

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 996**

51 Int. Cl.:

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2006 PCT/US2006/021752**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2006 WO06133098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2006 E 06772163 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 1885366**

54 Título: **Chaperonas farmacológicas para tratar obesidad**

30 Prioridad:

03.06.2005 US 687648 P

12.05.2006 US 799968 P

02.06.2006 US 446429

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

27.07.2018

73 Titular/es:

AMICUS THERAPEUTICS, INC. (50.0%)

1 CEDAR BROOK DRIVE

CRANBURY, NJ 08512, US y

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL (50.0%)

72 Inventor/es:

FAN, JIAN-QIANG;

VANLENZANO, KEN;

LEE, GARY;

BOUVIER, MICHEL y

RENÉ, PATRICIA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 676 996 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

Chaperonas farmacológicas para tratar obesidad

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a métodos de potenciamiento de la actividad del receptor de melanocortina-4 (MC4R) normal, y a potenciar la actividad de un MC4R que tiene una mutación o mutaciones que afectan el plegamiento y/o procesamiento de proteínas del MC4R. La invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene una afección en la que sería beneficiosa elevada actividad de un MC4R en la superficie celular, tal como en obesidad, administrando una cantidad eficaz de una chaperona farmacológica para el MC4R. La invención proporciona chaperonas farmacológicas para MC4R que potencian la actividad de MC4R. La invención proporciona además un método de cribado para identificar chaperonas farmacológicas que potencian el plegamiento de un MC4R en el retículo endoplásmico (RE), con el fin de potenciar la actividad del MC4R en la superficie celular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Obesidad

15 La obesidad representa el trastorno del peso corporal más predominante, y es el trastorno nutricional más importante en el mundo occidental, con estimaciones de su prevalencia que oscilan del 30 % al 50 % de la población de edad media. El número de estadounidenses con sobrepeso y obesos ha continuado aumentando desde 1960, una tendencia que no está desacelerando. Hoy en día se cataloga que el 64,5 por ciento de los estadounidenses adultos (aproximadamente 127 millones) tienen sobrepeso o son obesos. Cada año, la obesidad causa al menos 300.000 muertes en los EE.UU., y los costes sanitarios de los adultos estadounidenses con obesidad ascienden aproximadamente a 100 billones de dólares (Asociación Americana de la Obesidad).

20 La obesidad aumenta el riesgo de un individuo de desarrollar afecciones tales como hipertensión arterial, diabetes (tipo 2), hiperlipidemia, enfermedad cardíaca, hipertensión, accidente cerebrovascular, enfermedad de la vesícula biliar y cáncer de mama, próstata y colon (véanse, por ejemplo, Nishina, P. M. et al., 1994, *Metab.* 43: 554-558; Grundy, S. M. & Barnett, J. P., 1990, *Dis. Mon.* 36: 641-731). En los EE.UU., la incidencia de tener sobrepeso o ser obeso se produce a tasas más altas en las poblaciones raciales/étnicas minoritarias tales como afroamericanos e hispanoamericanos, en comparación con los cáucaso-americanos. Mujeres y personas de bajo estatus socioeconómico dentro de las poblaciones minoritarias parecen ser particularmente afectadas por el exceso de peso y la obesidad. Esta tendencia no se limita a los adultos. Aproximadamente el 30,3 por ciento de los niños (edades 6 a 11) tienen sobrepeso y el 15,3 por ciento son obesos. Para adolescentes (edad 12 a 19), el 30,4 por ciento tienen sobrepeso y el 15,5 por ciento son obesos. La diabetes, hipertensión y otras enfermedades crónicas relacionadas con la obesidad que son predominantes entre los adultos han llegado ahora a ser más comunes en niños y adultos jóvenes. Se informa que hábitos alimenticios malos e inactividad contribuyen al aumento de la obesidad en la juventud.

35 Además, factores de riesgo para desarrollar obesidad infantil incluyen tener padres con sobrepeso, o padres no preocupados por el peso de sus hijos, elevado aporte calórico debido a tamaños de porciones grandes, elevado sedentarismo y reducida actividad relacionada con el transporte (caminar a la escuela o a la parada del autobús), tener un temperamento con altos niveles de indignación/frustración (que puede causar que los padres den a sus hijos comida y calorías adicionales para reducir los berrinches); tener síndrome de Down, índice de masa corporal (IMC) durante el embarazo de la madre y estado de primogénito (elevada prevalencia de obesidad).

40 Una herramienta usada para diagnosticar la obesidad en adultos es calcular el IMC de un individuo, que es una medida del peso corporal para la altura (Garrow y Webster, *International Journal of Obesity* 1985; 9:147-153). Un IMC de 25 a 29,9 indica que un individuo tiene sobrepeso, mientras que un IMC de 30 o superior es indicativo de obesidad. Para niños, el IMC es específico para el sexo y edad (Pietrobelli et al., *Journal of Pediatrics* 1998; 132:204-210).

45 Factores de riesgo para desarrollar obesidad en la adultez incluyen mala dieta (rica en calorías, baja en nutrientes); falta de actividad física; trabajar en turnos variados; dejar de fumar, tener ciertas afecciones médicas tales como enfermedades hereditarias raras y desequilibrios hormonales (tales como hipotiroidismo, enfermedad de Cushing y síndrome del ovario poliquístico); ciertas medicaciones (esteroides y algunos antidepresivos); ser de una minoría racial o étnica (especialmente una minoría femenina); bajo estatus socioeconómico; edad (riesgo elevado a partir de 20-55), embarazo; y jubilación (debido a programa alterado).

Receptor de melanocortina 4 y obesidad

55 El receptor de melanocortina 4 (MC4R) participa en la regulación del peso corporal (Graham et al, *Nat. Genetics* 1997; 17: 273-4). MC4R se expresa en el cerebro, que incluye el hipotálamo, que influye en el consumo de alimentos. Se han encontrado numerosas mutaciones que afectan la actividad de MC4R y muchas están asociadas a la obesidad que incluye obesidad de aparición temprana (infancia) (Nijenhuis et al., *J. Biol. Chem.* 2003,

278:22939-45; Branson et al., New Eng. J. Med. 2003, 348:1096-1103; Gu et al., Diabetes 1999, 48:635-39; Farooqi et al., New Eng. J. Med. 2003, 348:1085-95; Tao et al., Endocrinology 2003, 144:4544-51).

Actuales tratamientos

5 Los actuales fármacos contra la obesidad tienen eficacia limitada y numerosos efectos secundarios (Crowley, V. E., Yeo, G. S. & O'Rahilly, S., Nat. Rev. Drug Discov. 2002; 1, 276-86). Con la obesidad alcanzando proporciones epidémicas en el mundo, existe una necesidad urgente del desarrollo de agentes terapéuticos adecuados en esta área. En los últimos años, han aparecido hormonas y neuropéptidos implicados en la regulación del apetito, gasto de energía corporal y acumulación de masa de grasa como posibles fármacos contra la obesidad (McMinn, J. E., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W., Obes Rev 2000; 1:37-46; Drazen, D. L. & Woods, S. C., Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2003; 6:621-629). Actualmente, sin embargo, estos péptidos requieren administración parenteral. La posibilidad de inyecciones diarias para controlar la obesidad durante periodos prolongados de tiempo (ya que la obesidad es una afección crónica) no es muy alentadora y limita el uso de estos fármacos.

Las chaperonas moleculares estabilizan el adecuado plegamiento de proteínas

15 Las proteínas son sintetizadas en el citoplasma, y las proteínas recién sintetizadas son secretadas en la luz del retículo endoplásmico (RE) en un estado ampliamente sin plegar. En general, el plegamiento de proteínas está gobernado por el principio de auto-ensamblaje. Los polipéptidos recién sintetizados se pliegan en su conformación nativa basada en sus secuencias de aminoácidos (Anfinsen et al., Adv. Protein Chem. 1975; 29:205-300). *In vivo*, el plegamiento de proteínas es complicado, debido a que la combinación de temperatura ambiente y alta concentración de proteína estimula el proceso de agregación, en el que aminoácidos normalmente enterrados en el núcleo hidrófobo interaccionan con sus vecinos no específicamente. Para evitar este problema, el plegamiento de proteínas es normalmente facilitado por un grupo de proteínas especial llamado chaperonas, que previene que las cadenas de polipéptidos nacientes se agreguen uniéndose a proteína no plegada de forma que la proteína se repliegue en la conformación nativa (Hartl, Nature 1996; 381:571-580).

25 Chaperonas moleculares endógenas están presentes en prácticamente todos los tipos de células y en la mayoría de los compartimentos celulares. Algunas participan en el transporte de proteínas y permiten que las células sobrevivan bajo tensiones tales como choque térmico y privación de glucosa (Gething et al., Nature 1992; 355:33-45; Caplan, Trends Cell. Biol. 1999; 9:262-268; Lin et al., Mol. Biol. Cell. 1993; 4:109-1119; Bergeron et al., Trends Biochem. Sci. 1994; 19:124-128). Entre las chaperonas endógenas, BiP (proteína de unión de cadenas pesadas de inmunoglobulina, Grp78) es la chaperona mejor caracterizada del RE (Haas, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1991; 167:71-82). Al igual que otras chaperonas, BiP interacciona con muchas proteínas secretoras y de membrana dentro del RE durante su maduración. Cuando el plegamiento de proteínas nacientes avanza suavemente, esta interacción normalmente es débil y de corta vida. Una vez se logra la conformación de proteína nativa, la chaperona molecular ya no interacciona con la proteína. La unión de BiP a una proteína que deja de plegarse, ensamblarse, o ser apropiadamente glucosilada, llega a ser estable, y normalmente conduce a degradación de la proteína mediante la vía de degradación asociada al RE. Este proceso sirve de sistema de "control de calidad" en el RE, que asegura que solo aquellas proteínas apropiadamente plegadas y ensambladas serán transportadas fuera del RE para maduración adicional, y proteínas inapropiadamente plegadas son retenidas para la posterior degradación (Hurtley et al., Annu. Rev. Cell. Biol. 1989; 5:277-307). Debido a las acciones combinadas de la ineficiencia del proceso de plegamiento termodinámico de proteínas y el sistema de control de calidad del RE, solo una fracción de proteínas nacientes (no mutadas) llegará a plegarse en una conformación funcional y saldrá satisfactoriamente del RE.

Chaperonas farmacológicas derivadas de inhibidores enzimáticos específicos rescatan enzimas mutantes y potencian enzimas no mutantes

45 Se ha mostrado previamente que los inhibidores de molécula pequeña de enzimas asociadas a trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD) pueden tanto rescatar el plegamiento como la actividad de la enzima mutante, y potenciar el plegamiento y la actividad de la enzima no mutante (véanse las patentes de EE.UU. N.º 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; y 6.916.829). En particular, se descubrió que la administración de derivados de molécula pequeña de glucosa y galactosa, que eran inhibidores específicos competitivos de enzimas mutantes asociadas a LSD, aumentaron eficazmente *in vitro* e *in vivo* la estabilidad de las enzimas mutantes y potenciaron la actividad enzimática mutante. La teoría original tras esta estrategia es la siguiente: como la proteína enzimáticamente mutante se pliega inapropiadamente en el RE (Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática es retrasada en la vía de transporte normal (RE → aparato de Golgi → endosoma → lisosoma) y se degrada rápidamente. Por tanto, un compuesto que estabiliza el correcto plegamiento de una proteína mutante servirá de chaperona específica de sitio activo para que la proteína mutante promueva su suave escape del sistema de control de calidad del RE. Los inhibidores enzimáticos ocupan el centro catalítico, produciendo la estabilización de la conformación de enzima en células en cultivo y en animales. Estas chaperonas específicas se designaron "chaperonas específicas de sitio activo (ASSC)", ya que se unieron en el sitio activo de la enzima.

Además de rescatar las enzimas mutantes, las ASSC potencian la secreción del RE y actividad de enzimas no mutantes recombinantes. Una ASSC facilita el plegamiento de enzima no mutante expresada en exceso, que es de

otro modo retardada en el sistema de control de calidad del RE debido a que la expresión en exceso y la producción en exceso de la enzima superan la capacidad del RE y conduce a agregación y degradación de proteína. Así, un compuesto que induce una conformación molecular estable de una enzima durante el plegamiento sirve de "chaperona" para estabilizar la enzima en una conformación apropiada para la salida del RE. Como se observa anteriormente, para enzimas, un compuesto tal resultó ser inesperadamente un inhibidor competitivo de la enzima.

Potenciamiento de otras proteínas con chaperonas

Además de LSD, ahora se reconocen un gran número y variado de enfermedades como "enfermedades conformacionales", que son causadas por la adopción de conformaciones distintas de proteína nativa, que pueden conducir al retardo de la proteína en el RE y la degradación definitiva de las proteínas (Kuznetsov et al., N. Engl. J. Med. 1998; 339:1688-1695; Thomas et al., Trends Biochem. Sci. 1995; 20:456-459; Bychkova et al., FEBS Lett. 1995; 359:6-8; Brooks, FEBS Lett. 1997; 409:115-120).

Por ejemplo, se encontró que compuestos sintéticos pequeños estabilizaban el dominio de unión de ADN de formas mutantes de la proteína supresora de tumor p53, permitiendo así que la proteína mantuviera una conformación activa (Foster et al., Science 1999; 286:2507-10). Se ha mostrado que la síntesis de receptores es rescatada por antagonistas de receptores de molécula pequeña y ligandos (Morello et al., J. Clin. Invest. 2000; 105: 887-95; Petaja-Repo et al., EMBO J. 2002; 21:1628-37). Incluso se ha demostrado el rescate farmacológico de proteínas del canal de membrana y otros transportadores de membrana plasmática usando fármacos bloqueadores de canales o sustratos (Rajamani et al., Circulation 2002; 105:2830-5; Zhou et al., J. Biol. Chem. 1999; 274:31123-26; Loo et al., J. Biol. Chem. 1997; 272: 709-12; Pedemonte et al., J. Clin. Inves. 2005; 115: 2564-71).

Sigue existiendo en la materia una necesidad particular de tratar deficiencias en la función de proteínas MC4R que estén tanto relacionadas como sin relacionar con mutación de MC4R.

SUMARIO DE LA INVENCION

Como se ha descrito en el presente documento, la presente invención proporciona una chaperona farmacológica para potenciar la actividad del receptor de melanocortina-4 (MC4R), por ejemplo, para el tratamiento de obesidad, en sujetos que tienen una mutación de plegamiento en el gen que codifica MC4R, o en sujetos para los que sería beneficioso un aumento en la actividad de MC4R no mutante.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una chaperona farmacológica como se define en la reivindicación 1. El potenciar el plegamiento intracelular de MC4R, produciendo potenciada expresión sobre la superficie celular de, por ejemplo, neuronas del hipotálamo, reduce el deseo de comer, y, por tanto, es útil en el tratamiento de trastornos de comer en exceso, tales como trastornos por atracón.

Preferentemente, la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante para aumentar la actividad de MC4R mutante; aumentar la expresión de la superficie celular de MC4R mutante; y/o aumentar la estabilidad.

Preferentemente, el polipéptido MC4R mutante comprende la mutación R165Q, R165W o S58C en comparación con SEQ ID NO: 2.

Preferentemente, la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante ya que está plegado en una conformación funcional.

Preferentemente, la actividad potenciada por la chaperona farmacológica es activación de adenilil ciclasa.

Preferentemente, la actividad potenciada por la chaperona farmacológica es activación de adenilil ciclasa.

Preferentemente, la chaperona farmacológica aumenta el tráfico de polipéptido MC4R mutante a la membrana celular.

Preferentemente, la chaperona farmacológica va a administrarse en un vehículo farmacológicamente aceptable.

Preferentemente, la chaperona se administra en una cantidad de 1 a 100 mg/kg de peso corporal por día.

La presente invención se entenderá además por referencia a Descripción detallada y Ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Un agonista de receptores de melanocortina-4 de rata y humanos, como se informa por Sebbat, 2002, J Med Chem, 45, 4589-4593 (compuesto 1).

FIG. 2. Un agonista de MC4R humano, como se informa por Richardson, 2004, J Med Chem 47, 744-755 (compuesto 2).

FIG. 3. Esquema sintético para el compuesto 1.

FIG. 4. Esquema sintético para el compuesto de 2.

FIG. 5. Un antagonista de MC4R, como se informa por Arasasingham, 2003, J Med Chem 46, 9-11 (compuesto 3).

FIG. 6. Un antagonista de MC4R (compuesto 4); la actividad biológica de este compuesto se informa en el documento WO 02/062766 usando un ensayo de proximidad de centelleo.

5 **FIG. 7.** Esquema sintético para el compuesto 3.

FIG. 8. Esquema sintético para el compuesto 4.

FIG. 9. Un compuesto de bisaminotiazol descrito en Pedemonte et al., J. Clin. Inves. 2005; 115: 2564-71 (compuesto 5).

FIG. 10A-D. Compuestos 6-25 descritos abajo.

10 **FIG 11.** Ensayo de señalización de MC4R en mutantes de MC4R tratados con agonista de ligando y con y sin chaperonas antagonistas.

FIG. 12. Actividad media de α -galactosidasa A en glóbulos blancos de voluntarios sanos normales que recibieron 50 mg de 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) b.i.d. (triángulos), 150 mg de DGJ b.i.d. (cuadrados), o placebo (círculos blancos).

15 **FIG. 13.** Estructura de la clase de compuestos basada en los compuestos 1, 2, 6, 7 y 12-17.

FIG. 14. Estructura de la clase de compuestos basada en los compuestos 3, 9, 10, 11 y 21.

FIG. 15. Estructura de la clase de compuestos basada en los compuestos 4, 8, 24 y 25.

FIG. 16. Estructura de la clase de compuestos basada en los compuestos 18-20.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 La presente invención se refiere al descubrimiento de que puede identificarse que moléculas pequeñas rescatan el plegamiento y procesamiento de proteínas de polipéptidos MC4R mutante y no mutantes y potencian la estabilidad de proteínas sobre la superficie celular de neuronas, que a su vez, disminuye el hambre y el comer en exceso. Las chaperonas farmacológicas se unen específicamente a la proteína MC4R e inducen o estabilizan una conformación funcional de MC4R mutante o no mutante. La invención, por tanto, permite el rescate específico de MC4R mutante, además de la potenciada expresión de MC4R no mutante en la superficie celular. Por consiguiente, pueden usarse chaperonas farmacológicas para MC4R para el tratamiento de trastornos donde se desee el rescate de, o elevada estabilidad o actividad de, MC4R, por ejemplo, la afección de tener sobrepeso o ser obeso.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de una chaperona farmacológica a un ser humano produjo un aumento significativo en el nivel de actividad de una proteína natural. Este descubrimiento, combinado con un entendimiento de la capacidad de una chaperona farmacológica para promover el apropiado plegamiento de proteínas en el RE, que conduce al correcto tráfico de proteínas y aumentó significativamente la actividad de proteínas, proporciona ventajosamente la capacidad de lograr actividad de proteínas suficiente para invertir o mejorar una enfermedad, trastorno, o afección, particularmente en un sujeto humano. Este fenómeno es altamente específico para la proteína específicamente unida por la chaperona farmacológica particular, a diferencia de métodos que usan compuestos que operan generalmente para aumentar la expresión de todas las proteínas, llamadas "chaperonas químicas".

Ciertos resultados experimentales subyacen a la presente invención: chaperonas farmacológicas aumentaron la actividad de proteína naturales endógenas en seres humanos a aproximadamente el 120 % de la normalidad, 130 % de la normalidad y 145 % de la normalidad a dosis más bajas, y al 150 % y 185 % de la normalidad a una mayor dosis después de la administración de una chaperona farmacológica (véase el Ejemplo 7 y la Figura 12). Este nivel de aumento *in vivo* no fue predecible de los resultados con células en cultivo de tejido que siguen expuestas a la chaperona farmacológica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.274.597 describe un aumento del 30 % de la actividad de α -galactosidasa A (α -Gal A) en linfoblastos normales cultivados *in vitro* con desoxigalactonojirimicina (DGJ), una chaperona farmacológica. Dada la esperanza de que cupiera esperar que los procesos de fisiológica redujeran los efectos de las chaperonas farmacológicas en proteínas normales *in vivo*, no se esperó que una chaperona farmacológica diera un aumento significativo en la actividad de proteína natural. El Ejemplo 10 de la patente de EE.UU. N.º 6.274.597 describe un aumento en la actividad de una enzima mutante en ratones transgénicos tratados durante una semana con una chaperona farmacológica. Sin embargo, estos experimentos implicaron formas mutantes de la proteína rescatada, no de tipo no mutante, y fueron conducidas en ratones, de manera que los resultados no fueron predictivos o sugerentes de los resultados observados para proteína natural en seres humanos.

No hubo base para esperar que una chaperona farmacológica pudiera aumentar el nivel de actividad de una proteína natural *in vivo* al menos el 20-25 %, es decir, al menos 1,2 veces o el 120 % de la normalidad, o el 30 % (1,3 veces, 130 % de la normalidad), 40 % (1,4 veces, 140 % de la normalidad), y particularmente no al menos aproximadamente el 50 % (1,5 veces, 150 % de la normalidad). Sin embargo, como se ejemplifica en el presente documento, la administración de DGJ a sujetos produjo un aumento dependiente de la dosis en α -Gal A. Este extraordinario efecto resulta de valorar la chaperona farmacológica, que ya se ha demostrado según tecnología existente que rescata una forma mutante de la proteína, para lograr el aumento desvelado en la actividad o proteína natural. Por consiguiente, la invención proporciona valorar una dosis de una chaperona farmacológica que se ha encontrado que rescata la actividad de una proteína mutante para aumentar el nivel de actividad de una proteína natural una cantidad definida.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la materia, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico donde ese usa cada término. Ciertos términos se tratan a continuación, o en cualquier parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al médico en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo prepararlos y usarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "chaperona farmacológica", o algunas veces "chaperona farmacológica específica" ("SPC"), se refiere a una molécula que se une específicamente a MC4R y tiene uno o más de los siguiente efectos: (i) potenciar la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) potencia el apropiado tráfico de la proteína desde el RE a otra localización celular, preferentemente una localización celular nativa, es decir, previene la degradación asociada al RE de la proteína; (iii) prevenir la agregación de proteínas conformacionalmente inestables, es decir, erróneamente plegadas; (iv) restaurar o potenciar al menos parcialmente la función de no mutante, estabilidad y/o actividad de la proteína; y/o (v) mejorar el fenotipo o la función de la célula que aloja el MC4R. Así, una chaperona farmacológica para MC4R es una molécula que se une a MC4R, produciendo el apropiado plegamiento, tráfico, no agregación y actividad de MC4R. Como se usa en el presente documento, este término no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, o a agentes no específicos que han demostrado actividad de chaperona no específica contra diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, es decir, chaperonas químicas (véanse Welch et al., *Cell Stress and Chaperones* 1996; 1(2):109-115; Welch et al., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1997; 29(5):491-502; patente de EE.UU. N.º 5.900.360; patente de EE.UU. N.º 6.270.954; y patente de EE.UU. N.º 6.541.195). Incluye moléculas de unión específica, por ejemplo, chaperonas farmacológicas específicas (tratadas anteriormente), inhibidores o antagonistas, y agonistas.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente a" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con MC4R, específicamente, una interacción con restos de aminoácidos de MC4R que participan directamente en el contacto de la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, aquí MC4R, para ejercer un efecto de chaperona sobre MC4R, y no sobre un grupo genérico de proteínas relacionadas o sin relacionar. Los restos de aminoácidos de MC4R que interaccionan con cualquier chaperona farmacológica de MC4R dada pueden o pueden no estar dentro del dominio de unión de ligando de MC4R, es decir, el dominio que se une al ligando natural MSH, o cualquier otro "sitio activo" de MC4R, por ejemplo, el dominio de unión de proteína G. La unión específica puede evaluarse mediante ensayos de unión rutinarios o mediante estudios estructurales, por ejemplo, co-cristalización, RMN, y similares. Ejemplos de aminoácidos del dominio de unión del ligando MSH de MC4R incluyen, pero no se limitan a, Phe284 y Tyr268 (usando, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 como secuencia de referencia).

