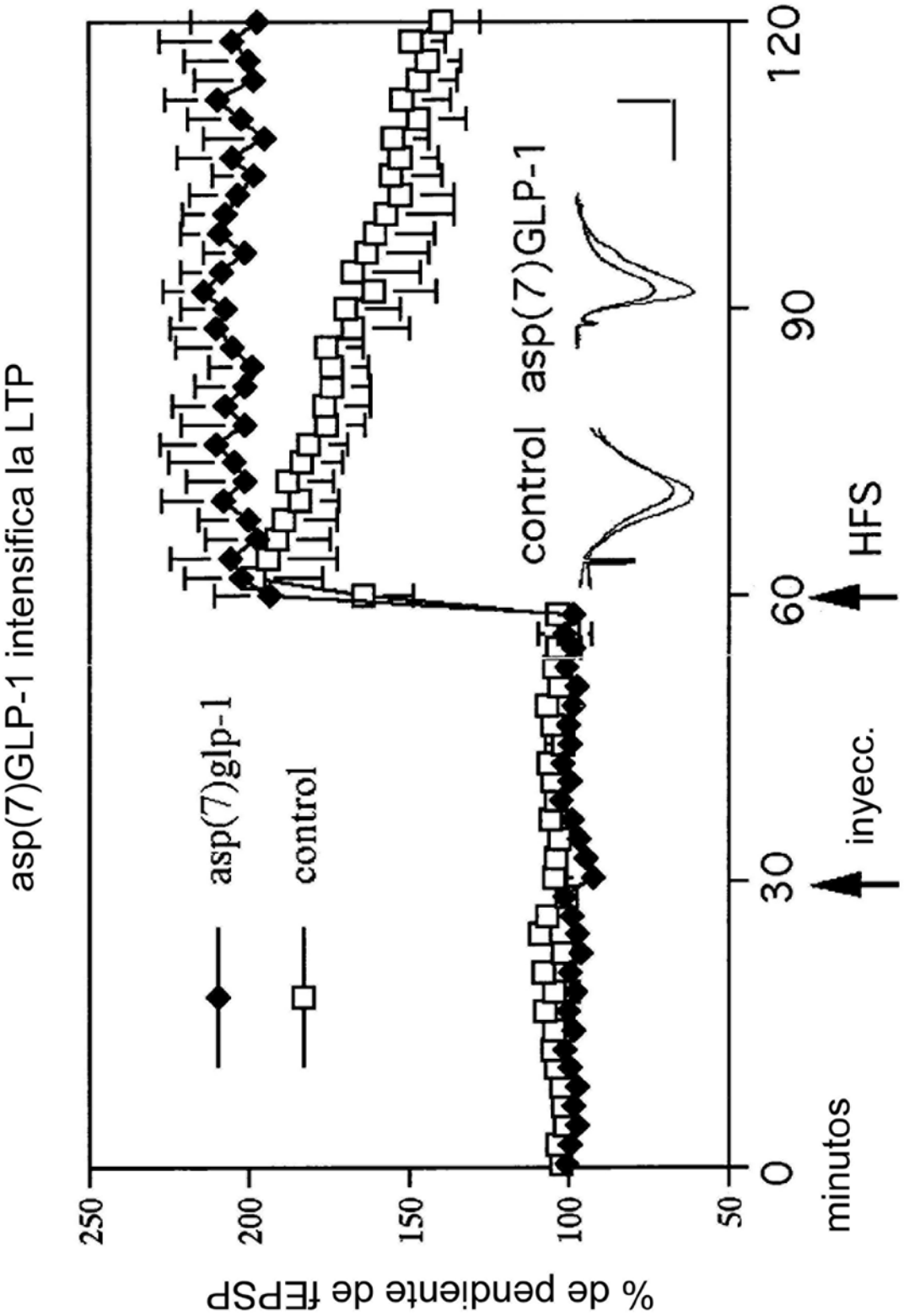
asp(7)GLP-1 intensifica la LTP
asp(7)glp-1
control
control
asp(7)GLP-1
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
minutos
inyecc.
HFS