En una realización no limitante, la chaperona farmacológica es un inhibidor o antagonista de MC4R. En otra realización no limitante, la chaperona farmacológica es un agonista de MC4R. En otra realización más, la chaperona farmacológica es un agonista/antagonista mixto. Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a cualquier molécula que se une a una proteína y, ya sea parcialmente o completamente, bloquea, inhibe, reduce o neutraliza una actividad de MC4R. El término "agonista" se refiere a cualquier molécula que se une a una proteína y al menos aumenta, potencia, restaura o imita parcialmente una actividad de MC4R. Como se trata más adelante, tales moléculas son conocidas para MC4R.

Como se usa en el presente documento, los términos "potencian la estabilidad conformacional de MC4R" o "aumentan la estabilidad conformacional de MC4R" se refieren a aumentar la cantidad o proporción de MC4R que adopta una conformación funcional en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R, con respecto a MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R. En una realización, las células no expresan una conformación MC4R mutante. En otra realización, las células expresan un polinucleótido MC4R mutante que codifica un polipéptido, por ejemplo, un MC4R mutante conformacional.

Como se usa en el presente documento, los términos "potencian el tráfico de MC4R" o "aumentan el tráfico de MC4R" se refieren a aumentar la eficiencia de transporte de MC4R a la membrana plasmática en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R, con respecto a la eficiencia de transporte de MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

Como se usa en el presente documento, los términos "potencian la actividad de MC4R" o "aumentan la actividad de MC4R" se refieren a aumentar la actividad de MC4R, como se describe en el presente documento, en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R, con respecto a la actividad de MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

Como se usa en el presente documento, los términos "potencian el nivel de MC4R" o "aumentan el nivel de MC4R" se refieren a aumentar el nivel de MC4R en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R, con respecto al nivel de MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

El término "estabilizar una conformación apropiada" se refiere a la capacidad de una chaperona farmacológica para MC4R para inducir o estabilizar una conformación de una proteína MC4R mutada que es funcionalmente idéntica a la conformación de la proteína MC4R no mutante. El término "funcionalmente idéntica" significa que aunque puede haber variaciones menores en la conformación (casi todas las proteínas presentan alguna flexibilidad conformacional en su estado fisiológico), la flexibilidad conformacional no produce (1) agregación de proteínas, (2) eliminación mediante la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico, (3) alteración de la función de proteína, por ejemplo, la capacidad de unir ligando y/o activar actividad de adenilil ciclasa, y/o (4) transporte inapropiado dentro de la célula, por ejemplo, localización en la membrana plasmática, a un mayor o menor grado que el de la proteína natural.

El término "conformación molecular estable" se refiere a una conformación de una proteína, es decir, MC4R, inducida por una chaperona farmacológica, que proporciona función de no mutante al menos parcial en la célula. Por ejemplo, una conformación molecular estable de un mutante MC4R sería una donde MC4R escapa del RE y es enviado a la membrana celular como para un MC4R no mutante, en lugar de plegarse erróneamente y ser degradado. Además, una conformación molecular estable de un MC4R mutado también puede poseer actividad completa o parcial de MC4R, por ejemplo, actividad activadora de adenilil ciclasa para generación potenciada de AMPc mediante su proteína G fisiológica relacionada. Sin embargo, no es necesario que la conformación molecular estable tenga todos los atributos funcionales de la proteína natural.

El término "actividad de MC4R" se refiere a la función fisiológica normal de un MC4R no mutante en una célula. Por ejemplo, tras la unión por un agonista, señales de MC4R mediante interacción con una proteína G, G_{α_s} , y activación de adenilato ciclasa (véase, por ejemplo, VanLeeuwen et al., J Biol. Chem. 2003; 18: 15935-40). Esto produce la acumulación intracelular de AMPc y la activación de proteína cinasa A (PKA). Tal funcionalidad puede probarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de unión del ligando α -, β - o γ -MSH, o agonista de ^{125}I -[Nle⁴,D-Phe⁷] α -MSH a MC4R, o usando ensayos de activación de adenilil ciclasa, o ensayos de gen indicador de luciferasa, para determinar aumentos en AMPc intracelular. Los ensayos de acumulación de AMP cíclico son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, VanLeeuwen et al., J Biol. Chem. 2003; 18: 15935-40).

"MC4R" se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia como se representa en uno cualquiera de: SEQ ID NO: 1 (humana; N° de acceso de GenBank BC069172); 3 (humana; N° de acceso de GenBank NM_005912); 5 (rata; N° de acceso de GenBank NM_013099); o 7 (murina; N° de acceso de GenBank NM_016977).

Un "polipéptido MC4R" también se refiere a una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2 (humana; N° de acceso de GenBank AAI01803); 4 (humana; N° de acceso de GenBank NM_005912); 6 (rata; N° de acceso de GenBank NM_013099); o 8 (murina; N° de acceso de GenBank AF201662), y cualquier otra secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido MC4R que tiene la misma función y afinidad de unión de ligando que una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8.

El término "MC4R no mutante" se refiere al nucleótido (SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7) secuencias que codifican MC4R, y secuencias de polipéptidos (SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8) codificadas por las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas (acceso de GenBank de MC4R humano AAI01803; N° de acceso de GenBank de MC4R humano NM_005912; N° de acceso de GenBank de MC4R de rata NM_013099; y N° de acceso de GenBank de MC4R de ratón AF201662), y cualquier otra secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MC4R (que tiene las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que las secuencias de polipéptidos anteriormente mencionadas), tal como variantes alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad de lograr una conformación funcional en el RE, lograr localización apropiada dentro de la célula y presentar actividad no mutante (por ejemplo, estimulación de MC4R de acumulación de AMPc).

Como se usa en el presente documento, el término "MC4R mutante" se refiere a un polipéptido MC4R traducido de un gen que contiene una mutación genética que produce una secuencia de aminoácidos de MC4R alterada. En una realización, la mutación produce una proteína MC4R que no logra una conformación nativa en las condiciones normalmente presentes en el RE, cuando se compara con MC4R no mutante, o presenta estabilidad o actividad reducida en comparación con MC4R no mutante. Este tipo de mutación se denomina en el presente documento una "mutación conformacional", y la proteína que lleva una mutación tal se denomina un "mutante conformacional". El

dejar de lograr esta conformación produce proteína MC4R que se degrada o agrega, en vez de ser transportada a través de una vía normal en el sistema de transporte de proteína a su localización nativa en la célula o en el entorno extracelular. En algunas realizaciones, puede producirse una mutación en una parte no codificante del gen que codifica MC4R que produce expresión menos eficiente de la proteína, por ejemplo, una mutación que afecta la eficiencia de transcripción, eficiencia de corte y empalme, estabilidad de ARNm, y similares. Potenciando el nivel de expresión de variantes no mutantes, además de mutantes conformacionales, de MC4R, la administración de una chaperona farmacológica MC4R puede mejorar un déficit resultante de tal expresión ineficiente de proteínas.

Mutaciones a modo de ejemplo (usando el polipéptido de SEQ ID NO: 2 como referencia) incluyen P78L, R165Q y R165W. Otros mutantes de MC4R incluyen I125K, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, N62S, N97D, Y157S, I102S, L106P, L250Q, Y287X, P299H, S58C, CTCT en el codón 211, e inserción de TGAT en el codón 244. Además, otras mutaciones de MC4R (otra vez usando SEQ ID NO: 2 como referencia) incluyen aquellas descritas en la Tabla 1, abajo.

Ciertas pruebas pueden evaluar atributos de una proteína que puede o puede no corresponderse con su actividad real *in vivo*, pero, sin embargo, son sustitutos apropiados de funcionalidad de proteína, y comportamiento de no mutante en tales pruebas demuestra evidencia para soportar las técnicas de rescate o potenciamiento del plegamiento de proteínas de la invención. Una actividad tal según la invención es el transporte apropiado de un MC4R funcional desde el retículo endoplásmico a la membrana celular.

Los términos "expresión endógena" y "expresado endógenamente" se refieren a la expresión fisiológica normal de MC4R en células en un individuo que no tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno asociado a deficiencia de MC4R, expresión en exceso de un mutante negativo dominante, u otro defecto, por ejemplo, obesidad, tal como una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos o de polipéptidos de MC4R que altera, por ejemplo, inhibe su expresión, actividad o estabilidad. Este término también se refiere a la expresión de MC4R en células o tipos de células en las que normalmente se expresa en individuos sanos, y no incluye la expresión de MC4R en células o tipos de células, por ejemplo, células tumorales, en las que MC4R no se expresa en individuos sanos.

Como se usa en el presente documento, el término "eficiencia de transporte" se refiere a la capacidad de una proteína mutante para ser transportada fuera del retículo endoplásmico a su localización nativa dentro de la célula, membrana celular, o en el entorno extracelular.

Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para potenciar el procesamiento de proteínas en el RE (que permite una conformación funcional), sin inhibir la proteína ya expresada en la localización celular apropiada (en el caso de un antagonista), o sin inducir internalización por receptor mediada por ligando de proteína de la localización celular apropiada (en el caso de un agonista), y potenciar la actividad de la proteína diana, produciendo así una respuesta terapéutica en un sujeto. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, que incluye los síntomas anteriores y marcadores clínicos sustitutos. Así, una respuesta terapéutica generalmente será una mejora o inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, obesidad o trastorno por atracón.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente reacciones inapropiadas cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que el compuesto se administra. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Agua o soluciones salinas acuosas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 18ª Edición, u otras ediciones.

El término "aproximadamente" debe significar generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Grados típicos, a modo de ejemplo, de error están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10 %, y más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Cantidades numéricas dadas en el presente documento son aproximadas, a menos que se establezca de otro modo, que significa que el término "aproximadamente" puede deducirse cuando no se establezca expresamente.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que el material referenciado se elimina del entorno en el que normalmente se encuentra. Así, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, es decir, componentes de las células en los que el material se encuentra o produce. En el caso de moléculas de ácidos nucleicos, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm sobre un gel, un ADNc, o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se corta

- preferentemente del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferentemente ya no se une a las regiones no codificantes no reguladoras, o a otros genes, localizados en la dirección 5' o en la dirección 3' del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En otra realización más, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, y similares. Así, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse a otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que está asociado en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a membrana. Un orgánulo aislado, célula, o tejido se extrae del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede estar, pero no necesita estar, purificado.
- 5 El término "purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a material, tal como un ácido nucleico o polipéptido MC4R, que ha sido aislado en condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína purificada está preferentemente sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociado en una célula. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente libre" se usa operacionalmente, en el contexto de las pruebas analíticas de material.
- 10 Preferentemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos el 50 % puro; más preferentemente, al menos el 90 % puro, y más preferentemente todavía al menos el 99 % puro. La pureza puede evaluarse por medios convencionales, por ejemplo, cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.
- 15 El término "Me" significa metilo, "Et" significa etilo y "Ac" significa acetilo.
- 20 El término "halógeno", a menos que se indique lo contrario, significa flúor, cloro, bromo o yodo. Grupos halógeno preferidos son flúor, cloro y bromo.
- El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, incluye radicales de hidrocarburo monovalente saturado que tienen restos lineales, ramificados o cíclicos (que incluyen restos bicíclicos y espirocíclicos fusionados y unidos por puente), o una combinación de los restos anteriores. Para que un grupo alquilo tenga restos cíclicos, el grupo
- 25 debe tener al menos tres átomos de carbono.
- El término "cicloalquilo", a menos que se indique lo contrario, incluye restos de alquilo cíclicos en los que alquilo es como se ha definido anteriormente. El uso del término "cicloalquilo" no debe considerarse como limitante del término "alquilo" a restos no cíclicos.
- El término "alquenilo", a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono en el que el alquilo es como se ha definido anteriormente y que incluye isómeros E y Z de dicho resto alquenilo.
- 30 El término "alquinilo", a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono en el que alquilo es como se ha definido anteriormente.
- El término "alcoxi", a menos que se indique lo contrario, incluye grupos O-alquilo en los que alquilo es como se ha definido anteriormente.
- 35 El término "arilo", a menos que se indique lo contrario, incluye un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático por eliminación de un hidrógeno, tal como fenilo o naftilo.
- El término "heterocíclico de 4 a 10 miembros", a menos que se indique lo contrario, incluye grupos heterocíclicos aromáticos y no aromáticos que contienen uno a cuatro heteroátomos cada uno seleccionado de O, S y N, en el que cada grupo heterocíclico tiene de 4 a 10 átomos en su sistema de anillos, y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos de O o S adyacentes. Grupos heterocíclicos no aromáticos incluyen grupos que tienen solo 4 átomos en su sistema de anillos, pero los grupos heterocíclicos aromáticos deben tener al menos 5 átomos en su sistema de anillos. Los grupos heterocíclicos incluyen sistemas de anillos benzo-condensados. Un ejemplo de un grupo heterocíclico de 4 miembros es azetidino (derivado de azetidina). Un ejemplo de un grupo heterocíclico de 5 miembros es tiazolilo y un ejemplo de un grupo heterocíclico de 10 miembros es quinolinilo. Ejemplos de grupos heterocíclicos no aromáticos son pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tiofanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditanilo, ditolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolilo y quinolizino. Ejemplos de grupos heterocíclicos aromáticos son piridinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizino, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo. Restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición que incluye 1-oxa-6-aza-espiro[2.5]oct-6-ilo. Los grupos anteriores, como derivaron de los grupos enumerados anteriormente, pueden estar unidos en C o unidos en N donde tal sea posible. Por ejemplo, un grupo
- 40
- 45
- 50
- 55

derivado de pirrol puede ser pirrol-1-ilo (unido en N) o pirrol-3-ilo (unido en C). Además, un grupo derivado de imidazol puede ser imidazol-1-ilo (unido en N) o imidazol-3-ilo (unido en C).

La expresión "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s)", a menos que se indique lo contrario, incluye sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en un compuesto usado en los métodos de la invención. Compuestos que son básicos en la naturaleza son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden usarse para preparar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de tales compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como las sales acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, disilato, estolato, esilato, etilsuccinato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, teoclato, tosilato, trietyoduro y valerato. Como un único compuesto puede incluir más de un resto ácido o básico, un compuesto tal puede incluir mono, di o tri-sales en un único compuesto.

Receptor de melanocortina 4

Los receptores de melanocortina (MC) son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G de siete dominios transmembranarios que activan la generación del segundo mensajero AMP cíclico (AMPC). Hasta la fecha se han aislado cinco receptores de MC: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R. MC2R es el receptor para la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). MC4R humano tiene 332 aminoácidos de longitud.

El receptor de melanocortina 4 (MC4R) participa en la regulación del peso corporal (Graham et al, Nat. Genetics 1997; 17: 273-4). MC4R se expresa en el cerebro, que incluye el hipotálamo, que influye en el consumo de alimentos. La señalización mediante MC4R estimula las vías neurales anorexigénicas. Ratones nulos en MC4R desarrollan obesidad de aparición tardía con hiperglucemia e hiperinsulinemia. Ratones que carecen de un alelo de MC4R (heterocigotos) tienen peso corporal intermedio entre ratones nulos no mutantes y homocigóticos. En seres humanos, la deficiencia de MC4R es la forma monogénica más común de obesidad (Farooqi et al., New Engl. J. Med. 2003; 348: 1085-95). Ratones transgénicos que expresan en exceso un antagonista de MC4R endógeno, proteína relacionada con agouti (AgRP), presentaron elevado aumento de peso, consumo de alimentos y longitud del cuerpo en comparación con compañeros de camada no transgénicos (Ollman et al., Science 1997; 278: 135-37).

Se han identificado numerosas mutaciones, encontradas principalmente en individuos obesos, en el gen MC4R humano, que incluye mutaciones de desplazamiento del marco, finalizadoras y de aminoácido (Nijenhuis et al., J. Biol. Chem. 2003; 278: 22939-45). Al menos dos grupos de investigadores han confirmado que MC4R está mutado en aproximadamente el 5 % de los individuos obesos. Portadores de mutaciones de MC4R demostraron hiperfagia e hiperinsulinemia, tuvieron densidad mineral ósea por encima del promedio y crecimiento lineal más rápido que los sujetos de control del mismo IMC. Farooqi et al. también han encontrado que las propiedades de señalización de los receptores de MC4R mutante se correlacionaron con la gravedad de la obesidad.

Varios autores han revisado ahora los recientes avances a nuestro entendimiento de la genética de MC4R en la obesidad de aparición temprana (véase por ejemplo, Farooqi IS, O'Rahilly S, Int J Obes (Lond), 2005 Oct, 29(10), 1149-52; Govaerts C, Srinivasan S, Shapiro A, Zhang S, Picard F, Clement K, Lubrano-Berthelier C, Vaisse C, Peptides, 2005 Oct, 26(10), 1909-19; Tao YX, Mol Cell Endocrinol, 2005 Jul 15, 239(1-2), 1-14; Farooqi IS, O'Rahilly S, Annu Rev Med, 2005, 56, 443-58). Por ejemplo, en un paciente con obesidad de aparición temprana grave, se ha encontrado que un modo autosómico-dominante de herencia de una mutación de MC4R es debido a un efecto negativo dominante causado por la dimerización de receptor (Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Gruters A, Diabetes, 2003 Dec, 52(12), 2984-8).

Se espera pérdida de función para MC4R con algunas mutaciones, ya que la mayoría de las mutaciones identificadas hasta la fecha son sustituciones de aminoácidos no conservativas. Esto se ha demostrado para varios MC4R encontrados en individuos obesos. Además, varias mutaciones se han asociado a expresión reducida de MC4R en la superficie celular (Gu et al., Diabetes 1999, 48: 635-39; Nijenhuis et al., arriba). Por ejemplo, en un cribado de once mutaciones de aminoácidos MC4R que fueron solo encontradas en individuos obesos, y que se localizaron fuera de la región del extremo N de MC4R (que no participa en la unión de ligando), diez presentaron unión específica más baja en la superficie celular con respecto al ligando de la hormona estimulante de α -melanocitos marcada (α -MSH) 125 I-[Nle⁴,D-Phe⁷] α -MSH, en comparación con MC4R no mutante. Nijenhuis et al., arriba, en 22941. Se determinó que la reducida unión específica reflejaba una expresión de la superficie celular más baja, ya que la afinidad por ligando entre los mutantes era en gran medida similar al receptor no mutante, como se representa en la Tabla 1 a continuación (valores de CI_{50} en nM +/- E.E.):

Tabla 1:

Mutante	CI ₅₀		Mutante	CI ₅₀	
	WT 55 ± 7,4	WT 9,1 ± 0,64		WT 55 ± 7,4	WT 9,1 ± 0,64
	α-MSH	¹²⁵ I-[Nle ⁴ ,D-Phe ⁷]α-MSH		α-MSH	¹²⁵ I-[Nle ⁴ ,D-Phe ⁷]α-MSH
T112M	28 ± 2,7	5,4 ± 0,64	I317T	38 ± 3,0	7,8 ± 0,44
V253I (A700G)	43 ± 2,0	8,1 ± 0,25	I301T	24 ± 4,8	5,8 ± 0,78
S30F/ G252S	67 ± 8,8	6,7 ± 0,30	R165W (C886T)	40 ± 13	8,7 ± 1,0
L250Q	5,8 ± 0,35	3,4 ± 0,69	R165Q (C886A)	40 ± 11	8,9 ± 1,2
I170V	59 ± 5,7	8,9 ± 1,7	P78L	-	-

Nijenhuis et al., J. Biol. Chem. 2003; 278: 22939-22945, a 22942.

Incluso dos mutantes con afinidad de unión más alta (L250Q y T112M) demostraron expresión de la superficie celular más baja según experimentos de unión de saturación. Además, todos los mutantes demostraron respuesta máxima reducida (activación de receptor como se mide usando un ensayo de adenilil ciclasa) tras la unión de α-MSH. En particular, Nijenhuis et al. llegaron a la conclusión a partir de resultados de datos inmunocitoquímicos que los mutantes P78L, R165Q y R165W se expresan, pero son retenidos intracelularmente.

Un estudio adicional identificó las siguientes mutaciones de MC4R: I125K; C271Y; T11A (A434G); A175T; I316L; N97D; N62S; y C271R (Farooqi et al., New Eng. J. Med. 2003; 348; 1085-95). De estas mutaciones, todas presentaron actividad reducida, o ninguna actividad, *in vitro* evaluada usando un ensayo de gen indicador de luciferasa sensible a AMPc. Sin embargo, este grupo encontró que tres variantes V103I; I251L; y T112M no tienen efecto sobre la señalización de MC4R. Mutaciones asociadas a la infancia, es decir, obesidad de aparición temprana fueron S58C, N62S, Y157S, C271Y, P78L, G98R, que produjeron ya sea unión de ligando reducida (S58C, N62S, Y157S, C271Y) o no (P78L, G98R), también demostraron alteraciones proporcionales en la producción de AMPc estimulada por [Nle⁴,D-Phe⁷]α-MSH (Tao et al., Endocrinology 2003; 144(10):4544-51).

Un estudio final identificó los siguientes mutantes en MC4R; I251L (A1144C); F51L (T544C); M200V (A991G); T5T (C408T) (Branson et al., New Eng. J. Med. 2003; 348: 1096-1103).

Además de obesidad, MC4R participa en el trastorno por atracón. Según el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Text Revision (DSM-IV-TR™, Cuarta Ed.), el trastorno por atracón implica episodios recurrentes de comer una cantidad anormalmente grande de comida y experimentar sentimientos de falta de control del comportamiento. En un estudio de 469 sujetos obesos blancos, se encontró que mientras que solo un pequeño porcentaje de sujetos obesos fueron diagnosticados con trastorno por atracón, todos los sujetos obesos con mutaciones de MC4R fueron diagnosticados con trastorno por atracón (Branson et al., arriba).

Estructura de MC4R y unión de ligando

Agonistas de melanocortina endógenos contienen la secuencia His-Phe-Arg-Trp, que es importante para el reconocimiento y la estimulación molecular de receptores de melanocortina. Se determinaron en un estudio los determinantes moleculares de la unión de ligando de MC4R empleando una gran matriz de ligandos (Nickolls et al., Pharmacol Exp Ther 2003; 304(3):1217-27). Se usó modelado molecular del receptor para identificar Phe284, en el dominio 7 transmembranario (TM) (TM7), como un posible sitio de interacción de ligando. La mutación de Phe284 a alanina redujo la afinidad de unión y potencia de péptidos que contenían L-Phe hasta 71 veces, pero no afectó la unión de péptidos lineales que contenían D-Phe. Estos datos fueron coherentes con una interacción hidrófoba entre Phe7 de α-MSH y Phe284. Segundo, se examinó el efecto de una mutación que existía de forma natural en TM3 (I137T), que, como se describió anteriormente, está asociada a obesidad. Esta mutación disminuyó la afinidad y potencia de péptidos rígidos cíclicos, pero no péptidos más flexibles, coherente con un efecto indirecto de la mutación sobre la estructura terciaria del receptor. También se determinaron restos que respaldaban la selectividad por ligando para MC4R con respecto a MC3R. La mutación de Ile125 (TM3) de MC4R al resto equivalente de MC3R (fenilalanina) disminuyó selectivamente la afinidad y potencia de ligandos selectivos de MC4R. Este efecto fue imitado por la mutación de MC3R recíproca F157I. La magnitud de este efecto indica que este locus no es de mayor importancia. Sin embargo, se propuso que una mutación de isoleucina/ fenilalanina podía afectar la orientación de Asp122, que se ha identificado como un determinante mayor de afinidad de unión de ligando.

Otros han determinado que se requirió Tyr268 para la interacción selectiva con el antagonista de MC4R endógeno la proteína Agouti, además de para la selectividad de otro agonista de MC4R (Oosterom et al., J. Biol. Chem. 2001; 276(2):931-6). La proteína Agouti normalmente se expresa en la piel y es un antagonista del MC4R natural (Kiefer et al., Biochemistry 1997; 36: 2084-2090).

5 Agonistas y antagonistas de MC4R

Según la invención, agonistas y antagonistas de MC4R incluyen los compuestos representados en las Figuras 1-8 y 10 en el presente documento y descritos además en los Ejemplos 3 y 4 a continuación.

Agonistas naturales (ligandos) de MC4R incluyen α -MSH, ACTH, β -MSH y γ -MSH (en orden de la afinidad más alta a la más baja). Otros ligandos de MC4R, que incluyen agonistas y antagonistas, que han sido descritos hasta la fecha son predominantemente péptidos (patente de EE.UU. 6.060.589) y análogos de péptidos cíclicos (patente de EE.UU. 6.613.874 a Mazur et al.). También se ha diseñado una serie de agonistas del péptido MC4R (Sun et al., Bioorg Med Chem 2004; 12(10):2671-7). Además, Nijenhuis et al. (Peptides 2003; 24(2):271-80) describieron el desarrollo y la evaluación de compuestos antagonistas de melanocortina que fueron selectivos para MC4R. Se encontró que un compuesto, designado Ac-Nle-Gly-Lys-D-Phe-Arg-Trp-Gly-NH(2) (SEQ ID NO:9), era el compuesto de MC4R más selectivo, con una selectividad de 90 y 110 veces para MC4R en comparación con MC3R y MC5R, respectivamente. La posterior modificación dio el compuesto Ac-Nle-Gly-Lys-D-Nal(2)-Arg-Trp-Gly-NH(2) (SEQ ID NO: 10), un antagonista de MC4R selectivo con 34 veces de selectividad por MC4R/MC3R y 109 veces por MC4R/MC5R. Ambos compuestos fueron activos *in vivo*, y cruzaron la barrera hematoencefálica. Además, las patentes de EE.UU. N.º 6.054.556 y 5.731.408 describen familias de agonistas y antagonistas para MC4R que son heptapéptidos lactámicos que tienen una estructura cíclica.

Otros antagonistas de MC4R de alta afinidad se describen en Grieco et al. (J Med Chem 2002; 24:5287-94). Estos antagonistas cíclicos fueron diseñados basándose en el conocido antagonista de alta afinidad SHU9119 (Ac-Nle4-[Asp5-His6-DNal(2')7-Arg8-Trp9-Lys10]-NH(2)) (SEQ ID NO: 11). Los análogos de SHU9119 se modificaron en la posición 6 (His) con aminoácidos no convencionales. Un compuesto que contenía una sustitución Che en la posición 6 es un antagonista de MC4R de alta afinidad ($CI_{50} = 0,48$ nM) con 100 veces de selectividad con respecto a MC3R. Otro compuesto con una sustitución Cpe en la posición 6 también era un antagonista de MC4R de alta afinidad ($CI_{50} = 0,51$ nM) con una selectividad de 200 veces con respecto a MC3R. Se usó modelado molecular para examinar las propiedades conformacionales de los péptidos cíclicos modificados en la posición 6 con aminoácidos conformacionalmente restringidos. Véase, por tanto, Grieco et al., Peptides 2006; 27(2):472-81.

Se han desvelado varios ligandos de MC4R no de péptido en las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas 2003/0158209 a Dyck et al. y 2004/082590 a Briner et al. Por tanto, la patente de EE.UU. N.º 6.638.927 a Renhove et al. describe guanidobenzamidas pequeñas de bajo peso molecular como agonistas de MC4R específicos. Richardson et al. han descrito novedosas arilpiperizinas que son agonistas de MC4R (J Med Chem 2004; 47(3):744-55). Las patentes de EE.UU. N.º 6.979.691 a Yu et al. y 6.699.873 a Maguire también describen compuestos no de péptido que se unen selectivamente a MC4R.

El documento WO 99/55679 a Basu et al. desvela derivados de isoquinolina, compuestos de no péptido de molécula pequeña, que muestran bajas afinidades (micromolares) por MC1R y MC4R, reducción de inflamación dérmica inducida por ácidos araquidónicos, y reducciones de peso corporal y consumo de alimentos.

El documento WO 99/64002 a Nargund et al. también desvela derivados de espiropiperidina como agonistas de receptores de melanocortina, útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como obesidad, diabetes y disfunción sexual.

Se han descrito otros antagonistas de MC4R no de péptido. Así, las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas 2003/0176425 y 2003/0162819 a Eisinger desvelan novedosos derivados de 1,2,4-tiadiazol y 1,2,4-tiadiazolio, respectivamente, como antagonistas o agonistas de MC4R. Estas solicitudes también desvelan el uso de estos compuestos para tratar obesidad.

Varios antagonistas de receptores de melanocortina han demostrado que son antagonistas competitivos, es decir, que compiten por la unión con un ligando. Por ejemplo, se mostró que el antagonista de melanocortina la proteína de señalización agouti (ASIP) tiene características coherentes con el antagonismo competitivo observado en hMC1R, y se observó comportamiento más complejo en los otros receptores (Yang et al., Mol. Endocrinology 1997; 11(3): 274-280). Similarmente, ACTH, el ligando natural para MC2R, no puede ser más competitivo para la unión por α -, β - o γ -MSH (Abdel-Malek et al., Cell. Mol. Life Sci. 2001; 48: 434-41).

Otros compuestos de unión de MC4R se describen a continuación: Bednarek y Fong, Exp Opn Ther Patents 2004; 14: 327-36; Ujjainwalla et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005;15(18):4023-8; documentos WO 03/07949 (Merck); WO 03/61660 (Eli Lilly); WO 03/09847 (Amgen); WO 03/09850 (Amgen); WO 03/31410 (Neurocrine Biosciences); WO 03/94918 (Neurocrine Biosciences); WO 03/68738 (Neurocrine Biosciences); WO 03/92690 (Procter and Gamble); WO 03/93234 (Procter and Gamble); WO 03/72056 (Chiron); WO 03/66597 (Chiron); WO 03/66587 (Chiron); WO 03/66587 (Chiron); WO 02/67869 (Merck); WO 02/68387 (Merck); WO 02/00259 (Taisho); WO 02/92566 (Taisho); Tran et al, Bioorg Med Chem Lett. 2006 [publicación electrónica antes de impresión]; Pontillo et al., Bioorg Med

Chem Lett. 2005;15(23):5237-40; Pontillo et al., Bioorg Med Chem Lett. 2005;15(10):2541-6; Pontillo et al., Bioorg Med Chem Lett. 2004;14(22):5605-9; Cheung et al., Bioorg Med Chem Lett. 2005; 15(24):5504-8; Yan et al., Bioorg Med Chem Lett. 2004; 15(20): 4611-4; Hsiung et al., Endocrinology. 2005 Dec;146(12):5257-66; y Todorovic et al., Peptides. 2005 Oct;26(10):2026-36.

- 5 Agonistas o antagonistas no de péptidos de MC4R específicos contemplados para su uso en los métodos presentemente reivindicados se describen en Sebhat et al., J Med Chem 2002; 45: 4589 (compuestos **1** y **6**); Richardson et al., J Med Chem. 2004; 47: 744 (compuesto **2**); Arasasingham et al., J Med Chem. 2003; 46: 9 (compuesto **3**); documento WO 02/062766 a Millennium Pharmaceuticals (compuesto **4**); Pedemonte et al., J. Clin. Inves. 2005; 115: 2564-71 (compuesto **5**); Tran et al., Bioorg Med Chem Lett. 2005; 15: 3434-38 (compuesto **7**); Xi et al., Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14: 377-81 (compuesto **8**); Vos et al., J Med Chem. 2004; 47: 1602-04 (compuesto **9**); Pan et al., Bioorg Med Chem Lett. 2003; 11: 185 (compuesto **10**); Marsilje et al., Bioorg Med Chem Lett. 2004. 14: 3721 (compuesto **11**); Ujjainpareda et al., Bioorg Med Chem Lett. 2003; 133: 4431 (compuesto **12**); Nickolls et al., J Pharmacol Exp Therap. 2005; 313: 1281-1288 (compuestos **13-17**); Schioth et al., Biophys Biochem Res Comm. 2003; 399-405 (compuesto **18**); Benoit et al., J. Neurosci. 2000; 20: 3442-48 (compuestos **19** y **20**); Vos et al., Bioorg Med Chem Lett. 2006; 15: 2302 (compuesto **21**); Tucci et al., Bioorg Med Chem Lett 2005; 15: 4389 (compuesto **22**); Pontillo et al., Bioorg Med Chem Lett. 2005; 15: 4615-18 (compuesto **23**); Chaki et al., J Pharmacol Exp Ther. 2003; 304: 818 (compuesto **24**); Chaki et al., Pharmacol Biochem Behav. 2005; 82: 621 (compuesto **25**).

Los compuestos 1, 2, 5, 6, 8, 10, 12, 13-17 y 19 descritos anteriormente son agonistas de MC4R, mientras que los compuestos 3, 4, 7, 9, 11, 18 y 20 son antagonistas.

- 20 Antagonistas específicos del péptido MC4R contemplados para su uso en los métodos presentemente reivindicados son Ac-Cys-Glu-His-D-(2')Nal-Arg-Trp-Gly-Cys-Pro-Pro-Lys-Asp-NH(2) (SEQ ID NO: 12); Ac-Cys-Nle-Arg-His-D-(2')Nal-Arg-Trp-Gly-Cys-NH(2) (SEQ ID NO: 13); Ac-Cys-Glu-His-D-Phe (3,4-di-Cl)-Arg-Trp-Gly-Cys-Pro-Pro-Lys-Asp-NH(2) (SEQ ID NO: 14); Ac-Nle-c[Asp-Che-DNal(2')]-Arg-Trp-Lys-NH(2) (SEQ ID NO: 15); Ac-Nle-c[Asp-Cpe-DNal(2')]-Arg-Trp-Lys-NH(2) (SEQ ID NO: 16); ciclo(1-6)-suc-His-DPhe-Arg-Trp-Lys-NH(2) (SEQ ID NO: 17); y Ac-DArg[Cys-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Cys]-NH(2) (SEQ ID NO: 18).

Se contemplan agonistas y antagonistas basados en péptidos con cadenas laterales que no existen de forma natural y peptidomiméticos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.650.489; véase, por tanto, la patente de EE.UU. N.º 6.090.912, especialmente en la Sección 5.5. Por ejemplo, las cadenas laterales de los compuestos **18-20** y las cadenas laterales en la clase de compuestos representados en la Figura 16 pueden no existir de forma natural.

- 30 Se ha mostrado que MC4R experimenta internalización de receptor mediada por ligando (Gao et al., J Pharmacol Exp Ther 2003; 307(3):870-7). La exposición previa de células GT1-7 que expresan MC4R endógeno al agonista la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) produjo formación AMPc alterada a una segunda exposición de α -MSH (Shinyama et al., Endocrinology 2003; 144(4):1301-14). Esto no se observó con la administración de un antagonista. La internalización inducida por ligando es desencadenada en los receptores acoplados a proteína G por fosforilación de restos de serina o treonina entre el segmento del extremo C y el tercer bucle intracelular. La fosforilación promueve la unión de beta-arrestinas, que se dirigen a receptores para la internalización y degradación por lisosomas. Datos recientes demostraron que la cola citosólica de una proteína de tipo atractina (ALP) se unía al dominio del extremo C de MC4R (Yeo et al., Biochem. J. 2003; 376). Así, una chaperona que aumenta la estabilidad de MC4R sobre la superficie celular será especialmente beneficiosa dada la corta semivida del receptor sobre la superficie.

Se espera además que la chaperona, que es un agonista que se une reversiblemente a un polipéptido MC4R en el RE, no induzca internalización de receptor. Similarmente, donde el compuesto de chaperona es un antagonista, se espera que no inhiba la actividad de receptor una vez el receptor está en la superficie celular.

Métodos de tratamiento

- 45 La presente invención también proporciona un método de tratamiento de una afección asociada a estabilidad de MC4R reducida, tal como obesidad, o que tiene factores de riesgo para desarrollar obesidad, administrando a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una chaperona para potenciar la estabilidad y/o actividad de MC4R. El individuo que va a tratarse puede ser un individuo que no presenta una mutación en MC4R que afecta el plegamiento y procesamiento de MC4R, pero que se beneficiaría de la elevada estabilidad de MC4R, por ejemplo, en neuronas. El individuo que va a tratarse también puede tener una mutación en MC4R que afecta el plegamiento y procesamiento de la proteína MC4R, y presenta reducida estabilidad de MC4R en neuronas.

Formulación, dosificación y administración

- Una chaperona farmacológica específica para MC4R, es decir, un agonista o antagonista de MC4R u otro compuesto de unión de MC4R como se describió anteriormente, o como se identificó mediante los métodos de cribado de la invención como se exponen más adelante, se formula ventajosamente en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La chaperona puede designarse un principio activo o agente terapéutico para el tratamiento de obesidad u otro trastorno que implique la expresión de la superficie celular de MC4R reducida o transporte a la superficie celular.

La concentración del principio activo (chaperona farmacológica) depende de la dosis y pauta de administración deseada, como se trata más adelante. Intervalos de dosis a modo de ejemplo del principio activo son de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día; de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por día; o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg por día.

Pueden proporcionarse compuestos terapéuticamente eficaces a un sujeto en formulaciones estándar, y pueden incluir cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como excipientes, lubricantes, diluyentes, aromatizantes, colorantes, tampones y disgregantes. Formulaciones estándar son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Mack Publishing Company, 2000. La formulación puede producirse en unidades de dosificación útiles para administración por cualquier vía que permitirá que la chaperona terapéutica cruce la barrera hematoencefálica. Vías a modo de ejemplo incluyen vías oral, parenteral, transmucosa, intranasal, inhalación o transdérmica. Vías parenterales incluyen administración intravenosa, intrarteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intratecal e intracraneal.

En una realización, una chaperona farmacológica para MC4R, particularmente aquellas representadas en las Figuras 1-8 y 10 en el presente documento, se formula en una forma de dosificación oral sólida. Para administración por vía oral, por ejemplo, para una molécula pequeña, la composición farmacéutica puede tomar la forma de un comprimido o cápsula preparado por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden ser recubiertos por métodos muy conocidos en la técnica. Preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes según convenga.

En otra realización, se formula una chaperona para MC4R para administración parenteral. La chaperona puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Además de las formulaciones descritas previamente, la chaperona también puede formularse como una preparación de liberación lenta. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

En otra realización, la chaperona puede ser administrada en una vesícula, particularmente un liposoma.

En otra realización, la chaperona puede ser administrada en un modo de liberación controlada. Por ejemplo, un agente terapéutico puede administrarse usando infusión intravenosa con una bomba continua, en una matriz de polímero tal como ácido poliláctico/glutámico (PLGA), en una pella que contiene una mezcla de colesterol y el principio activo (SilasticR™; Dow Corning, Midland, MI; véase la patente de EE.UU. N.º 5.554.601), por implantación subcutánea, o por parche transdérmico.

Terapia de combinación. La composición farmacéutica también puede incluir otras sustancias biológicamente activas en combinación con el compuesto candidato. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sibutramina, orlistat (Xenical®), leptina, neuropéptido Y, colecistoquinina, o GLP-1.

Ensayos de cribado para chaperonas farmacológicas para MC4R

La presente invención proporciona además un método de identificación de un compuesto de chaperona candidato que modula la estabilidad, actividad y/o localización de superficie celular de un polipéptido MC4R. En una realización, la presente invención proporciona un método de identificación de una chaperona para la proteína MC4R, que comprende poner un compuesto de prueba marcado o sin marcar en contacto con la proteína MC4R o un

fragmento de la misma y medir la cantidad del compuesto de prueba unido a la proteína MC4R o al fragmento de la misma. Esto puede lograrse, por ejemplo, del siguiente modo:

(a) poner en contacto una primera célula con un compuesto de prueba durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula responda a dicho contacto con el compuesto de prueba;

5 (b) determinar la estabilidad conformacional, actividad y/o localización de superficie celular de un polipéptido MC4R (o un fragmento del mismo que comprende un dominio de unión de ligando) en la célula (o sobre la superficie celular) puesta en contacto en la etapa (a); y

10 (c) comparar la estabilidad, actividad y/o localización de superficie celular del polipéptido MC4R determinado en la etapa (b) con la de un polipéptido MC4R en una célula de control que no ha sido puesto en contacto con el compuesto de prueba;

15 en el que un cambio detectable en la estabilidad, actividad y/o localización de superficie celular del polipéptido MC4R en la primera célula en respuesta al contacto con el compuesto de prueba en comparación con el nivel de estabilidad del polipéptido MC4R en la célula de control que no ha sido puesto en contacto con el compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba modula la estabilidad del polipéptido MC4R y es un compuesto candidato para el tratamiento de un trastorno asociado a estabilidad o actividad de MC4R reducida.

20 La célula puede o bien ser una célula hospedadora transformada con un MC4R no mutante o mutante no endógeno, o una célula que expresa endógenamente MC4R, que incluye MC4R mutantes y no mutantes. Tales células incluyen las "neuronas de obesidad" tales como las células GT1-7, descritas anteriormente, aquellas descritas en MacKenzie et al., Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents 2004; 4: 113-117, que expresan endógenamente MC4R, o células transformadas que expresan MC4R marcado normal o mutado tal como las células HEK293 descritas en Blondet et al., J Biochem 2004; 135: 541-546 y más adelante en los ejemplos.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un método de identificación de una chaperona para la proteína MC4R, que comprende poner un compuesto de prueba marcado en contacto con células o una fracción de membrana celular que contiene la proteína MC4R, y medir la cantidad del compuesto de prueba marcado unido a las células o la fracción de membrana celular.

30 Pueden emplearse numerosos métodos de cribado de alto rendimiento (HTS) para cribar grandes números (por ejemplo, cientos, miles, decenas de miles) de compuestos de prueba simultáneamente para unirse a un MC4R. Un compuesto de prueba puede ser, sin limitación, una molécula orgánica o inorgánica pequeña (preferida), un péptido o un polipéptido (incluyendo un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, u otra molécula inmunespecífica), una molécula de oligonucleótido (tal como un aptámero), una molécula de polinucleótido, o una quimera o derivado de la misma. Los compuestos de prueba que son chaperonas candidatas que se unen específicamente a un polipéptido MC4R pueden identificarse usando ensayos basados en células y/o libres de células. Varios métodos de ensayos automatizados que han sido desarrollados en los últimos años permiten el cribado de decenas de miles de compuestos en un corto periodo de tiempo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.585.277, 5.679.582 y 6.020.141). Por ejemplo, un grupo informó de la identificación de un agonista de MC4R de arilpiperazina mediante cribado dirigido iterativo de bibliotecas sesgadas de receptores acoplados a proteína G no de peptidilo (Richardson et al., J Med Chem 2004; 47(3):744-55). Tales métodos de HTS son particularmente útiles, por ejemplo, en micromatrices.

40 Para el cribado, clases purificadas de compuestos que pueden identificarse incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas (es decir, moléculas orgánicas o inorgánicas que son inferiores a aproximadamente 2 kilodaltons (kD) de peso molecular, y, más preferentemente, inferiores a aproximadamente 1 kD de peso molecular). Éstos son componentes de bibliotecas de compuestos.

45 Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de partida" se refiere a una entidad molecular seleccionada de un cribado primario de antagonistas o agonistas de MC4R que pueden ser eficaces por sí mismos en estabilizar la conformación de proteína de proteína MC4R no mutante, o que pueden modificarse por desarrollo adicional para generar un compuesto farmacéutico apropiado.

50 **Bibliotecas de compuestos.** Bibliotecas de ligandos orgánicos pequeños de alta pureza y agonistas de péptido que tienen actividades farmacológicas bien documentadas están disponibles de Sigma-Aldrich (LOPAC LIBRARY™ y LIGAND-SETS™). También disponible de Sigma-Aldrich es Aldrich Library of Rare Chemicals, que es una biblioteca variada de más de 100.000 compuestos de molécula pequeña, que incluyen extractos de plantas y extractos de cultivo microbiano. Otras bibliotecas de compuestos están disponibles de Tripos (LeadQuest®) y TimTech (incluyendo bibliotecas dirigidas para moduladores de cinasa).

55 Otras empresas que suministran o han suministrado bibliotecas de compuestos del tipo adecuado para cribar según la invención incluyen las siguientes: 3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc.; Advanced ChemTech; Abinitio PharmaSciences; Albany Molecular; Aramed Inc.; Annovis, Inc. (antiguamente Bearsden Bio, Inc.); ASINEX; AVANT Immunotherapeutics; AXYS Pharmaceuticals; Bachem; Bentley Pharmaceuticals; Bicol Group; Biofor Inc.; BioProspect Australia Limited; Biosepra Inc.; Cadus Pharmaceutical Corp.; Cambridge Research Biochemicals;

Cetek Corporation; Charybdis Technologies, Inc.; ChemBridge Corporation; ChemDiv, Inc.; ChemGenics Pharmaceuticals Inc.; ChemOvation Ltd.; ChemStar, Ltd.; Chrysalon; ComGenex, Inc.; Compugen Inc.; Cytokinetics; Dextra Laboratories Ltd.; Discovery Partners International Inc.; Discovery Technologies Ltd.; Diversa Corporation; Dovetail Technologies, Inc.; Drug Discovery Ltd.; ECM Pharma; Galilaeus Oy; Janssen Pharmaceutica; Jerini Bio Tools; J-Star Research; KOSAN Biosciences, Inc.; KP Pharmaceutical Technology, Inc.; Lexicon Genetics Inc.; Libris Discovery; MicroBotanica, Inc.; MicroChemistry Ltd.; MicroSource Discovery Systems, Inc.; Midwest Bio-tech Inc.; Molecular Design & Discovery; MorphoSys AG; Nanosyn, Inc.; Ontogen Corporation; Organix, Inc.; Pharmacopeia, Inc.; Pherin Pharmaceuticals; Phytera, Inc.; PTRL East, Inc.; REPLICor Inc.; RSP Amino Acid Analogues, Inc.; Sanofi-Synthelab (ahora Sanofi-Aventis) Pharmaceuticals; Sequitur, Inc.; Signature BioScience Inc.; Spectrum Info Ltd.; Talon Cheminformatics Inc.; Telik, Inc.; Tera Biotechnology Corporation; Tocris Cookson; Torrey Pines Institute for Molecular Studies; Trega Biosciences, Inc.; y WorldMolecules/MMD.