Figura 5

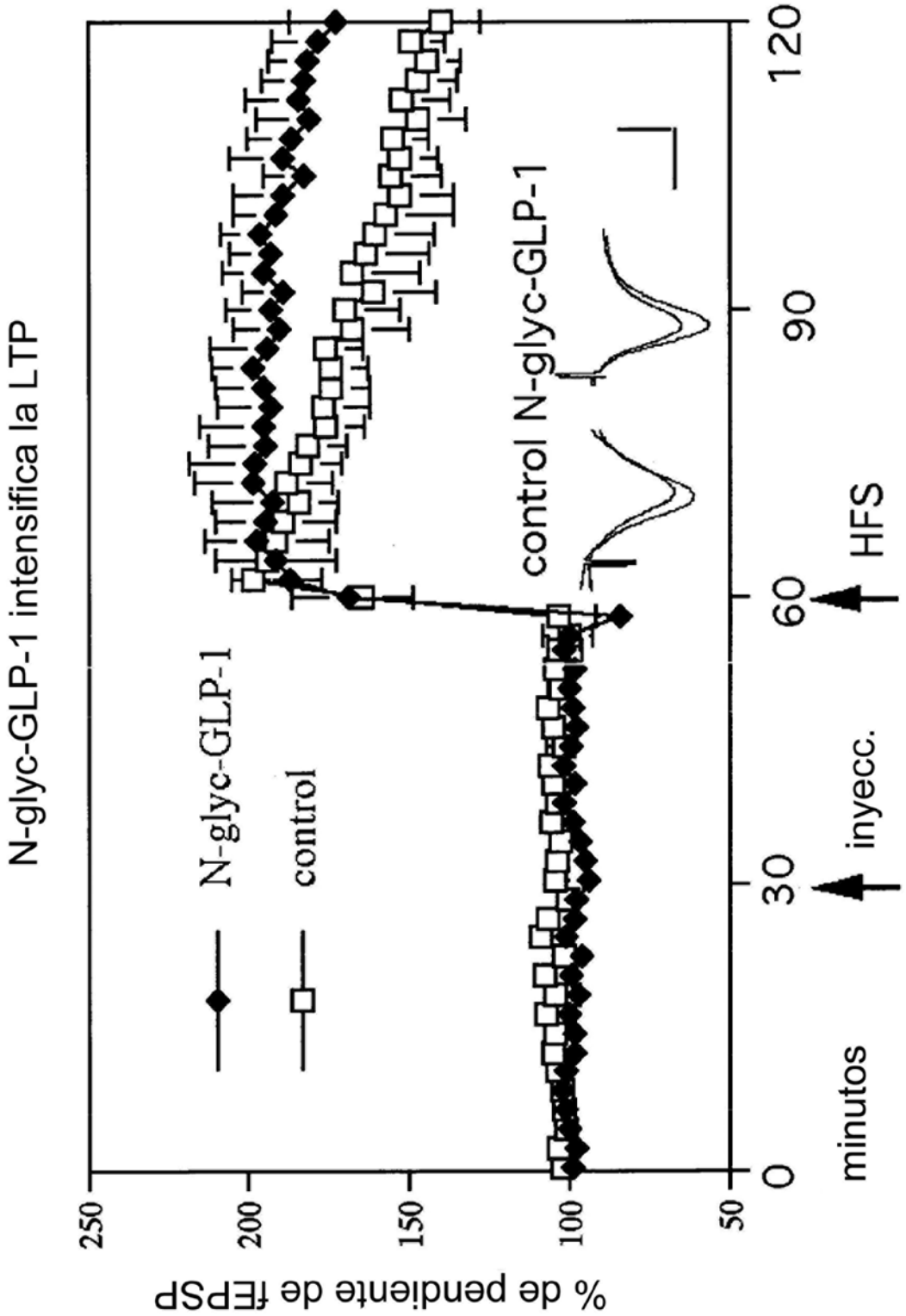
N-glyc-GLP-1 intensifica la LTP
N-glyc-GLP-1
control
control N-glyc-GLP-1
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
minutos
inyecc.
HFS