Además, el Instituto de Química y Biología Molecular (ICCB), mantenido por la Escuela Médica de Harvard, proporciona las siguientes bibliotecas químicas, que incluyen bibliotecas de productos naturales, para cribar: Chem Bridge DiverSet E (16.320 compuestos); Bionet 1 (4.800 compuestos); CEREP (4.800 compuestos); Maybridge 1 (8.800 compuestos); Maybridge 2 (704 compuestos); Peakdale 1 (2.816 compuestos); Peakdale 2 (352 compuestos); ChemDiv CombiLab and International (28.864 compuestos); Mixed Commercial Plate 1 (352 compuestos); Mixed Commercial Plate 2 (320 compuestos); Mixed Commercial Plate 3 (251 compuestos); Mixed Commercial Plate 4 (331 compuestos); ChemBridge Microformat (50.000 compuestos); Commercial Diversity Set 1 (5.056 compuestos); NCI Collections: Structural Diversity Set, versión 2 (1.900 compuestos); Mechanistic Diversity Set (879 compuestos); Open Collection 1 (90.000 compuestos); Open Collection 2 (10.240 compuestos); **Colecciones de bioactivos conocidas:** NINDS Custom Collection (1.040 compuestos); ICCB Bioactives 1 (489 compuestos); SpecPlus Collection (960 compuestos); ICCB Discretas Collections. Los siguientes compuestos de ICCB fueron recogidos individualmente de químicos en ICCB, Harvard, y otras instituciones colaboradoras: ICCB1 (190 compuestos); ICCB2 (352 compuestos); ICCB3 (352 compuestos); ICCB4 (352 compuestos). **Extractos de productos naturales:** NCI Marine Extracts (352 pocillos); Organic fractions - NCI Plant and Fungal Extracts (1.408 pocillos); Philippines Plant Extracts 1 (200 pocillos); ICCB-ICG Diversity Oriented Synthesis (DOS) Collections; DDS1 (DOS Diversity Set) (9600 pocillos).

Existen numerosas técnicas disponibles para crear bibliotecas de compuestos más centradas en vez de grandes y diversas. Chemical Computing Group, Inc. (Montreal) ha desarrollado software con un nuevo enfoque para el diseño de fármacos de alto rendimiento. El método de la empresa usa datos experimentales de cribado de alto rendimiento (HTS) para crear un modelo de QSAR (Relación Estructura-Actividad Cuantitativa) probabilístico, que es posteriormente usado para seleccionar elementos estructurales en una biblioteca combinatoria virtual. Se basa en estimación estadística en lugar del análisis de regresión estándar.

Además, ArQule, Inc. (Woburn, MA) también ha integrado tecnologías para realizar la producción automatizada de alto rendimiento de compuestos químicos y para suministrar estos compuestos de estructura conocida y alta pureza en cantidades suficientes para la optimización de cabezas de serie. Su AMAP™ (Planta de Ensamblaje Molecular Automatizada) realiza síntesis químicas de alto rendimiento para cada fase de descubrimiento de compuestos.

Similarmente, los compuestos son frecuentemente proporcionados en bases de datos en línea o en CD-ROM para la "selección cuidadosa" selectiva de compuestos. Véase, por ejemplo, AbInitio PharmaSciences; ActiMol; Aral Biosynthetics; ASDI Biosciences; Biotechnology Corporation of America; Chembridge; ChemDiv; Florida Center - Heterocyclic Compounds; Microsource /MSDI; NorthStar; Peakdale; Texas Retaining Group; Zelinsky Institute; Advanced ChemTech; Ambinter; AnalytiCon Discovery; Aurora Fine Chemicals; Biofocus; Bionet /Key; Comgenex; Key Organics; LaboTest; Polyphor; SPECS y Biospecs; y Bharavi Laboratories.

Micromatrices

En una realización, el cribado de HTS para chaperonas para MC4R emplea micromatrices.

Matrices de proteína. Las matrices de proteína son sistemas de ensayos de unión en fase sólida que usan proteínas inmovilizadas sobre diversas superficies que están seleccionadas, por ejemplo, de vidrio, membranas, pocillos de microtitulación, placas de espectrómetro de masas, y perlas u otras partículas. Los ensayos de unión usando estas matrices son altamente paralelos y frecuentemente miniaturizados. Sus ventajas son que son rápidos, pueden ser automatizados, son capaces de alta sensibilidad, son económicos en su uso de reactivos, y proporcionan una abundancia de datos a partir de un único experimento.

Los formatos multi-pocillo automatizados son los sistemas de HTS mejor desarrollados. Los sistemas de cribado automatizados basados en placas de 96 o 384 pocillos son los más ampliamente usados. La tendencia actual en los sistemas de cribado basados en placa es reducir el volumen de los pocillos de reacción incluso más, y aumentar la densidad de los pocillos por placa (96 pocillos a 384 pocillos a 1.536 pocillos por placa). La tendencia produce elevada resolución, costes de biorreactivos espectacularmente reducidos por compuesto cribado, y una disminución en el número de placas que necesitan ser gestionadas por automatización. Para una descripción de matrices de proteína que pueden usarse para HTS, véanse, por ejemplo: Las patentes de EE.UU. N.º 6.475.809; 6.406.921; y 6.197.599; y las publicaciones internacionales N.º WO 00/04389 y WO 00/07024.

- Para la construcción de matrices, fuentes de MC4R o fragmentos de los mismos, tanto en forma no mutante como mutante, pueden incluir sistemas de expresión basados en células para proteínas recombinantes, purificación de fuentes naturales, producción *in vitro* por sistemas de traducción libres de células y métodos sintéticos para producir péptidos MC4R. Para matrices de captura y análisis de la función de proteínas, es frecuente el caso que los polipéptidos MC4R sean correctamente plegados y funcionales. Esto no es siempre el caso, por ejemplo, donde se extraen proteínas recombinantes de bacterias en condiciones desnaturalizantes; otros métodos (aislamiento de proteínas naturales, síntesis libres de célula) generalmente retienen la funcionalidad. Sin embargo, matrices de proteínas desnaturalizadas pueden todavía ser útiles en el cribado de chaperonas, ya que la chaperona probablemente se unirá a la proteína mutada mientras que no esté plegada en su conformación apropiada.
- El método de inmovilización usado es preferentemente aplicable a polipéptidos MC4R de diferentes propiedades (por ejemplo, fragmentos no mutantes, mutantes, de longitud completa, de longitud parcial, hidrófilos, hidrófobos, etc.), susceptibles a alto rendimiento y automatización, y generalmente compatibles con la retención de capacidad de unión a chaperonas. Pueden usarse tanto los métodos covalentes como no covalentes de inmovilización de proteínas MC4R. Sustratos para la unión covalente incluyen, por ejemplo, portaobjetos de vidrio recubiertos con reactivos de silano que contienen amino o aldehído (Telechem). En el sistema Versalinx™ (Prolinx), se logra el acoplamiento covalente reversible por interacción entre la proteína derivatizada con ácido fenildiborónico, y ácido salicilhidroxámico inmovilizado sobre la superficie de soporte. Métodos de acoplamiento covalente que proporcionan un enlace estable pueden aplicarse a un intervalo de proteínas. La unión no covalente de proteína no modificada se produce dentro de estructuras porosas tales como HydroGel™ (PerkinElmer), basado en un gel de poli(acrilamida) tridimensional.

Matrices basadas en células. Matrices basadas en células combinan la técnica de cultivo celular en conjunción con el uso de dispositivos fluidicos para la medición de la respuesta celular a compuestos de prueba en una muestra de interés, cribado de muestras para identificar moléculas que inducen un efecto deseado en células cultivadas, y selección e identificación de poblaciones de células con características novedosas y deseadas. El cribado de alto rendimiento (HTS) puede realizarse en células fijadas usando anticuerpos marcados fluorescentes, ligandos biológicos o chaperonas candidatas, y/o sondas de hibridación de ácido nucleico, o sobre células vivas usando indicadores y biosensores fluorescentes multicolores. La elección de cribados de células fijadas o vivas depende del ensayo basado en células específicas requerido.

Se conocen en la técnica numerosas técnicas de matriz basadas en una sola célula y en múltiples células conocidas. Técnicas recientemente desarrolladas tales como matrices con micro-patrones (descritas, por ejemplo, en las publicaciones PCT internacionales WO 97/45730 y WO 98/38490) y matrices microfluídicas proporcionan valiosas herramientas para análisis basados en células comparativos. Las micromatrices de células transfectadas son una técnica complementaria en la que características de matriz comprenden agrupaciones de células que expresan en exceso ADNc definidos. ADN complementarios clonados en vectores de expresión son impresos sobre portaobjetos de microscopio, que llegan a ser matrices vivas después de la adición de un reactivo de transfección de lípidos y células de mamífero adherentes (Bailey et al., *Drug Discov. Today* 2002; 7(18 Suppl): S113-8). Las matrices basadas en células se describen en detalle en, por ejemplo, Beske, *Drug Discov. Today* 2002; 7(18 Suppl): S131-5; Sundberg et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000; 11: 47-53; Johnston et al., *Drug Discov. Today* 2002; 7: 353-63; las patentes de EE.UU. N.º 6.406.840 y 6.103.479, y la solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 2002/0197656.

Para ensayos basados en células específicamente usados para cribar moduladores de canales de iones seleccionados por ligando, véase Mattheakis et al., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2001; 1: 124-34; y Baxter et al., *J. Biomol. Screen.* 2002; 7: 79-85.

Marcas detectables. Para la detección de moléculas tales como chaperonas para MC4R candidatas usando ensayos de cribado, puede usarse un ensayo funcional para seguir moléculas no marcadas como se describe en cualquier parte en el presente documento. Una molécula de interés (por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo, o una sonda de polinucleótidos) o una biblioteca de la misma también puede ser detectablemente marcada con un átomo (por ejemplo, un radionúclido), una molécula detectable (por ejemplo, fluoresceína), o un complejo que, debido a una propiedad física o química, sirve para indicar la presencia de la molécula de interés. Una molécula también puede ser detectablemente marcada cuando se une covalentemente a una molécula "indicadora" (por ejemplo, una biomolécula tal como una enzima) que actúa sobre un sustrato para producir un producto detectable. Marcas detectables adecuadas para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, biotina para tinción con avidina marcada o conjugado de estreptavidina, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, fluoresceína-isotiocianato (FITC), Texas red, rodamina, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente potenciada, lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7, FluorX de Amersham, SyBR Green I & II de Molecular Probes, y similares), radiomarcas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasa tales como fosfatasa alcalina, esterases y glucosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante, y similares), sustratos, cofactores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agentes cromogénicos y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.) perlas. Ejemplos de patentes que describen el uso de tales marcas incluyen las patentes de EE.UU. N.º: 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

Medios de detección de tales marcas son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden detectarse radiomarcas y marcas quimioluminiscentes usando película fotográfica o contadores de centelleo; pueden detectarse marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar luz emitida (por ejemplo, como en citometría de flujo activada por fluorescencia, FACS); y pueden detectarse marcas enzimáticas proporcionando la enzima con un sustrato y detectando, por ejemplo, un producto de reacción coloreado producido por la acción de la enzima sobre el sustrato.

Ensayos de estabilidad, localización y de actividad

Como se indica previamente, puede determinarse la estabilidad potenciada de MC4R midiendo un aumento en el polipéptido MC4R celular, determinando un aumento en el tráfico a la superficie celular, por ejemplo, como se determina por elevada expresión de la superficie celular, o determinando la elevada actividad de MC4R. Métodos no limitantes a modo de ejemplo para evaluar cada uno de los anteriores se describen a continuación.

Determinación de la estabilidad intracelular de MC4R. Son muy conocidos en la técnica los métodos de determinación de los niveles de proteína MC4R intracelular. Tales métodos incluyen transferencia Western, inmunoprecipitación seguido de transferencia Western (IP Western), o inmunofluorescencia usando una proteína MC4R marcada.

Determinación del tráfico de MC4R. La evaluación del tráfico de proteínas a través de la vía biosintética puede lograrse, por ejemplo, usando experimentos de seguimiento de pulsos con proteína de receptor marcada con ^{35}S , en conjunción con glucosidasas; o por inmunofluorescencia indirecta o directa para determinar la modificación de proteína durante el tráfico. Estos y otros métodos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Cell Biology* 2001; John Wiley & Sons.

Son muy conocidos en la técnica métodos de detección de tráfico alterado de proteínas. Por ejemplo, para proteínas que están N- y/o O-glucosiladas en el aparato de Golgi, puede usarse marcaje metabólico de seguimiento de pulsos usando proteínas radiactivamente marcadas, combinado con tratamiento de glucosidasa e inmunoprecipitación, para detectar si las proteínas están sometándose a glucosilación completa en el Golgi, o si están siendo retenidas en el RE en lugar de pasar al Golgi para glucosilación adicional.

Métodos sensibles para detectar visualmente la localización celular también incluyen microscopía fluorescente usando proteínas fluorescentes o anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, proteínas MC4R de interés pueden ser marcadas con, por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), proteína cian fluorescente, proteína amarilla fluorescente y proteína roja fluorescente, seguido de microscopía multicolor y de lapso de tiempo y microscopía electrónica para estudiar el desenlace de estas proteínas en células fijadas y en células vivas. Para una revisión del uso de obtención de imágenes fluorescentes en el tráfico de proteínas, véase Watson et al., *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(1):43-61. Para una descripción del uso de microscopía confocal para la co-localización intracelular de proteínas, véase Miyashita et al., *Methods Mol Biol.* 2004; 261:399-410.

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) es un método ultrasensible y no invasivo de detección capaz de resolución de una sola molécula y en tiempo real (Vukojevic et al., *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(5): 535-50). SPFI (obtención de imágenes de fluorescencia de una sola molécula) usa la alta sensibilidad de la fluorescencia para visualizar moléculas individuales que han sido selectivamente marcadas con partículas fluorescentes pequeñas (Cherry et al., *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 5): 1028-31). Para la localización de proteínas dentro de balsas de lípidos, véase Latif et al., *Endocrinology* 2003; 144(11): 4725-8). Para una revisión de obtención de imágenes de células vivas, véase Hariguchi, *Cell Struct Funct* 2002; 27(5):333-4).

También se usa microscopía de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para estudiar la estructura y localización de proteínas en condiciones fisiológicas (Periasamy, *J Biomed Opt* 2001; 6(3): 287-91).

Para proteínas residentes en la membrana plasmática, pueden usarse ensayos menos sensibles para detectar si están presentes sobre la membrana. Tales métodos incluyen inmunohistoquímica de células fijadas, o marcaje de células completas usando ligando radiomarcado (por ejemplo, ^{125}I).

Determinación de la expresión de la superficie celular de MC4R. Una vez se ha identificado un compuesto candidato, la siguiente etapa es determinar si el compuesto candidato puede potenciar la cantidad de MC4R enviada a la superficie celular. Pueden usarse numerosos ensayos para evaluar la expresión del receptor de la superficie celular cuantitativamente. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de unión de ligando radiactivos, usando por ejemplo, ^{125}I -MSH, para determinar la unión a cualquier célula completa que expresa MC4R o a fracciones de la membrana celular. Véase la solicitud publicada de EE.UU. 2003/0176425 para una descripción de un método a modo de ejemplo; véase también Chhajlani, *Peptides.* 1996;17(2):349-51. Además, también puede usarse tinción por inmunofluorescencia, usando cualquier anticuerpo marcado como MC4R marcado (por ejemplo, MC4R marcado con FLAG). Otro método muy conocido es la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), que clasifica o distingue poblaciones de células usando anticuerpos marcados contra marcadores de la superficie celular. Véase, por tanto, Nijenhuis et al., arriba.

Determinación de un aumento en la actividad de MC4R. Puede determinarse la actividad de MC4R usando, por ejemplo, ensayos de activación/acumulación de AMPc (véase, por ejemplo, VanLeeuwen et al., J Biol Chem 2003; 18: 15935-40) o midiendo un aumento en la transcripción de uno o más genes activados por AMPc, o midiendo la expresión del gen indicador uniendo operativamente un gen indicador tal como luciferasa a un elemento de respuesta de AMPc (CRE) (véase por ejemplo, Lee et al., Eur J Biochem 2001; 268(3):582-91). Además, también se sabe que MC4R estimula la secreción de TNF- α en melanóforos. Por tanto, la actividad de MC4R en respuesta a un compuesto candidato puede evaluarse midiendo la secreción de TNF- α (véase, por ejemplo, Ignar et al., Peptides 2003 May;24(5):709-16).

Finalmente, los melanóforos proporcionan un bioensayo rápido y sensible para agonistas y antagonistas de melanocortina. Este método se basa en la medición de la dispersión de gránulos de pigmento inducida por α -MSH, como se determina por cambios en la densidad óptica (Quillan et al., PNAS U.S.A. 1995; 92: 2894; y Potenza et al., Pigment Cell Res 1992; 5: 372).

Definiciones de biología molecular

Según la presente invención, puede emplearse biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la materia. Estas técnicas son generalmente útiles para la producción de células recombinantes que expresan MC4R no mutante o mutante para su uso en ensayos de cribado. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (en el presente documento "Sambrook et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994); y ediciones posteriores de cada uno, si están disponibles.

El término "célula hospedadora" significa cualquier célula de cualquier organismo que está seleccionada, modificada, transformada, cultivada, usada o manipulada de algún modo, para la producción de una sustancia deseada por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína, o una enzima. Según la presente invención, la célula hospedadora se modifica para expresar un ácido nucleico y polipéptido MC4R mutante o no mutante. Las células hospedadoras pueden usarse además para cribado u otros ensayos. Células hospedadoras a modo de ejemplo para su uso en la presente invención son células HEK293, células COS y células CHO.

Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha experimentado una manipulación biológica molecular.

Los polinucleótidos MC4R en el presente documento pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (control de expresión), o pueden asociarse a secuencias heterólogas, que incluyen promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y otras secuencias de sitios de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes de 5' y 3', y similares. Los ácidos nucleicos también pueden modificarse por muchos medios conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen: metilación, "capuchones", sustitución de uno o más de los nucleótidos que existen de forma natural con un análogo, y modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Los polinucleótidos pueden contener uno o más restos covalentemente unidos adicionales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, hierro, metales oxidantes, etc.) y alquilantes. Los polinucleótidos pueden ser derivatizados por la formación de un enlace fosfotriéster de metilo o etilo o un fosforamidato de alquilo. Además, los polinucleótidos en el presente documento también pueden modificarse con una marca capaz de proporcionar una señal detectable, ya sea directamente o indirectamente. Marcas a modo de ejemplo incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, y similares. Los ácidos nucleicos también pueden alterarse en una o más bases por, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio para facilitar la biología molecular asociada al uso de las moléculas.

Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN o polipéptido de MC4R, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, produce la producción de ese ARN o polipéptido, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos MC4R codifica una secuencia de aminoácidos para un polipéptido MC4R (proteína). Una secuencia codificante para la proteína puede incluir un codón de iniciación (normalmente ATG) y un codón de parada.

El término "gen", también llamado un "gen estructural", significa una secuencia de ADN que codifica o se corresponde con una secuencia de aminoácidos particular que comprende toda o más proteínas

MC4R, y puede o puede no incluir secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen MC4R.

5 Los términos "expresar" y "expresión", cuando se usan en el contexto de producir una secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia de ácidos nucleicos, significan permitir o causar que la información en un gen MC4R o
 5 secuencia de ADN llegue a manifestarse, por ejemplo, produciendo un proteína MC4R que activa las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción del gen MC4R correspondiente o secuencia de ADN. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína MC4R. También puede decirse que el propio producto de expresión, por ejemplo, la proteína resultante, se "expresa" por la célula. Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. Según la
 10 presente invención, MC4R se expresa en la superficie celular de neuronas.

El término "intracelular" significa algo que está dentro de una célula. El término "extracelular" significa algo que está fuera de una célula. Una sustancia es "secretada" por una célula si aparece en medidas significativas fuera de la célula, de algún lugar o dentro de la célula.

15 El término "heterólogo" se refiere a una combinación de elementos que no existen de forma natural en combinación. Por ejemplo, ADN heterólogo se refiere a ADN no naturalmente localizado en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferentemente, el ADN heterólogo incluye un gen extraño a la célula. Un elemento de expresión heterólogo o regulador es un elemento operativamente asociado a un gen diferente de aquél al que está operativamente asociado en la naturaleza. En el contexto de la presente invención, un gen que codifica una proteína de interés es heterólogo al ADN de vector en el que se inserta para clonación o expresión, y es heterólogo a una
 20 célula hospedadora que contiene un vector tal, en el que se expresa, por ejemplo, una célula de *E. coli*.

El término "transformación" se refiere al proceso por el que el ADN, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, se introduce desde el medio circundante en una célula hospedadora.

25 El término "transducción" se refiere a la introducción de ADN, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, en una célula hospedadora procariota, por ejemplo, en una célula hospedadora procariota mediante un virus bacteriano, o bacteriófago. Una célula hospedadora procariota o eucariota que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada" o "transducida" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula hospedadora puede proceder de cualquier fuente, que incluye células del mismo género o especie que la célula hospedadora, o células de un género o especie diferente, o secuencias sintéticas.

30 El término "célula recombinantemente manipulada" se refiere a cualquier célula procariota o eucariota que ha sido manipulada para expresar o expresar en exceso el ácido nucleico de interés, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, por cualquier método apropiado, que incluye transfección, transformación o transducción. Este término también incluye activación endógena de un ácido nucleico en una célula que normalmente no expresa ese producto génico o que expresa el producto génico a un nivel inferior al óptimo.

35 El término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico extraño (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula. El ácido nucleico "extraño" incluye un gen, secuencia de ADN o ARN para una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora replicará el ADN y expresará el gen introducido o secuencia para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen introducido o secuencia. El gen introducido, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, o secuencia, también puede llamarse un gen o secuencia "clonado", puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como iniciación, parada, promotor, señal, secreción, u otras secuencias usadas por la maquinaria genética de una célula. El gen o secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias con función desconocida, el ADN puede introducirse ya sea como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica o una célula hospedadora que recibe y expresa ADN o ARN introducido.

45 Dependiendo de la célula hospedadora usada, se hace transformación o transfección usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como se describe en la Sección 1.82 de Sambrook et al., 1989 arriba, se usa generalmente para células bacterianas que contienen abundantes barreras de pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO, como se describe en Chung y Miller (Nucleic Acids Res. 1988, 16:3580). Otro método más es el uso de la técnica llamada electroporación. Alternativamente, donde se usa un vector viral, las células hospedadoras pueden infectarse por el virus que contiene el gen de interés.
 50

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen MC4R) puede introducirse en una célula hospedadora, de manera que transformen el hospedador y promuevan la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.; son muy conocidos en la técnica.

55 Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Para los fines de definir la presente invención, la secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la

transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, además de dominios de unión de proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

5 Una secuencia codificante está "bajo el control de" u "operativamente asociada a" secuencias de control transcripcionales y traduccionales en una célula cuando ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que entonces corta y empalma el ARN en tras (si contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

10 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente enumerados emplea técnicas de ligación estándar. Plásmido aislados o fragmentos de ADN son escindidos, adaptados y religados en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

15 Para el análisis para confirmar secuencias correctas en plásmidos construidas, se usan las mezclas de ligación para transformar cepas bacterianas, y se seleccionan transformantes satisfactorios por resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando corresponda. Se preparan plásmidos de los transformantes, se analizan por digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian por el método de Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74:5463-5467) o Messing et al. (Nucleic Acids Res. 1981, 9:309), o por el método de Maxam et al. (Methods in Enzymology 1980, 65:499). Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos de la presente invención y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para el promotor utilizado.

EJEMPLOS

20 La presente invención se describe además por medio de los ejemplos, presentados a continuación. El uso de tales ejemplos es ilustrativo solo y de ninguna forma limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Asimismo, la invención no se limita a cualquier realización particular preferida descrita en el presente documento. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de esta memoria descriptiva y pueden hacerse sin apartarse de su alcance. La invención debe, por tanto, limitarse solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de equivalentes a los que dan derecho las reivindicaciones.

EJEMPLO 1: Generación de líneas celulares que expresan mutantes de plegamiento de MC4R

30 Con el fin de determinar si algunos mutantes de MC4R producen defectos conformacionales de MC4R, se transfectan ácidos nucleicos MC4R que contienen los diversos mutantes en células HEK-293T y COS-7 y se evalúa su expresión de la superficie celular y actividad. Aquellas líneas celulares en las que se observa expresión de la superficie celular reducida o ausente se evalúan adicionalmente para determinar la presencia intracelular y/o localización del polipéptido MC4R.

Métodos

35 **Generación de mutantes de MC4R.** Se modifica un ADNc que codifica un MC4R no mutante (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) usando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, PCR, mutagénesis dirigida al sitio) para generar ADNc de MC4R mutante que contienen alteraciones en los nucleótidos que producen, por ejemplo, uno de los siguientes polipéptidos mutantes de MC4R: P78L, R165Q, R165W, I125K, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, N62S, N97D, Y157S, I102S, L106P, L250Q, Y287X, P299H, S58C, CTCT en el codón 211, y/o inserción de TGAT en el codón 244. Tales mutantes también pueden fusionarse con una marca fluorescente, tal como GFP, como se describe en Blondet et al. J Biochem (Tokyo) 2004; 135(4):541-6, o marcarse con FLAG, como se describe por VanLeeuwen et al., J. Biol. Chem. 2003; 278: 15935-15940, o marcarse con una enzima tal como luciferasa.

45 **Cultivo y transfección de células.** Se clonan tales ácidos nucleicos MC4R mutantes en un vector de expresión apropiado, por ejemplo, pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante. La transfección de células se lleva a cabo usando LipofectAMINE (Invitrogen), y se seleccionan líneas celulares clonales permanentemente transfectadas por resistencia al análogo de neomicina G418.

50 Brevemente, se mantienen células HEK-293T y COS-7 en medio Eagle modificado por Dulbecco (con glutamina; Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen). Las células se incuban a 37 °C en aire humidificado que contiene 5 % de CO₂. Las células están generalmente al 70-80 % de confluencia el día de la transfección.

MC4R marcado con GFP. Está disponible ADNc de proteína verde fluorescente (GFP) de BD Biosciences (San Jose, CA) o Clontech (Palo Alto, CA). Se fusiona GFP en marco con el extremo C de MC4R humano con el codón de terminación del extremo C eliminado, según las instrucciones del fabricante. La construcción de proteína de fusión MC4R-GFP quimérica se transfecta entonces como antes. Se emplea similarmente una construcción de luciferasa.

Detección de la localización de mutantes de MC4R. Se realizan experimentos de unión para determinar la localización de la superficie celular usando las condiciones descritas previamente (Yang et al., J Biol Chem 1997; 272: 23000-23010). Brevemente, se usan 2×10^5 cpm de ^{125}I -NDP-MSH (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en combinación con ligandos no radiomarcados NDP-MSH, AgRP 87-132, o AgRP 110-117. Las reacciones de unión se terminan eliminando los medios y lavando las células dos veces con medio esencial mínimo que contenía 0,2 % de albúmina de suero bovino. Las células se lisan entonces con NaOH 0,2 N, y se cuantifica la radiactividad en el lisado en un contador analítico. Se determina la unión no específica midiendo la cantidad de marca de ^{125}I unida en presencia de ligando sin marcar 10^{-6} M. Puede usarse FACS adicional como se describe más abajo en el Ejemplo 4. La unión específica se calcula restando la radiactividad no específicamente unida de la radiactividad unida total. La máxima unión ($B_{\text{máx}}$) puede calcularse usando la ecuación $B_{\text{máx}} = [\text{NDP-unión específica de MSH}] / ([\text{NDP-MSH}] / (\text{Kd} + [\text{NDP-MSH}]))$. $K_i = \text{CI}_{50} / (1 + \text{concentración de ligando} / \text{Kd})$.

Donde el mutante de MC4R está fluorescentemente marcado, se usa microscopía confocal para monitorizar el tráfico intracelular de MC4R marcado (Blondet et al., J Biochem 2004; 135: 541-546; o Gao et al., J Pharmacol Exp Ther 2003; 307(3):870-7). Brevemente, se cultivan células en cubreobjetos con cámara 24 a 48 h antes de los experimentos. Después de tratamientos apropiados, las células se lavan con PBS frío y se fijan en formalina durante 20 minutos, y se observaron en un microscopio de láser de barrido LSM 510 META (Carl Zeiss, Thornwood, NY). La fluorescencia de GFP se excita usando un láser de argón/criptón de 488 nm, detectado con un filtro paso banda de 500 a 550 nm. La señal roja se excita con un láser de HeNe a 543 nm y la fluorescencia se detecta con un filtro paso banda de 565 a 615.

Se cuantifican las imágenes digitalmente adquiridas usando un Scion Image Beta 4.02. Las imágenes confocales de fluorescencia verde originales se convierten en la escala de grises y se realiza filtrado de la mediana. Cada píxel se asigna a un valor de intensidad que oscila de 0 (negro) a 255 (blanco). La superficie celular e intensidad celular total de fluorescencia se miden después de seleccionar manualmente el área correspondiente. La distribución subcelular de MC4R-GFP se expresa como una relación de la intensidad de fluorescencia de la superficie celular con respecto a la intensidad de fluorescencia celular total. Una disminución en la relación indica internalización del receptor.

Usando estos métodos, se identifican mutantes de plegamiento de MC4R que serían candidatos para el rescate mediado por chaperona.

EJEMPLO 2: Estructuras de agonistas y antagonistas de MC4R

Se seleccionaron posibles agonistas y antagonistas de MC4R basándose en la revisión de referencias de patentes publicadas y de bibliografía (en particular, Bednarek y Fong, Exp. Opin. Therapeutic Patents 2004; 14(3): 327-326 y documento WO 02/062766). Los criterios usados en la selección de los compuestos descritos en el presente documento incluyeron datos de CI_{50} publicados, datos de animales *in vivo* y datos de biodisponibilidad (por ejemplo, farmacocinética), si están disponibles.

a) Síntesis del agonista de la Figura 1 (compuesto 1)

La selección de este compuesto, conocido como THIQ, se basó en los siguientes datos:

Nombre	Actividad de MC4R			FC	Referencia(s)
	CI_{50} (nM)	CE_{50} (nM)	$E_{\text{máx}}$ (%)		
THIQ/ compuesto 1	1,2	2,5	97	% de F 14 V_d 3,6 l/kg Cl 84 mlmin/kg $t_{1/2}$ 0,6 h	Van der Ploeg et al (2002) PNAS 99:11381. Sebhat et al (2002) J Med Chem 45:4589.

La síntesis de esta molécula (11 etapas) se realizó basándose en el esquema representado en la Figura 3.

b) Síntesis del agonista de la Figura 2 (compuesto 2)

La selección de este compuesto conocido, denominado compuesto 2, se basó en los siguientes datos:

Nombre	Actividad de MC4R			FC	Referencia(s)
	K_i (nM)	CE_{50} (nM)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)		
Compuesto 2	24	39	ND	ND	Richardson et al (2004) J Med Chem 47:744.

La síntesis de esta molécula (11 etapas) se realizó basándose en el esquema representado en la **Figura 4**.

c) Síntesis del antagonista de la Figura 5 (compuesto 3)

5 Este compuesto se seleccionó basándose en los datos de α MSH/MC4R informados por Arasasingham (J Med Chem 2003, 46: 9-11). La síntesis de este compuesto se realizó según el método descrito allí, resumido en la **Figura 7**.

d) Síntesis del antagonista de la Figura 6 (compuesto 4)

10 Este compuesto se seleccionó y sintetizó basándose en los datos y método sintético descrito en la publicación de patente internacional PCT WO 02/062766 a Millennium Pharmaceuticals; el esquema sintético se resume en la **Figura 8**. La actividad biológica de este compuesto se informa en el documento WO 02/062766 usando un ensayo de proximidad de centelleo.

Brevemente, se logró la síntesis usando el siguiente método:

15 Se añade 1,3-diaminopropano (Acros, 27,7 g, 0,374 mmoles) a ácido tiosalicílico (Acros, 20 g, 0,130 mmoles) en 1,2-diclorobenceno (Acros, 200 ml), esta mezcla se calienta a 170 °C durante 4 horas. Tras enfriarse a 60 °C, se añade metanol (50 ml), la reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche y el sólido cristalino amarillo resultante se recoge y se lava con éter dando 9 g de producto puro.

Se añade bromuro de 2-metoxi-5-nitrobencilo (Fluka, 1,86 g, 7,559 mmoles) a 2-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)bencenotiol (1 g, 5,201 mmoles) en metanol (60 ml) a temperatura ambiente, se mantiene durante 12 horas concentrado y se añade éter (10 ml), las agujas amarillas claras resultantes se recogen y se lavan con éter dando 1,28 g de producto puro.

20 EJEMPLO 3: Rescate de MC4R erróneamente plegado usando baja temperatura o chaperonas químicas

Como tanto las bajas temperaturas (rescate térmico) como las chaperonas químicas generales tales como DMSO son conocidas por restaurar el plegamiento de proteínas mutantes, se evaluó la expresión de la superficie celular de no mutante y diversos mutantes de plegamiento de MC4R en células que alojan MC4R WT y mutante, y en aquellas células cultivadas a 30 °C o con 1 % de DMSO.

25 Métodos

Células y transfecciones. Se transfectaron transitoriamente células HEK 293 con no mutante (WT) o los siguientes mutantes de hMC4R doblemente marcados con 3HA y Venus (proteína amarilla verde fluorescente potenciada; EYFP): S58C; N62S; R165W; R165Q y P299H.

30 **Ensayo a baja temperatura.** Se incubaron células WT y transfectadas a 30 °C o 37 °C durante 12 horas antes de la evaluación de la expresión de la superficie celular de MC4R. La ganancia se determinó usando lo siguiente: Ganancia = [(% de expresión superficial a 30 °C - % de expresión superficial a 37 °C) / % de expresión superficial a 37 °C] * 100.

35 **Ensayo de chaperonas químicas:** Se incubaron células WT y transitoriamente transfectadas en presencia o ausencia de 1 % de DMSO durante 12 horas antes de la evaluación de la expresión de la superficie celular de MC4R.

Análisis de FACS. Se realizó análisis FACS después de marcar fluorescentemente con anticuerpo primario anti-HA.11 (ratón; dilución 1:1000) y anticuerpo secundario acoplado a Alexa 647 (cabra anti-ratón; dilución 1:1000). Se clasificaron células vivas (negativo para yoduro de propidio) en las dos siguientes poblaciones relevantes:

P4: Células positivas para YFP totales (representativo de expresión de MC4R total)

P5: Porcentaje de células positivas para tanto YFP como Alexa 647 (células positivas para Alexa y YFP) / (células positivas para YFP + células positivas para Alexa y YFP) (representativo de la expresión de la superficie celular)

Resultados

40 **Expresión de la superficie celular de MC4R.** La expresión superficial basal de la expresión de la superficie celular de WT alcanza el 90 %. Ninguno de los mutantes expresó MC4R sobre la superficie celular como se detecta uniendo

NDP- α -MSH marcada con ¹²⁵I (datos no mostrados). Cuando se analiza por FACS, todos los mutantes presentaron expresión superficial significativamente reducida cuando se compara con células transfectadas con MC4R WT (datos no mostrados). Aproximadamente el 90 % de las células 3HA-hMC4R-Venus WT presentaron expresión superficial de MC4R (P5), mientras que la expresión superficial basal en los mutantes fue entre el 12 % y el 18 % para N62S, R165W, R165Q y P299H. S58C presenta aproximadamente el 40 % de expresión superficial.

Rescate térmico. Los cinco mutantes presentaron una ganancia en la expresión de la superficie celular de MC4R (P5) en la Tabla 2 del siguiente modo:

Tabla 2

Genotipo	% de ganancia
WT	12
S585C	43
N62S	68
R165W	63
R165Q	93
P299H	107

10 **Chaperona química:** No se detectó potenciamiento significativo de la expresión de la superficie celular en presencia de 1 % de DMSO.

EJEMPLO 4: Rescate de MC4R erróneamente plegado usando chaperonas farmacológicas para MC4R

Se evaluaron los compuestos antagonistas de MC4R representados en la Figura 5 (compuesto 3) y Figura 6 (sal de HBr; compuesto 4), respectivamente, para actividad de chaperona en células que alojan los siguientes mutantes de MC4R: S58C; N62S; R165Q; R165W; y P299H.

Métodos

15 **Ensayo farmacológico de chaperonas.** Brevemente, se cultivaron células que alojan cada uno de los mutantes de MC4R anteriormente referenciados (transfectadas como se describe en el Ejemplo 3) con cada uno de los compuestos antagonistas a concentraciones de 1,0 μ M y 10 μ M durante 12 h y se evaluaron para la expresión de la superficie celular de MC4R usando análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia como se ha descrito anteriormente. Se comparan los niveles de expresión de la superficie celular entre condiciones de tratamiento y basales. Se determina el porcentaje de ganancia según lo siguiente: [Ganancia = [(% de expresión superficial (con tratamiento) - % de expresión superficial (sin tratamiento)) / % de expresión superficial (sin tratamiento)] *100.

25 **Ensayo de actividad de MC4R.** Se evaluó la acumulación de AMPc para mutantes de MC4R S58C, N62S, R165W y P299H en respuesta al tratamiento con agonista de MC4R NDP-MSH (10⁻⁷M) en presencia o ausencia de cada antagonista usando el kit de ensayo Catch Point cAMP Fluorescent de Molecular Devices (ensayo de células completas; Cat. N.º R8044). Los controles no se trataron o se trataron solo con NDP-MSH.

Resultados

30 **Rescate de chaperonas farmacológicas.** Como se muestra en la Tabla 3, a continuación, ambos antagonistas fueron capaces de aumentar la expresión superficial de los mutantes de MC4R R165W, S58C y R165Q a concentraciones de tanto 1,0 μ M como 10 μ M, con un efecto dependiente de la dosis. Como se indica anteriormente, la expresión superficial basal sobre los mutantes estuvo entre el 12 % y el 18 % para N62S, R165W, R165Q y P299H. S58C presenta aproximadamente el 40 % de expresión superficial. Inesperadamente, el tratamiento con 10 μ M de cada compuesto fue capaz de restaurar la expresión de la superficie celular de MC4R R165W a niveles idénticos a células que expresan MC4R no mutante.

Para N62S mutante, no se observó efecto a 1,0 μ M con ninguno de los compuestos, aunque se observó un significativo porcentaje de ganancia en la expresión de la superficie celular de MC4R mutante con ambos compuestos a la concentración 10 μ M. El compuesto representado en la Figura 5 fue más potente, es decir, se observó más expresión de la superficie celular que con el compuesto mostrado en la Figura 6.

40 Para P299H mutante, el compuesto mostrado en la Figura 6 no tuvo efecto sobre la restauración de la expresión de la superficie celular del receptor mutante a ninguna de 1,0 μ M o 10 μ M, y solo se observó un pequeño efecto con el compuesto mostrado en la Figura 5 a 10 μ M.

Tabla 3

Compuesto/ concentración	% de ganancia				
	S58C	N62S	R165W	R165Q	P299H
4 / 10 μ M	130	212,5	675	508	38,9
4 / 1 μ M	60	6,25	150	91,7	11,11
3 / 10 μ M	130	343,75	675	508	77,78
3 / 1 μ M	77,5	25	467	300	27,78

5 Estos resultados demuestran que los mutantes de plegamiento de MC4R pueden ser "rescatados" cuando se ponen en contacto con bajas concentraciones de antagonistas de MC4R, que actúan de chaperonas farmacológicas para restaurar la expresión de la superficie celular.

Finalmente, un compuesto de bisaminotiazol descrito en Pedemonte et al., J. Clin. Inves. 2005; 115: 2564-71 (Fig. 9) demostró un pequeño efecto sobre los mutantes S58C (31,25 % de ganancia) y R165W (28,95 % de ganancia).

10 **Actividad de MC4R.** Como se muestra en la Fig. 11, se observó recuperación de la señalización mediante MC4R al mismo grado que hMC4R WT en S58C y R165W tras el tratamiento con ambos antagonistas a 10 μ M. También se restauró la capacidad de señalización en el mutante de MC4R N62S a un menor grado. No se restauró la señalización en P299H, como era de esperar, ya que este mutante ya que esta mutación está en un dominio necesario para el acoplamiento de proteína G.

EJEMPLO 5: Cribado de chaperonas para MC4R que restauran la estabilidad y actividad de MC4R mutante o aumentan la estabilidad de MC4R no mutante

15 Este ejemplo describe un método de cribado de compuestos de chaperona para MC4R para potenciar la expresión de la superficie celular de mutantes o no mutantes erróneamente plegados y/o actividad de MC4R.

Métodos

20 **Transfección de MC4R mutante o no mutante.** Se logra la identificación del plegamiento/tráfico de mutantes de MC4R como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se logra la transfección de tales mutantes de plegamiento y/o MC4R no mutante como se ha descrito anteriormente, o usando cualquier método conocidos en la técnica para detectar la expresión de la superficie celular de proteínas, que incluyen inmunoensayos tales como ELISA, y análisis FACS.

25 **Administración de chaperonas.** A cultivos o matrices de células que expresan no mutante de MC4R o que expresan mutantes de plegamiento se añaden diversas concentraciones de compuestos de prueba de chaperona. Entonces se determina la localización celular de MC4R, además de la actividad de MC4R que es enviada a la superficie celular. Por ejemplo, se criban compuestos basados en piperazina, piperidina 1,4-diazapano, guanidina, u otros compuestos de prueba como se describe, por ejemplo, a continuación: Bednarek y Fong, Exp Opn Ther Patents 2004; 14: 327-36; Ujjainwalla et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003; 13: 4431-4435; WO03/07949; WO03/61660; WO03/09847; WO03/09850; WO03/31410; WO03/94918; WO03/68738; WO03/92690; WO03/93234; WO03/72056; WO03/66597; WO03/66587; WO03/53927; WO02/67869; WO02/68387; WO03/68738; WO02/00259; WO02/92566; WO02/81443; WO02/81430; y WO02/80896.

Detección del envío de MC4R a la superficie celular. Se logra la detección de la localización celular y/o de superficie celular de células que expresan MC4R tratadas con compuesto en comparación con células sin tratar como se ha descrito anteriormente.

35 **Detección de la actividad de MC4R midiendo la acumulación de AMPc.** 48 h después de la transfección, las células se lavan una vez con PBS y luego se desprenden de la placa con PBS que contiene 0,02 % de EDTA (Sigma). Las células desprendidas se recogen por centrifugación y se resuspenden en solución salina equilibrada de Hanks (Invitrogen) que contiene IBMX 0,5 mM, HEPES 2 mM, pH 7,5 (tampón IBMX). Después de la incubación a 37 °C durante 15 min para permitir la captación de IBMX, se añaden 0,4 ml de suspensión de células (aproximadamente 5×10^5 células/ml) a 0,1 ml de tampón IBMX que contiene diversas concentraciones de agonistas (por ejemplo, [Nle4-D-Phe7]-MSH (NDP-MSH), α -MSH), u otros candidatos a chaperona o forskolina 10 μ M. Las células se incuban posteriormente a 37 °C durante 15 min para permitir la acumulación de AMPc. La actividad se termina añadiendo 0,5 ml de 5 % de ácido tricloroacético, y la AMPc liberada de las células lisadas se ensaya por el sistema de ensayo de proximidad de centelleo de AMPc-¹²⁵I (Amersham Biosciences). Se calculan los valores de CE₅₀ con un intervalo de confianza del 95 % usando el software GraphPad Prism (usando análisis de regresión no lineal ajustado con una curva de dosis-respuesta sigmoide con pendiente variable).

EJEMPLO 6: Administración de dosis única de DGJ para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y efectos sobre la actividad enzimática de α -galactosidasa A

Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de fase I, de dosis oral de dos veces al día de DGJ para evaluar los efectos de seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y actividad enzimática de α -galactosidasa A (α -Gal A) de DGJ en voluntarios sanos.

Diseño del estudio y duración. Este estudio fue el primer estudio en seres humanos, monocéntrico, de fase I, aleatorizado, de doble ciego, dosis de dos veces al día, controlado por placebo, para evaluar los efectos de seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y actividad enzimática de α -Gal A de DGJ tras la administración por vía oral. El estudio probó dos grupos de 8 sujetos (6 activo y 2 placebo) que recibieron una dosis de dos veces al día de 50 o 150 mg de DGJ o placebo administrado por vía oral durante siete días consecutivos, acompañada de una visita de seguimiento de siete días. Los sujetos se alojaron en la instalación de tratamiento a partir de 14 horas antes de la dosis hasta 24 horas después de la dosis. Las comidas fueron controladas por el programa y los sujetos siguieron siendo ambulatorios durante 4 horas después de la administración de fármaco.

Se calcularon parámetros farmacocinéticos para DGJ en plasma en el Día 1 y Día 7. Además, se calculó el porcentaje acumulado de DGJ secretado (12 horas después de la dosis) en orina. Se calculó la actividad de α -Gal A en glóbulos blancos (WBC) antes de empezar la dosis, y otra vez 100 horas, 150 horas y 336 horas en el ensayo.

Población de estudio. Los sujetos fueron voluntarios varones sanos, no institucionalizados, no fumadores, entre 19 y 50 años de edad (ambos incluidos), que consistían en miembros de la comunidad en general.

Evaluaciones de seguridad y tolerabilidad. Se determinó la seguridad evaluando las constantes vitales, parámetros de laboratorio (bioquímica sérica, hematología y análisis de orina), ECG, examen físico y por registro de acontecimientos adversos durante el periodo de tratamiento.

Muestreo farmacocinético. Se recogieron muestras de sangre (10 ml cada una) en tubos de recogida de sangre que contenían EDTA antes de la dosis y en las siguientes veces a partir de aquí: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas. Se enfriaron las muestras de sangre en un baño de hielo y se centrifugaron con refrigeración tan pronto como fue posible. Se dividieron las muestras de plasma en dos alícuotas y se guardaron a 20 ± 10 °C a la espera del ensayo. Al final del estudio, todas las muestras se transfirieron a MDS Pharma Services Analytical Laboratories (Lincoln) para análisis. Se recogió la producción de orina completa de cada sujeto para análisis de DGJ para determinar la eliminación renal durante las primeras 12 horas después de la administración de DGJ en los días 1 y 7.

Muestreo de la actividad enzimática de α -GAL A de WBC. Se recogieron muestras de sangre (10 ml cada una) en tubos de recogida de sangre que contenían EDTA y se extrajeron WBC antes de la dosis y los momentos posteriores a partir de aquí: 100 horas, 150 horas y 336 horas. Las muestras se trataron como se ha descrito, y se determinaron los niveles de actividad enzimática de α -Gal A de WBC.

Análisis estadístico. Se resumieron los datos de seguridad que incluyen evaluaciones de laboratorio, exámenes físicos, acontecimientos adversos, monitorización de ECG y constantes vitales por grupo de tratamiento y momento de recogida. Se calculó la estadística descriptiva (media aritmética, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo) para datos de seguridad cuantitativos, además de para la diferencia con respecto al nivel inicial. Se compilaron los números de frecuencia para la clasificación de datos de seguridad cualitativa.

Se codificaron los acontecimientos adversos usando el diccionario MedDRA versión 7.0 y se resumieron por tratamiento para el número de sujetos que informan el acontecimiento adverso y el número de acontecimientos adversos informados. Se proporcionó un listado de datos de acontecimientos adversos por sujeto que incluyó término literal, término codificado, grupo de tratamiento, gravedad y relación con el tratamiento. Se enumeraron medicaciones concomitantes y antecedentes personales por tratamiento.

Se resumieron los parámetros farmacocinéticos por grupo de tratamiento usando estadística descriptiva (medias aritméticas, desviaciones estándar, coeficientes de variación, tamaño de muestra, mínimo, máximo y mediana).

Resultados

Ningún sujeto tratado con placebo tuvo un acontecimiento adverso (AE) y ningún sujeto presentó AE después de recibir 50 mg b.i.d. o 150 mg b.i.d. de DGJ, DGJ pareció ser seguro y bien tolerado por este grupo de sujetos varones sanos ya que las dosis se administraron a 50 mg b.i.d. y 150 mg b.i.d.