Figura 6

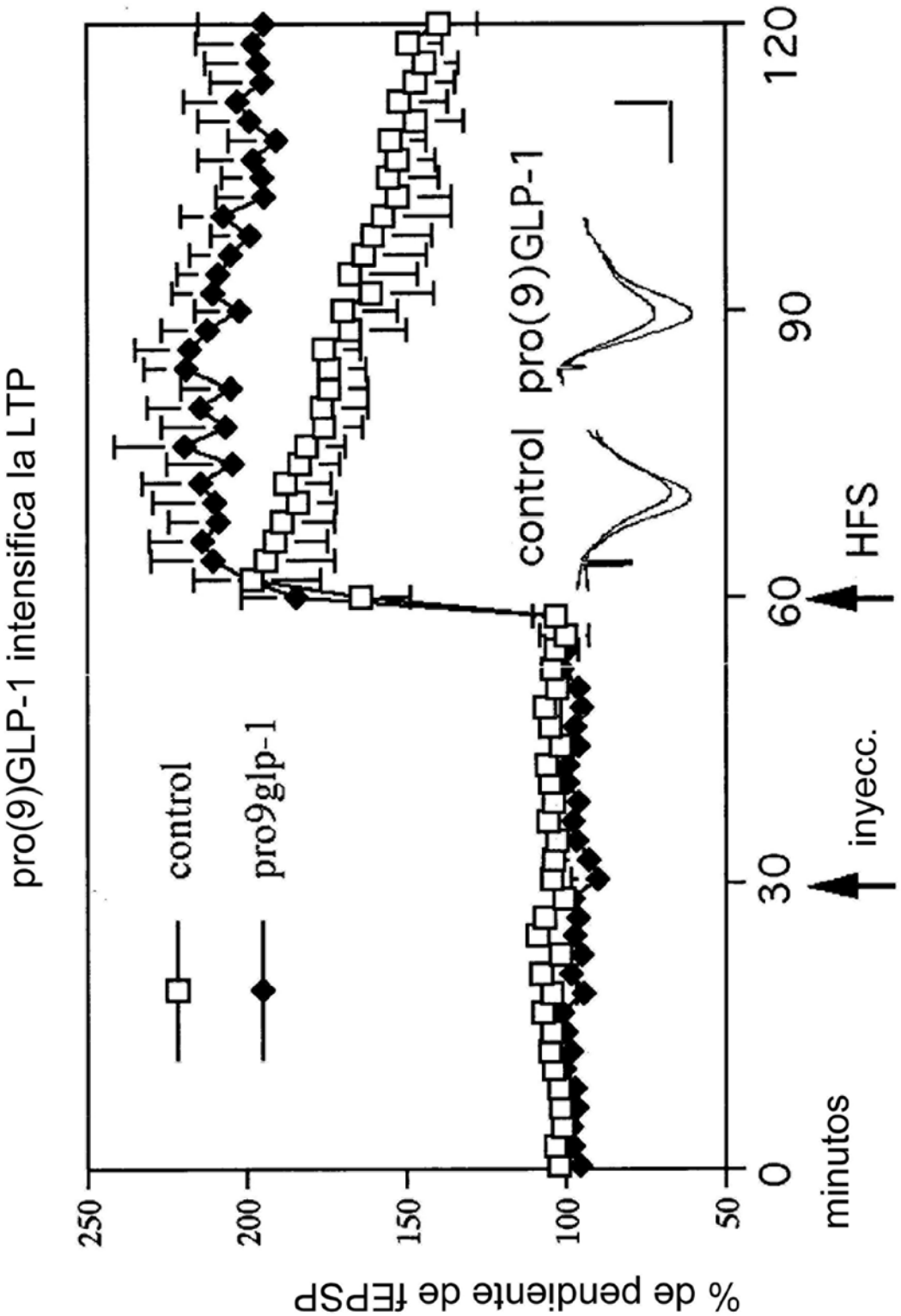
pro(9)GLP-1 intensifica la LTP
control
pro9glp-1
control
pro(9)GLP-1
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
minutos
inyecc.
HFS