Ocurrieron desviaciones de laboratorio de los intervalos normales después de la dosis, pero ninguno fue considerado clínicamente significativo. No hubo desplazamientos de datos medios clínicamente relevantes en ningún parámetro investigado durante el transcurso del estudio. No ocurrieron anomalías clínicamente relevantes en ningún vital signo, ECG, o parámetro del examen físico.

Evaluación farmacocinética. La siguiente tabla resume los datos farmacocinéticos obtenidos durante el estudio.

Tabla 4.

	dosis de 50 mg b.i.d.		dosis de 150 mg b.i.d.	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
C _{máx} (µM)	2,3 ± 0,3	3,9 ± 0,5	11,3 ± 1,5	10,8 ± 1,4
t _{máx} (h)	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,4
t _{1/2} (h)	2,5 ± 0,1		2,4 ± 0,05	
C _{mín} (µM)		0,4 ± 0,03		1,2 ± 0,1
Eliminación renal acumulada de 12 h (%) ^a	16 ± 6	48 ± 7	42 ± 7	60 ± 5

^aPorcentaje acumulado de DGJ eliminado durante el periodo de 12 horas después de la dosis.

5 La farmacocinética de DGJ fue bien caracterizada en todos los sujetos y a todos los niveles de dosis. En promedio, ocurrieron concentraciones pico a aproximadamente 3 horas para todos niveles de dosis. C_{máx} de DGJ aumentó de una manera proporcional a la dosis cuando las dosis aumentaron de 50 mg a 150 mg.

Las semividas de eliminación medias (t_{1/2}) fueron comparables a los niveles de dosis de 50 y 150 mg en el Día 1 (2,5 frente a 2,4 horas).

10 El porcentaje medio de DGJ eliminado durante el periodo de 12 horas después de la dosis fue del 16 % y 42 % a los niveles de dosis de 50 mg y 150 mg, respectivamente, en el Día 1, aumentando hasta el 48 % y 60 %, respectivamente, en el Día 7.

15 **Actividad enzimática de α-galactosidasa A (α-Gal A).** Los datos de actividad enzimática de α-Gal A obtenidos durante el estudio se muestran en la Figura 1. DGJ no inhibió la actividad enzimática de α-Gal A de WBC en sujetos a dosis de 50 mg b.i.d. o 150 mg b.i.d. Además, DGJ produjo una tendencia dependiente de la dosis de elevada actividad enzimática de α-Gal A de WBC en voluntarios sanos. La actividad enzimática de α-Gal A se midió en WBC de sujetos administrados con placebo, 50 mg b.i.d., y 150 mg b.i.d. de DGJ. El placebo no tuvo efecto sobre la actividad enzimática de α-Gal A de WBC. Variaciones en la actividad enzimática en respuesta a placebo no fueron clínicamente significativas. Tanto 50 mg b.i.d. como 150 mg b.i.d. de DGJ aumentaron la actividad enzimática de α-Gal A de WBC normalizada. En respuesta a 50 mg b.i.d. de DGJ, la actividad enzimática de α-Gal A de WBC aumentó a niveles del 120 %, 130 % y 145 % antes de la dosis 100 horas, 150 horas y 336 horas después de la dosis, respectivamente. En respuesta a 150 mg b.i.d. de DGJ, la actividad enzimática de α-Gal A de WBC aumentó a niveles del 150 %, 185 % y 185 % antes de la dosis 100 horas, 150 horas y 336 horas después de la dosis, respectivamente.

25 La presente invención no debe limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas descritas en el presente documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Tales modificaciones pretenden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amicus Therapeutics Inc.

30 <120> CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR OBESIDAD

<130> 077376.0346

<150>60/687.648

35 <151> 03-06-2005

<150>60/799.968

ES 2 676 996 T3

<151> 12-05-2006

<160> 18

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1000

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```
atggtgaact ccaccaccg tgggatgcac acttctctgc acctctggaa ccgcagcagt 60
tacagactgc acagcaatgc cagtgagtcc cttggaaaag gctactctga tggagggtgc 120
tacgagcaac tttttgtctc tcctgaggtg tttgtgactc tgggtgtcat cagcttgttg 180
gagaatatct tagtgattgt ggcaatagcc aagaacaaga atctgcattc acctatgtac 240
tttttcatct gcagcttggc tgtggctgat atgctggtga gcgtttcaa tggatcagaa 300
accattgtca tcaccctatt aaacagtaca gatacggatg cacagagttt cacagtgaat 360
attgataatg tcattgactc ggtgatctgt agctccttgc ttgcatccat ttgcagcctg 420
ctttcaattg cagtggacag gtactttact atcttctatg ctctccagta ccataacatt 480
atgacagtta agcgggttgg gatcatcata agttgtatct gggcagcttg cacggtttca 540
ggcattttgt tcatcattta ctcagatagt agtgctgtca tcatctgcct catcaccatg 600
ttcttcacca tgctggctct catggcttct ctctatgtcc acatgttctt gatggccagg 660
cttcacatta agaggattgc tgtcctcccc ggcactgggtg ccatccgcca aggtgccaat 720
atgaaggag cgattacctt gaccatcctg attggcgtct ttgttgtctg ctgggccccca 780
ttcttctctc acttaatatt ctacatctct tgtcctcaga atccatattg tgtgtgcttc 840
atgtctcact ttaacttgta tctcactctg atcatgtgta attcaatcat cgatcctctg 900
atztatgcac tccggagtca agaactgagg aaaacctca aagagatcat ctgttgctat 960
cccctgggag gcctttgtga cttgtctagc agatattaaa 1000
```

15

<210> 2

<211> 332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

ES 2 676 996 T3

Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
 305 310 315 320
 Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser Arg Tyr
 325 330

<210> 3

<211> 999

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggtgaact ccaccaccg tgggatgcac acttctctgc acctctggaa cgcgagcagt 60
 tacagactgc acagcaatgc cagtgagtcc cttggaaaag gctactctga tggagggtgc 120
 tacgagcaac tttttgtctc tcctgaggtg tttgtgactc tgggtgtcat cagcttgttg 180
 gagaatatct tagtgattgt ggcaatagcc aagaacaaga atctgcattc acccatgtac 240
 tttttcatct gcagcttggc tgtggctgat atgctggtga gcgtttcaaa tggatcagaa 300
 accattatca tcaccctatt aaacagtaca gatacggatg cacagagttt cacagtgaat 360
 attgataatg tcattgactc ggtgatctgt agctccttgc ttgcatccat ttgcagcctg 420
 ctttcaattg cagtggacag gtactttact atcttctatg ctctccagta ccataacatt 480
 atgacagtta agcgggttgg gatcatcata agttgtatct gggcagcttg cacggtttca 540
 ggcattttgt tcatcattta ctcagatagt agtgctgtca tcatctgcct catcaccatg 600
 ttcttcacca tgctggctct catggcttct ctctatgtcc acatgttctt gatggccagg 660
 cttcacatta agaggattgc tgcctcccc ggcactggtg ccatccgcca aggtgccaat 720
 atgaagggag cgattacctt gaccatcctg attggcgtct ttgttgtctg ctgggccccca 780
 ttcttctctc acttaatatt ctacatctct tgcctcaga atccatattg tgtgtgcttc 840
 atgtctcact ttaacttgta tctcactctg atcatgtgta attcaatcat cgatcctctg 900
 atttatgcac tccggagtca agaactgagg aaaaccttca aagagatcat ctgttgctat 960
 10 cccttgggag gcctttgtga cttgtctagc agatattaa 999

<210> 4

<211> 332

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

ES 2 676 996 T3

<400> 4

Met Val Asn Ser Thr His Arg Gly Met His Thr Ser Leu His Leu Trp
1 5 10 15
Asn Arg Ser Ser Tyr Arg Leu His Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
20 25 30
Lys Gly Tyr Ser Asp Gly Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro
35 40 45
Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu
50 55 60
Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr
65 70 75 80
Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser
85 90 95
Asn Gly Ser Glu Thr Ile Ile Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr
100 105 110
Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val
115 120 125
Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala
130 135 140
Val Asp Arg Tyr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile
145 150 155 160
Met Thr Val Lys Arg Val Gly Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala
165 170 175
Cys Thr Val Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala
180 185 190
Val Ile Ile Cys Leu Ile Thr Met Phe Phe Thr Met Leu Ala Leu Met
195 200 205
Ala Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys
210 215 220
Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly Thr Gly Ala Ile Arg Gln Gly Ala Asn
225 230 235 240
Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val
245 250 255
Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
260 265 270
Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
275 280 285

ES 2 676 996 T3

Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300

Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
 305 310 315 320

Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser Arg Tyr
 325 330

<210> 5

<211> 1888

5 <212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

atgctcggga agctcaactt ctgagaggct gcgctgtgag tgtgggcgcg cagatgcaga 60
 ggcggctccc agctctccag cgactctcag gaaaaggact ctgaaaagac cccgagtgaa 120
 tactacggct aaagggaaag ccacaaaaaa cgaactgcag actggtcagc cgagagtgag 180
 ctttcagtag cgccagcttc taaagaaatg atgagcaaag ctgaacccag aagagaccaa 240
 caactccttt gcaagctccg ctgcttctga ccctgttcac cgcaggcgcc aactgcagcc 300
 ttccaacttc tacaggcaga caggctggga gaaaaaccac tcggggcttc cctgacctag 360
 gaggttgac cacttcaagg aggattcгаа tccagctgct gcaggaagat gaactccacc 420
 caccaccatg gcatgtatac ttccctccac ctctggaacc gcagcagcca cgggctgcac 480
 ggcaatgccca gcgagtctct ggggaagggg cactcagacg gaggatgcta tgagcaactt 540
 tttgtctccc ccgaggtgtt tgtgactctg ggtgtcataa gcctgttggga gaacattcta 600
 gtgatcgtgg cgatagccaa gaacaagaac ctgcactcac ccatgtactt tttcatctgt 660
 agtctggctg tggcggacat gctggtgagc gtttcgaacg ggtcagaaac catcgtcac 720
 accctgctaa acagtacgga cacggacgcc cagagcttca ccgtgaatat tgataatgtc 780
 attgactctg tgatctgtag ctcttgctc gcatccattt gcagcctgct ttccattgca 840
 gtggacaggt atttactat cttttacgcg ctccagtacc ataacattat gacggttagg 900
 cgggtcggga tcatcatcag ttgtatctgg gcagcttgca cagtatcggg cgttcttttt 960
 atcatttact cggacagcag cgctgtcatc atctgcctca ttaccatggt cttcaccatg 1020
 ctggttctca tggcctctct ctatgtccac atgttcctga tggcgaggct tcacattaag 1080
 aggatcgctg tcctcccggg cacgggtacc atccgacagg gtgccaacat gaagggcgca 1140
 attaccttga ccattctgat tggagtgttt gttgtctgct gggccccgtt tttcctccat 1200
 ttactgttct acatctcttg tcctcagaat ccatactgcg tgtgcttcat gtctcatttt 1260
 aacttgatc tcatactgat catgtgtaac gctgtcatcg accctctcat ttatgccttg 1320
 cggagtcaag aactgaggaa aaccttcaaa gagatcatct gtttctacc cctgggaggc 1380
 atctgtgagt tacctggcag gtattaagtg gggacagagt gcatactagg tagagacctg 1440

10

ES 2 676 996 T3

cagaatttgt cactcaggca caacctgagc agtgacttc ccaacagctg cctctactgt 1500
 atagtgcctt gggtggaaaa tatctactgt ataaaatgta agtttatgac ttttgacgtg 1560
 gggaaaaagt ctcaacgtgt tatgtttatt gacctactt tttttgtgtg taaactgctt 1620
 atttatgttc tacagcgtgg gcgctatgga gttccataaa agaaaaagac acccttatta 1680
 aaactttgac agtgtttctt tccatgttat ttatcaagag tcaacccttg ttctttctgt 1740
 ggtagcagaa atcagagcct tctgaaaagc tgtttcatt gcatcacccc cacagcacag 1800
 cagaagcctg attccactgt ttatggggaa atatttaaac actggatgct cgatcattta 1860
 atgagtcagc tctactcgtg aaatttca 1888

<210> 6

<211> 332

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Asn Ser Thr His His His Gly Met Tyr Thr Ser Leu His Leu Trp
 1 5 10 15
 Asn Arg Ser Ser His Gly Leu His Gly Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
 20 25 30
 Lys Gly His Ser Asp Gly Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro
 35 40 45
 Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu
 50 55 60
 Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr
 65 70 75 80
 Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser
 85 90 95
 Asn Gly Ser Glu Thr Ile Val Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr
 100 105
 Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val
 115 120 125
 Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala
 130 135 140
 Val Asp Arg Tyr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile
 145 150 155 160
 Met Thr Val Arg Arg Val Gly Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala
 165 170 175

10

ES 2 676 996 T3

Cys Thr Val Ser Gly Val Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala
 180 185 190
 Val Ile Ile Cys Leu Ile Thr Met Phe Phe Thr Met Leu Val Leu Met
 195 200 205
 Ala Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys
 210 215 220
 Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly Thr Gly Thr Ile Arg Gln Gly Ala Asn
 225 230 235 240
 Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val
 245 250 255
 Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Leu Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
 260 265 270
 Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Met Cys Asn Ala Val Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Phe Tyr
 305 310 315 320
 Pro Leu Gly Gly Ile Cys Glu Leu Pro Gly Arg Tyr
 325 330

<210> 7

<211> 2769

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 7

gctggctcac aaagatgctc aggaagctga acttctgaga ggctgcggtg tgagtgtggg 60
 cgcgcagatg cagacgcggc tcccagcagt acagcgagtc tcagggaaaa ggactctgaa 120
 aagaccccca gtgaatacta aagtgaaagc cgcactgaga gagagagaaa aaaaagcaaa 180
 cagcagactg gtcaaccgag aatgagcatt cagaagcacc agcttctaaa gagacgatga 240
 tctgagccga acccagaaga gaccaacaac tcctttgcga gttccgctgc tctgaccct 300
 gtcctagca ggcgccaagc gcagcctccc aacttctaca ggcatacaga ctgggagaga 360
 atcactcggg gcttccctga cccaggaggt tggatcagtt caaggaggac tcaaatccag 420
 ctgctgcagg aagatgaact ccaccacca ccatggcatg tataacttccc tccacctctg 480
 gaaccgcagc agctacgggc tgacagcaa tgccagcgag tcgctgggga agggccaccc 540
 ggacggagga tgctatgagc aactttttgt ttccccgag gtgtttgtga ctctgggtgt 600

10

ES 2 676 996 T3

cataagcctg ttggagaaca ttctagtgat cgtggcgata gccagaaca agaacctgca 660
ctcaccatg tactttttca tctgtagcct ggctgtggca gatatgctgg tgagcgtttc 720
gaatgggtcg gaaaccatcg tcattaccct gttaaacagt acggatacgg atgccagag 780
cttcaccgtg aacattgata atgtcattga ctctgtgatc tgtagctcct tgctcgcac 840
catttgcagc ctgctttcca ttgctgtgga caggatattc actatctttt acgcgctcca 900
gtaccataac atcatgacgg ttaggcgggt cgggatcatc ataagttgta tctgggcagc 960
ttgcaactgtg tcaggcgtcc tcttcatcat ttactcggac agcagcgtg tcatcatctg 1020
cctcatttcc atgttcttca ctatgctagt tctcatggcc tctctctatg tccacatggt 1080
cctgatggcg aggcttcaca ttaagaggat tgctgtcctc ccaggcacag ggaccatccg 1140
ccagggtacc aacatgaagg gggcgattac cttgaccatc ctgattggag tctttgttgt 1200
ctgctgggcc ccgttctttc tccatttact gttctacatc tcttgccctc agaatccata 1260
ctgctgtgtc tcatgtctc attttaattt gtatctcata ctgatcatgt gtaacgccgt 1320
catcgacctc tcatttatg ccctccggag tcaagaactg aggaaaactt tcaaagagat 1380
catctgtttc tatcctctgg gaggcatctg tgagttgtct agcaggattt aagtggggga 1440
cagagtgcaa actaggtaga tacctgcaga ctttgcact ctggcccgat ctgagcagtg 1500
tacttcccaa cagctgcctc ttctgtgtaa tgctttgggt gaaaatatct actgtataaa 1560
tgtaagtttg tgacttttga catggaaaaa aaagtctcaa cgtgttatgt ttattgacac 1620
gctatttttt ttgtttgtaa aatgcttatt tatgttctat atagtgtggg cgttatgaat 1680
tgacatgaaa gaaaaacaga cacccttatt aaaactttga cagtgtttct ttctgttat 1740
ttatcaaggt tccacacttg ttctttctgt agtggccgaa atcagaacct tattaacgt 1800
gttctcagct gttctcatgt attagcccca cagtactgca gaggcactga cccactggt 1860
tatggggaaa tatttaaaaca ctacatgctt gatcattaaa atgagtcagc tctcttagtg 1920
aaatttcgag caatcgaata aaagcttgc tattatcctt gctgtccaaa tacctgatg 1980
cttcttttta agtaaaggaa agagaaagg ggaagaagca gctactgagg agaaagtgag 2040
atctctgtca catgcatttc tccaagaagg aatggttcat tgcccagagac tcagagttca 2100
cacaggcaag tcagctgtgg taggggaaat gccacttaa tagattaaag atattataat 2160
agataataat agataaaata gattaataga taaaatagat accaatctta atagattaaa 2220
gtgtcctggt aaatataaac tgtccacacc atgtgaaat ttcttatgcc aatgataacc 2280
ccaccataac agaatgattt ctttctggct tcttaccagg gatctgggtc ctacagaaag 2340
gtctagaaca gctccctctg cacttagagg tccagcgttc atttcatctt agagttaata 2400
gtgagttgtg ctatctttca tgtggcgggg gacttggtgt tcactttctg attacttttt 2460
gagctggaat ataagtgtg aagatcaagt gatttaattc ccaagccaaa tccacatcac 2520
aaaacatttt gggacagggt ttgtaaataat ctaaagtgtg gagccctgtg gtgcttgcac 2580
ataacgagat ggaaagagaa ccaaatggg gtcctggaag gtacagtaaa acaccctgct 2640
gttcttagtc atgtcttggg atggggaatg cttgttttct ccaaactaat accaaagggt 2700
tggccactga gcaaccaaat ctatgctttc tagtctgtgt atactttgaa ataaaagggg 2760
taaaaacct 2769

<210> 8

5

<211> 332

ES 2 676 996 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

5

```

Met Asn Ser Thr His His His Gly Met Tyr Thr Ser Leu His Leu Trp
 1          5          10          15

Asn Arg Ser Ser Tyr Gly Leu His Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
 20          25          30

Lys Gly His Pro Asp Gly Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro
 35          40          45

Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu
 50          55          60

Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr
 65          70          75          80

Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser
 85          90          95

Asn Gly Ser Glu Thr Ile Val Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr
100          105          110

Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val
115          120          125

Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala
130          135          140

Val Asp Arg Tyr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile
145          150          155          160

Met Thr Val Arg Arg Val Gly Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala
165          170          175

Cys Thr Val Ser Gly Val Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala
180          185          190

Val Ile Ile Cys Leu Ile Ser Met Phe Phe Thr Met Leu Val Leu Met
195          200          205
    
```

ES 2 676 996 T3

Ala Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys
 210 215 220
 Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly Thr Gly Thr Ile Arg Gln Gly Thr Asn
 225 230 235
 Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val
 245 250 255
 Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Leu Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
 260 265 270
 Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Met Cys Asn Ala Val Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Phe Tyr
 305 310 315 320
 Pro Leu Gly Gly Ile Cys Glu Leu Ser Ser Arg Tyr
 325 330

<210> 9

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN, Nle

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

<223> D aminoácido

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> AMIDACIÓN

<400> 9

5 Xaa Gly Lys Phe Arg Trp Gly
1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN, Nie

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

<223> beta-naftilalanina (2)

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> AMIDACIÓN

30 <400> 10

Xaa Gly Lys Xaa Arg Trp Gly
1 5

<210> 11

35 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético, cíclico

5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN, Nle

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(4)
<223> Nle

15

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (7)..(7)
<223> beta-naftilalanina (2')

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> AMIDACIÓN

25

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Asp His Xaa Arg Trp Lys
1 5 10

30

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> ACETILACIÓN

5

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> D-(2') beta-naftilalanina

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> AMIDACIÓN

15

<400> 12

Cys Glu His Xaa Arg Trp Gly Cys Pro Pro Lys Asp
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Nle

35

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> D-(2') beta-naftilalanina

5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> AMIDACIÓN

10

<400> 13

Cys Xaa Arg His Xaa Arg Trp Gly Cys
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> D-Phe (3,4-di-cl)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> AMIDACIÓN

35

ES 2 676 996 T3

<400> 14

Cys Glu His Phe Arg Trp Gly Cys Pro Pro Lys Asp
1 5 10

5 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido sintético, cíclico

<220>
<221> MOD_RES

15 <222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN, Nle

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

20 <222> (2)..(2)
<223> c [Asp

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

25 <222> (3)..(3)
<223> Che

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

30 <222> (4)..(4)
<223> Dnal (2')

<220>
<221> MOD_RES

35 <222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

ES 2 676 996 T3

<400> 15

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys
1 5

5 <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN, Nle

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

20 <222> (2)..(2)

<223> c[Asp

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

25 <222> (3)..(3)

<223> Cpe

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

30 <222> (4)..(4)

<223> Dnal (2')

<220>

<221> MOD_RES

35 <222> (7)..(7)

<223> AMIDACIÓN

ES 2 676 996 T3

<400> 16

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys
1 5

5 <210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (1)..(1)

<223> BLOQUEADO, ciclo (1,6) - suc

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

20 <222> (2)..(2)

<223 > aminoácido D

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (5)..(5)

<223> AMIDACIÓN

<400> 17

30

His Phe Arg Trp Lys
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN, aminoácido D

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> aminoácido D

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> AMIDACIÓN