Figura 7

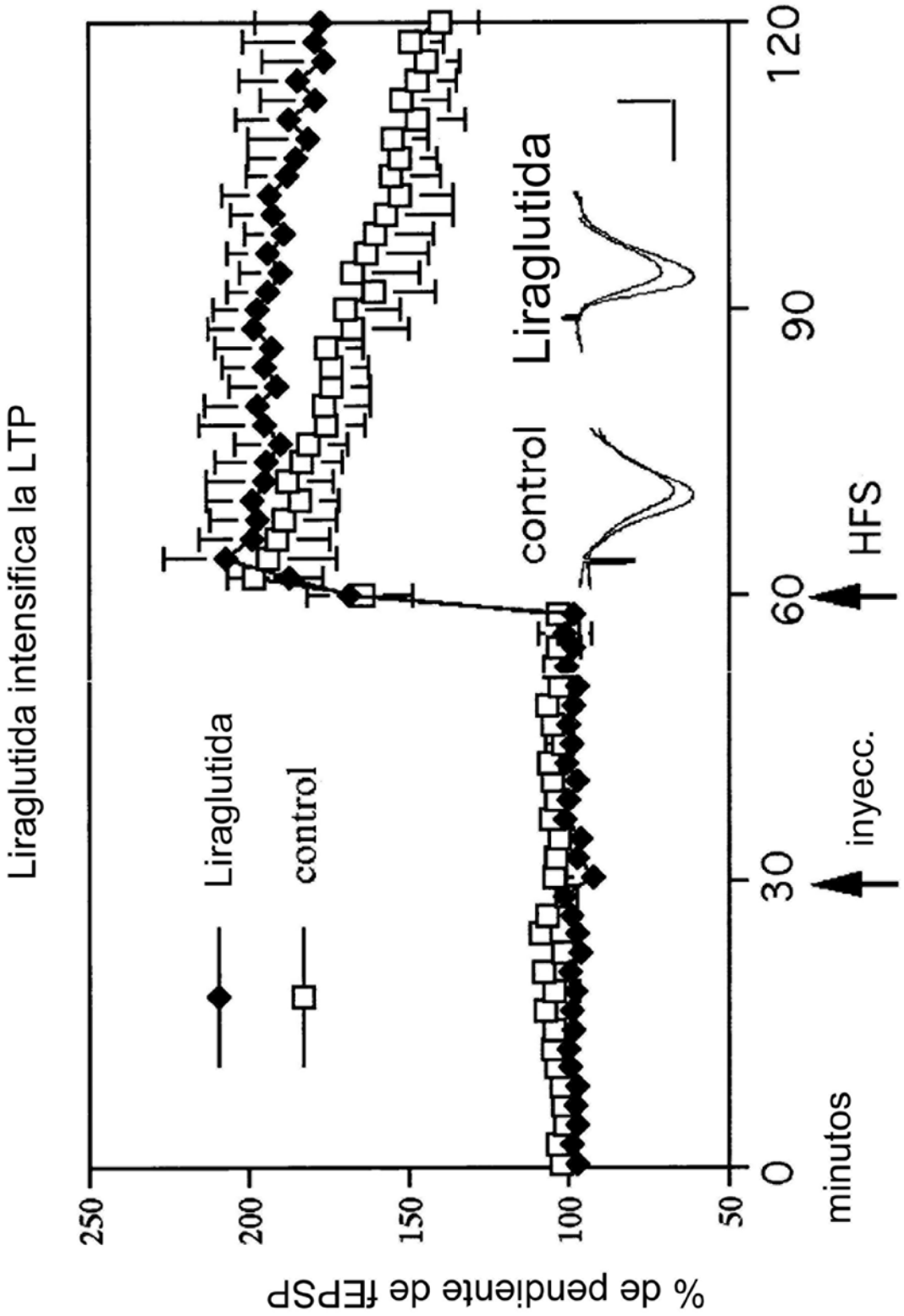
Liraglutida intensifica la LTP
Liraglutida
control
% de pendiente de fEPSP
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
minutos
inyecc.
HFS
control
Liraglutida

Figura 8