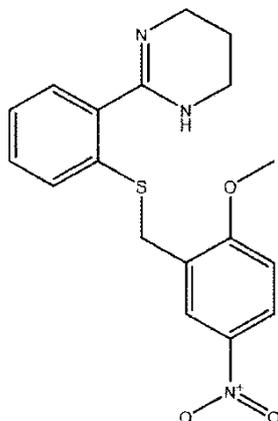
<400> 18

20

Arg Cys Glu His Phe Arg Trp Cys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una chaperona farmacológica que es un antagonista del polipéptido de receptor de melanocortina 4 (MC4R) que tiene la siguiente estructura:



- 5 en la que la chaperona farmacológica se une a un polipéptido MC4R mutante, para su uso en el tratamiento de obesidad o trastorno por atracón, en la que la chaperona va a administrarse a un individuo que tiene una mutación en el gen MC4R asociado a obesidad, y en la que la mutación está seleccionada del grupo que consiste en T11A, S58C, P78L, N97D, G98R, I102S, I106P, Y157S, R165Q, R165W, A175T, L250Q, C271R, Y287X, I316L, I316S y I317T con respecto a la secuencia del polipéptido MC4R no mutante expuesta en SEQ ID NO: 2.
- 10 2. La chaperona para su uso según la reivindicación 1, en la que la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante para
1. aumentar la actividad de MC4R mutante;
 2. aumentar la expresión de la superficie celular de MC4R mutante; y/o
 3. aumentar la estabilidad.
- 15 3. La chaperona para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido MC4R mutante comprende la mutación S58C, R165Q o R165W con respecto a la secuencia del polipéptido MC4R no mutante expuesta en SEQ ID NO: 2.
4. La chaperona para su uso según la reivindicación 1, en la que la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante ya que está plegado en una conformación funcional.
- 20 5. La chaperona para su uso según la reivindicación 2, en la que la actividad potenciada por la chaperona farmacológica es activación de adenilil ciclasa.
6. La chaperona para su uso según la reivindicación 2, en la que la chaperona farmacológica aumenta el tráfico de polipéptido MC4R mutante a la membrana celular.
7. La chaperona para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la chaperona farmacológica va a administrarse en un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 25 8. La chaperona para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la chaperona se administra en una cantidad de 1 a 100 mg/kg de peso corporal por día.

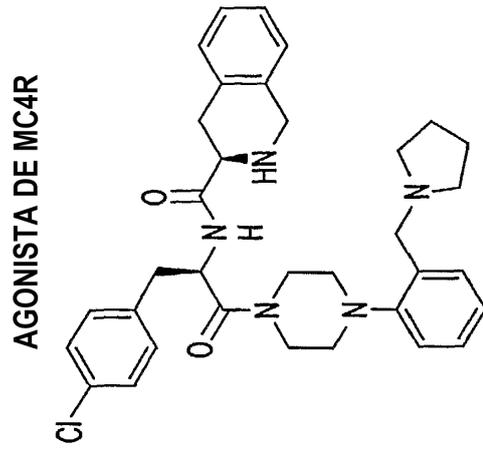


FIG.2

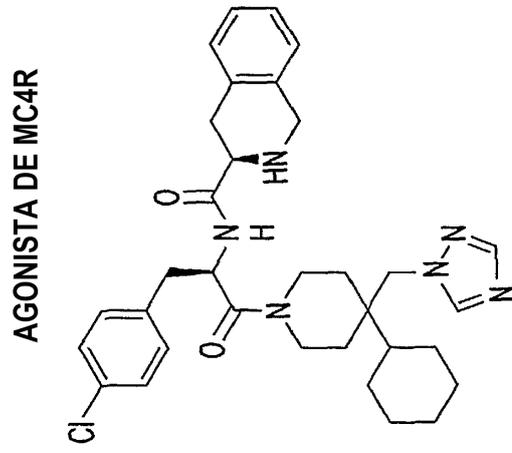
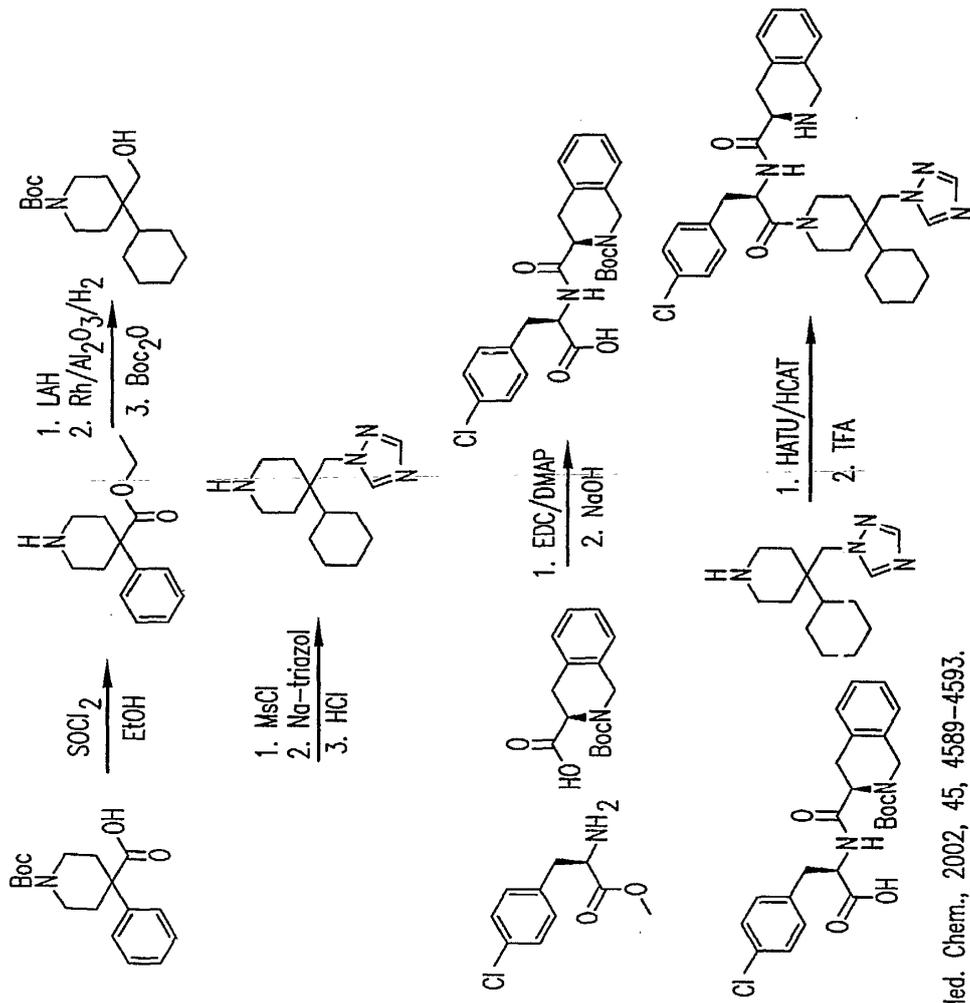
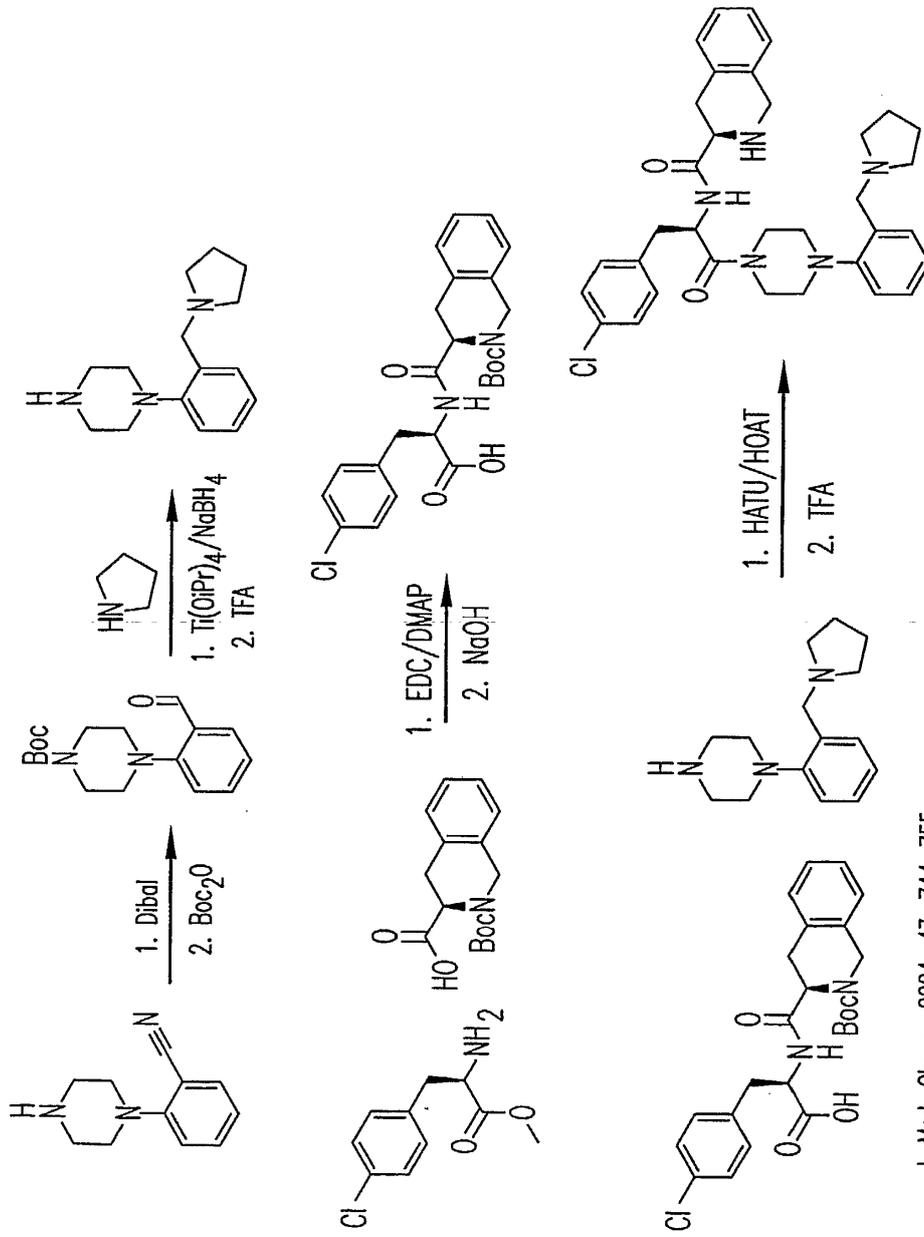


FIG.1



J. Med. Chem., 2002, 45, 4589-4593.
 J. Med. Chem., 2004, 47, 744-755.

FIG.3



J. Med. Chem., 2004, 47, 744-755.

FIG.4

ANTAGONISTA DE MC4R

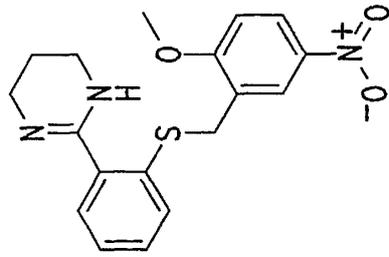


FIG. 5

ANTAGONISTA DE MC4R

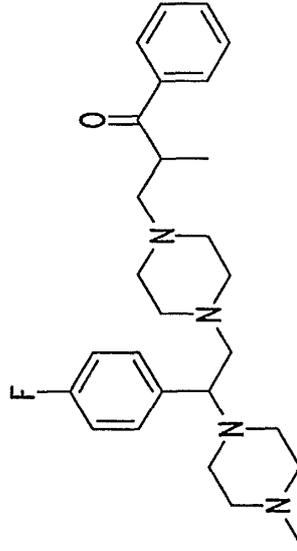
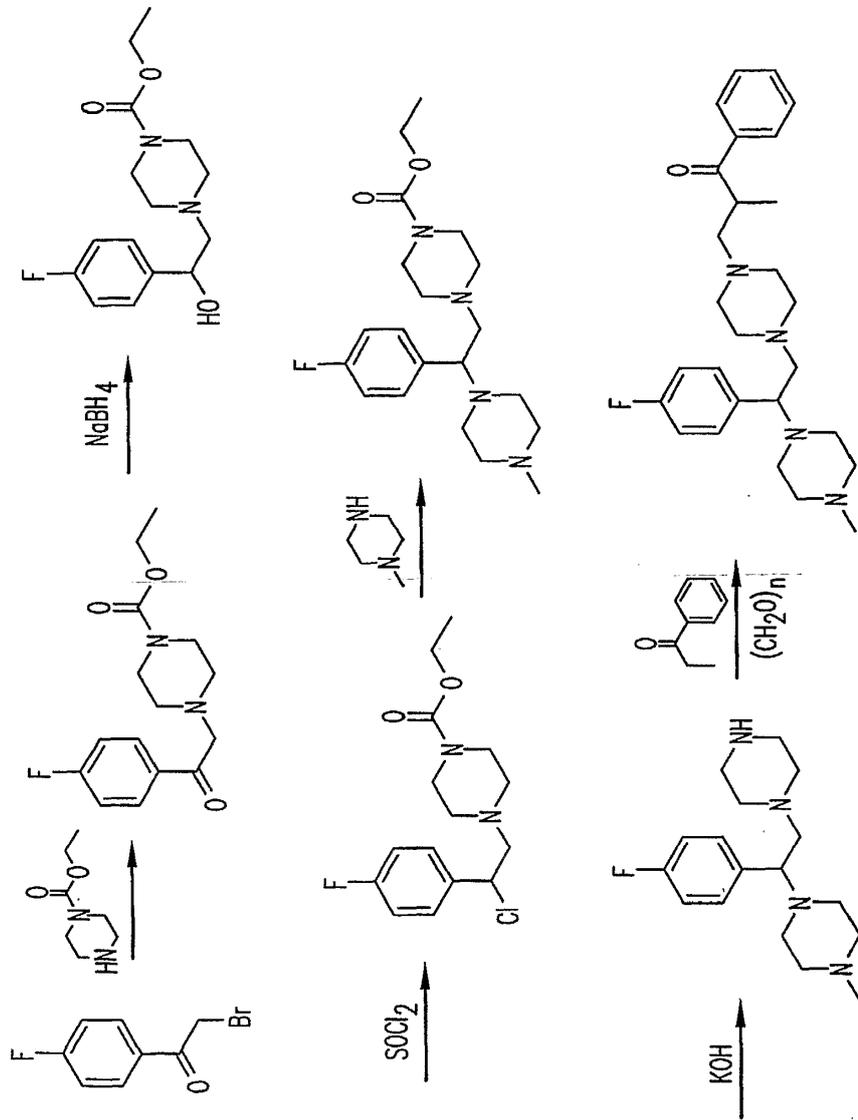


FIG. 6



J. Med. Chem., 2003, 46, 9-11.

FIG. 7

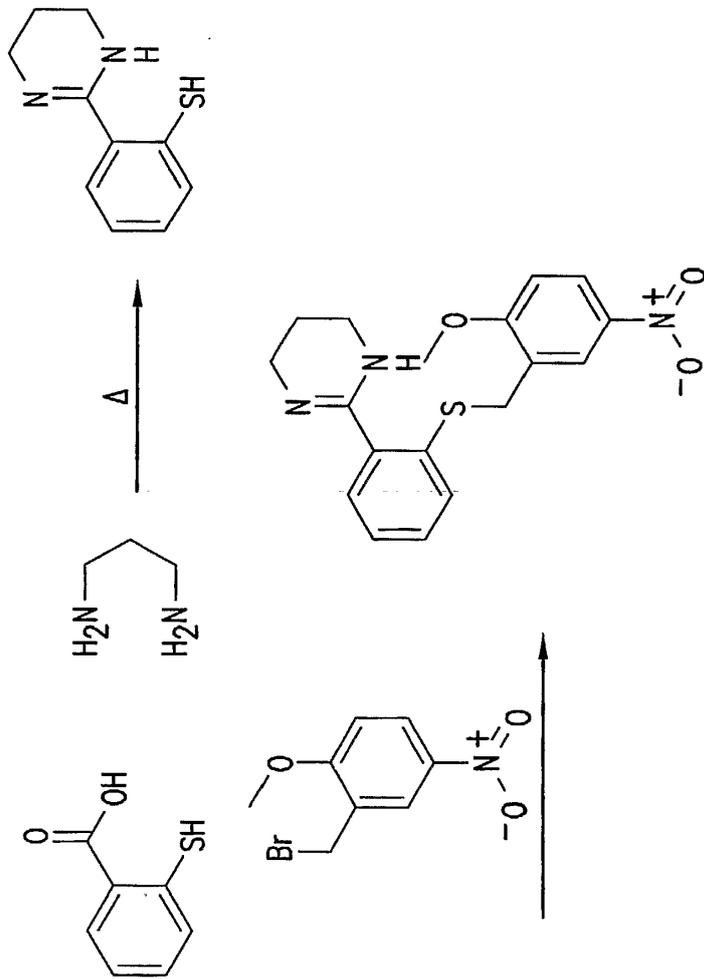


FIG.8

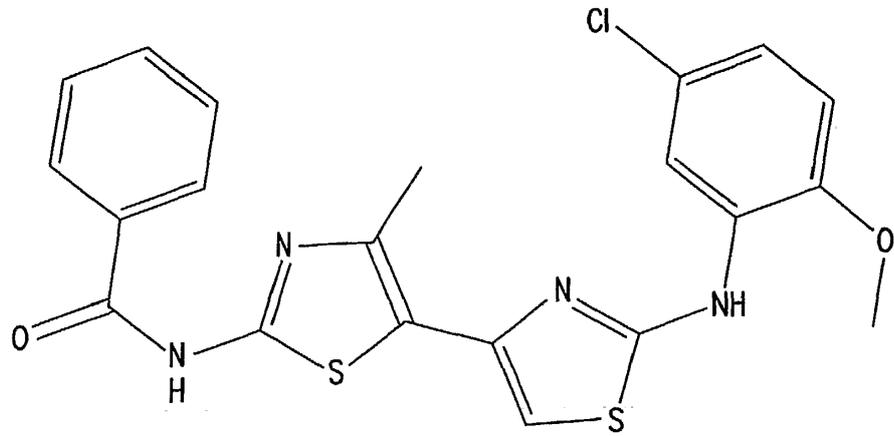


FIG. 9

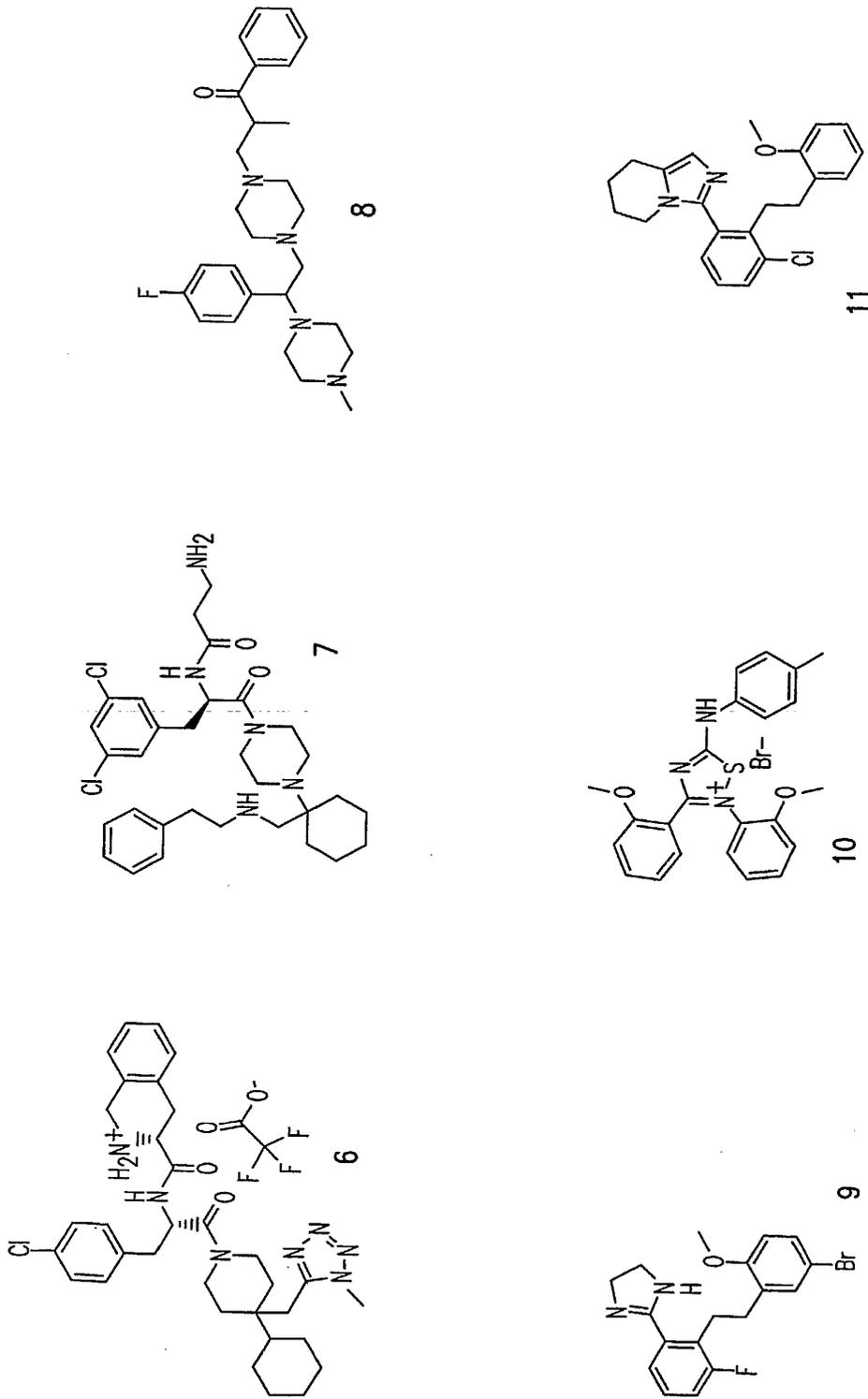


FIG.10A

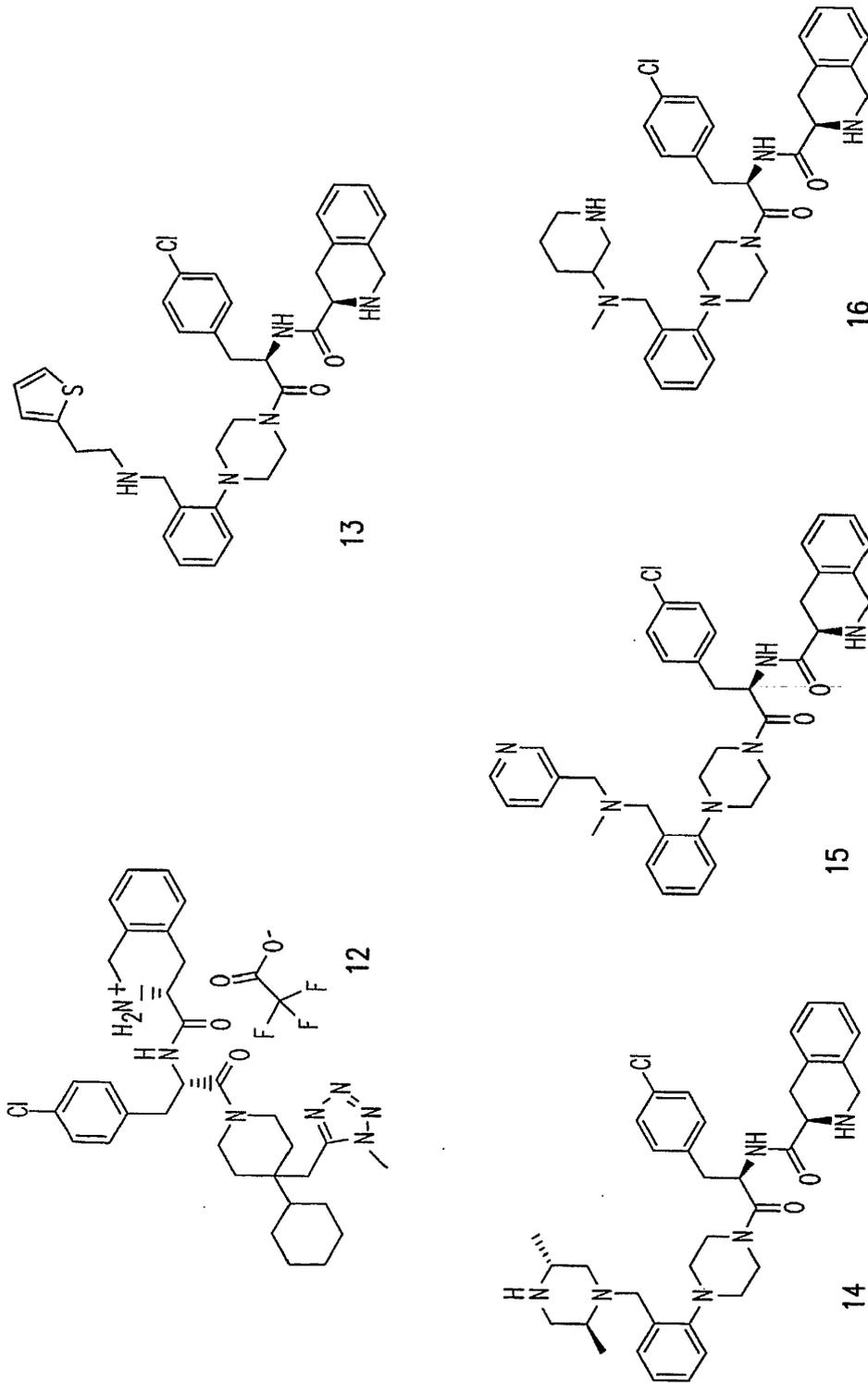


FIG. 10B

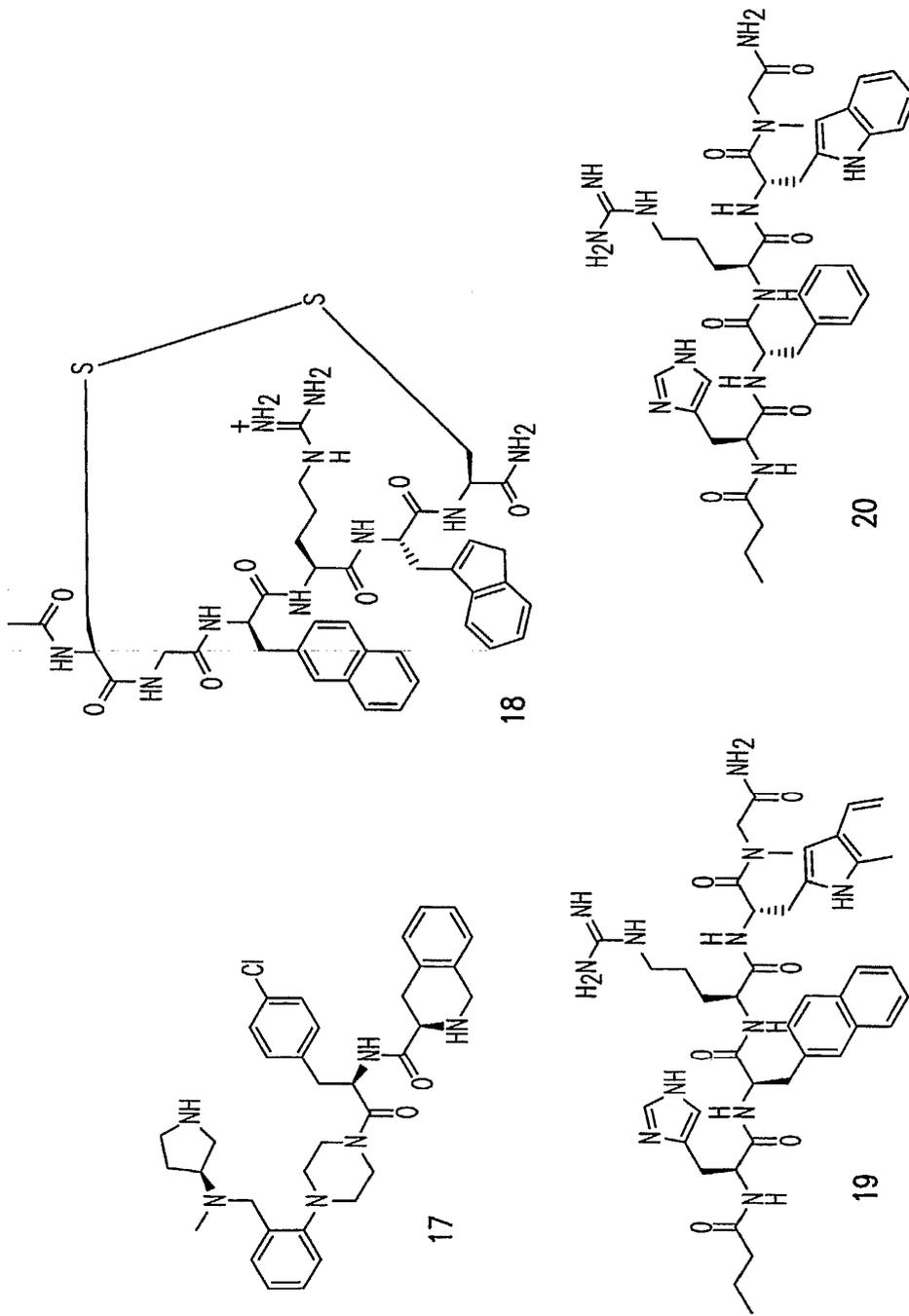


FIG. 10C

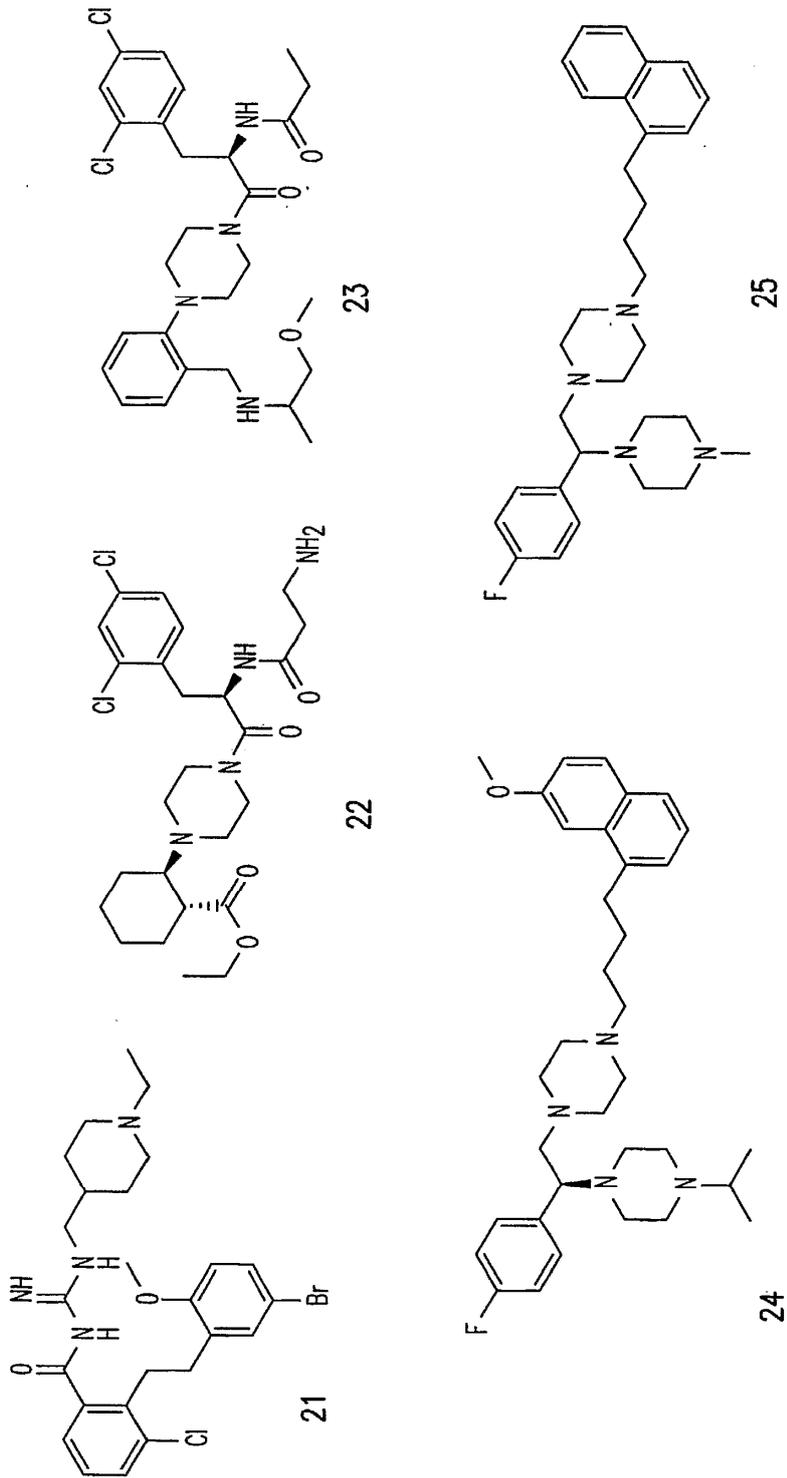


FIG. 10D

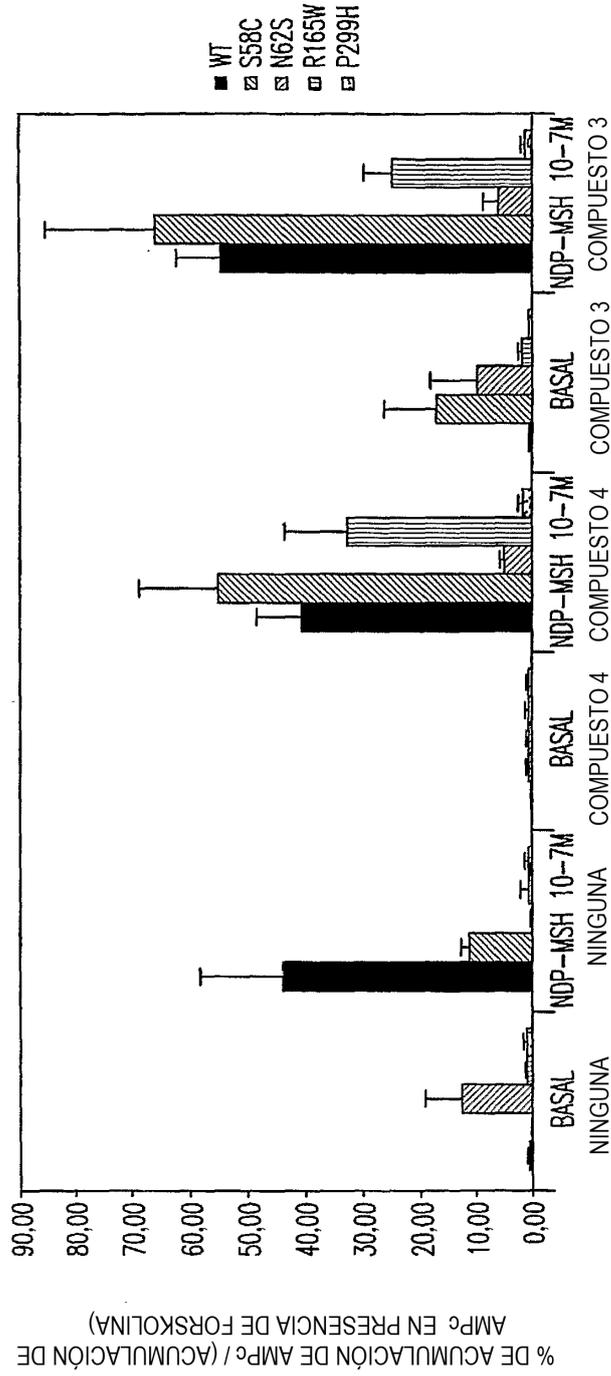
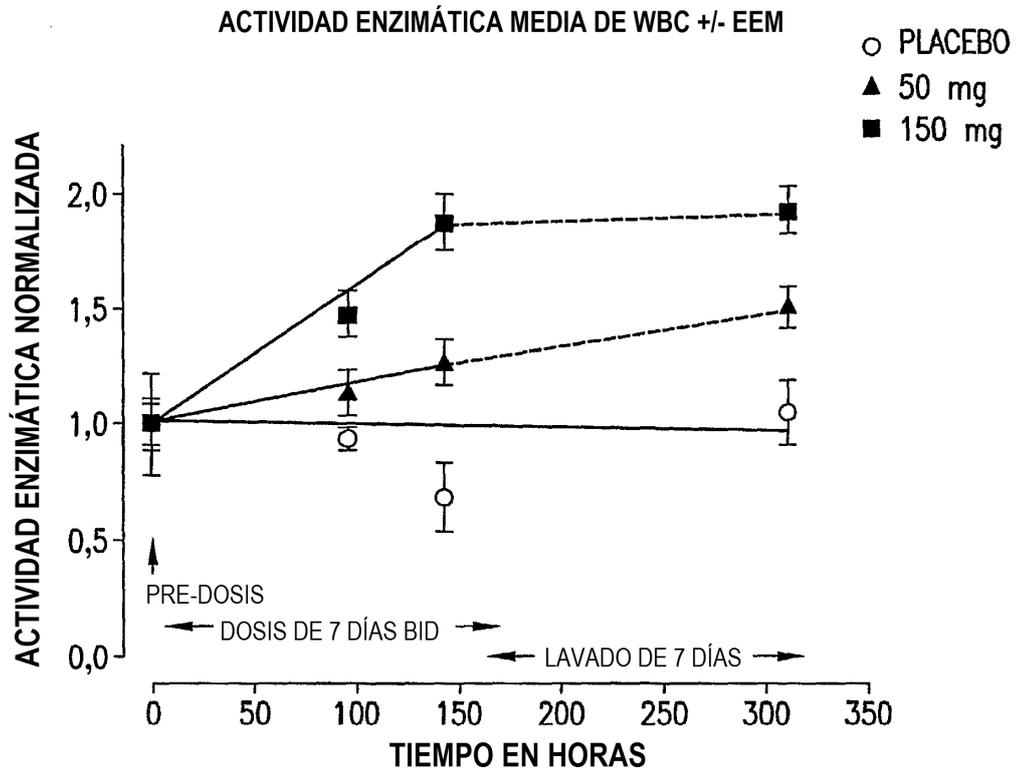


FIG.11



LOS VALORES SE NORMALIZARON A LOS VALORES DE PRE-DOSIS DE CADA GRUPO
 (n=6 PARA GRUPOS TRATADOS, n=4 PARA GRUPO DE PLACEBO)

FIG.12

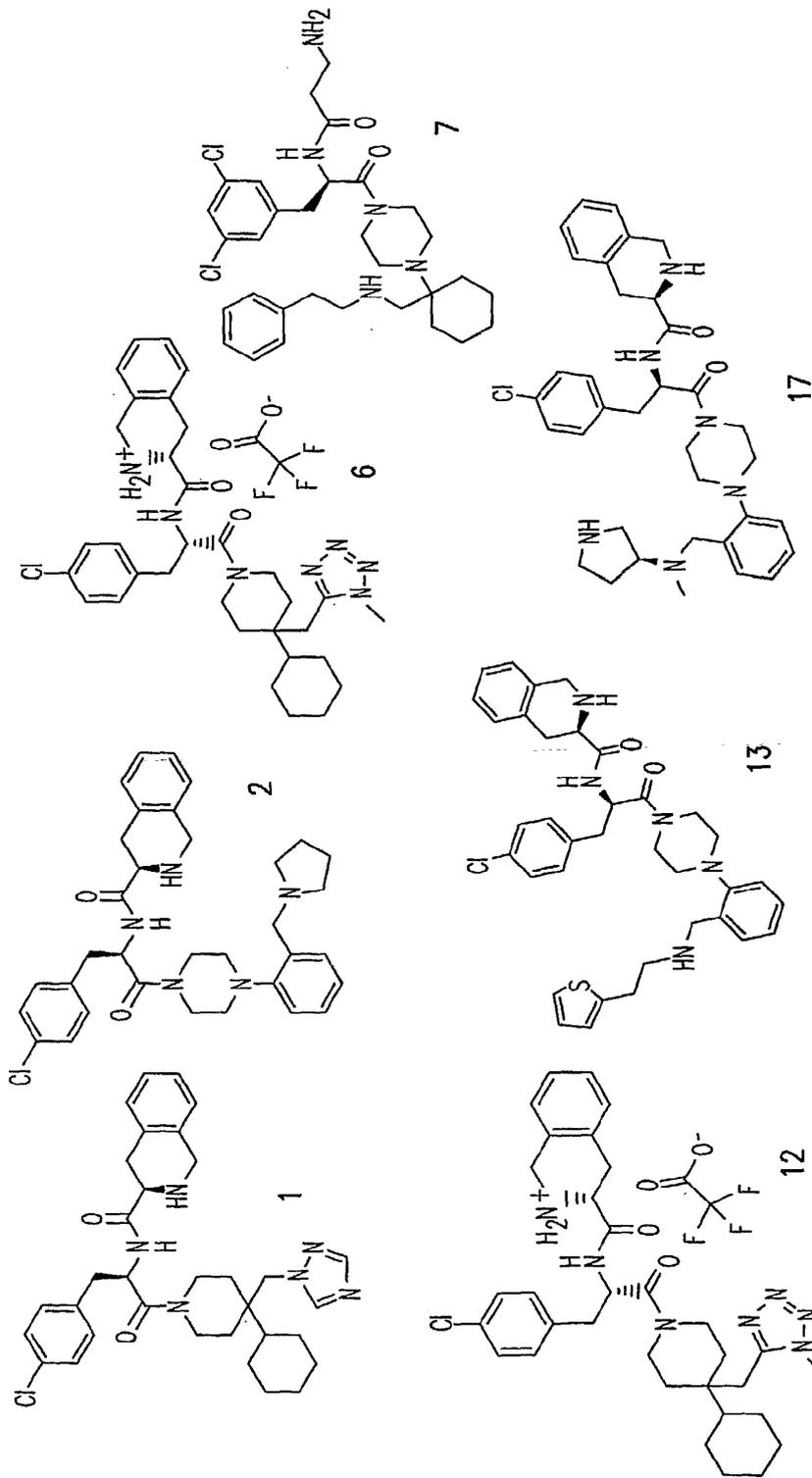


FIG.13

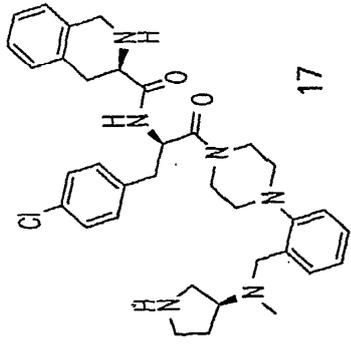
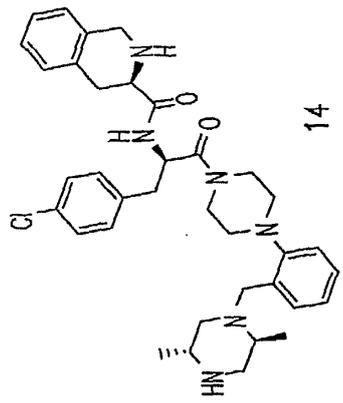
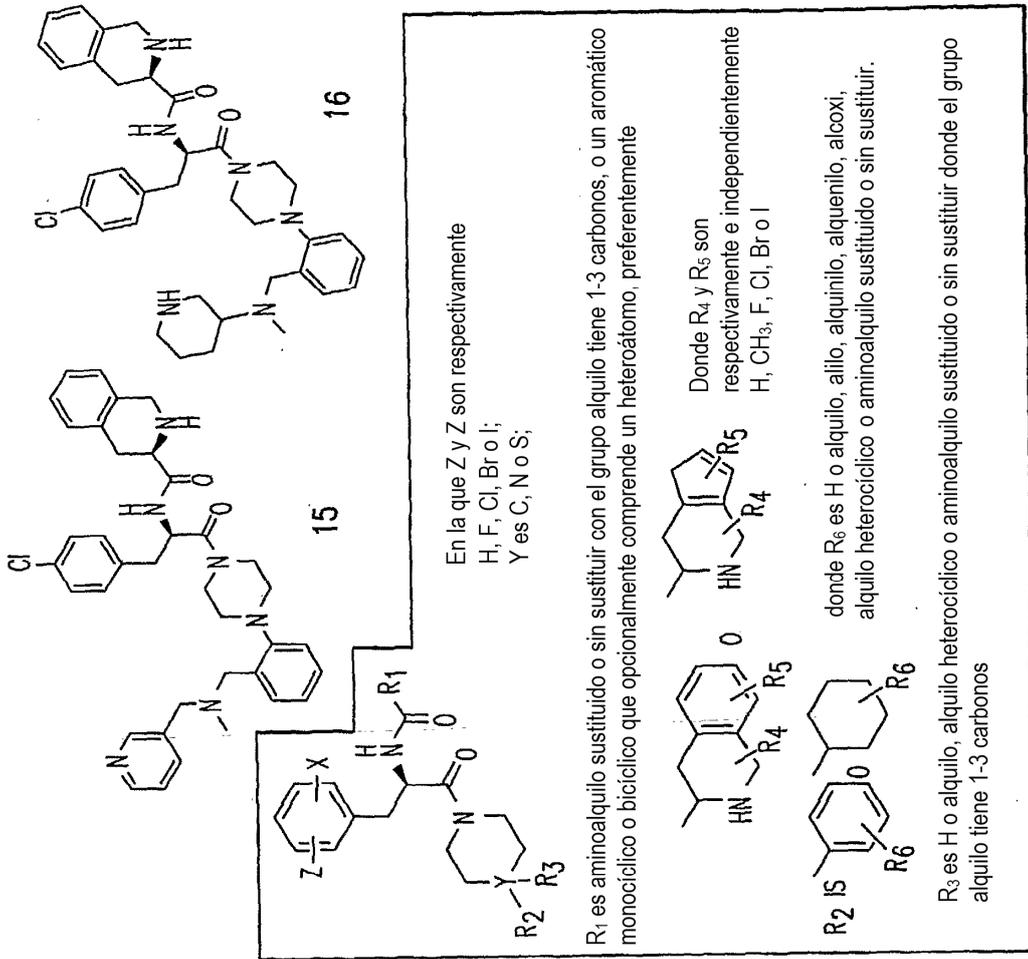
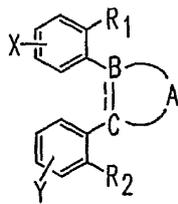
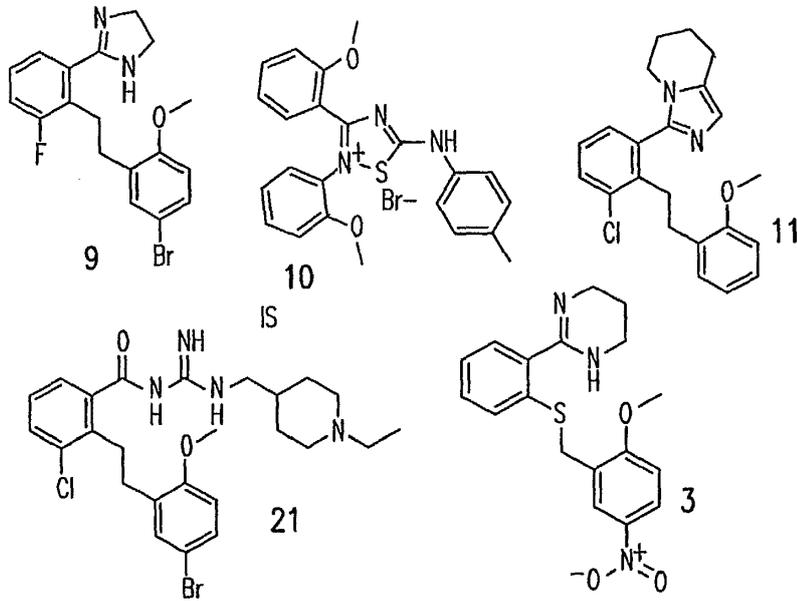


FIG. 13 continuación



donde X e Y son respectivamente e independientemente H, F, Cl, Br, I o NO₂;

A es o sin enlace;

B-F son respectivamente e independientemente C, N o S;

R₁ es un heterociclilo, alcoxi o carbamoilo sustituido;

R₂ es H o -OCH₃; y

R₃ es amino sustituido

Cuando R₁ es heterociclilo, el heterociclilo incluye preferentemente incluye

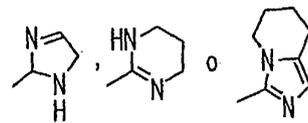
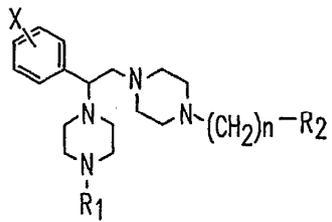
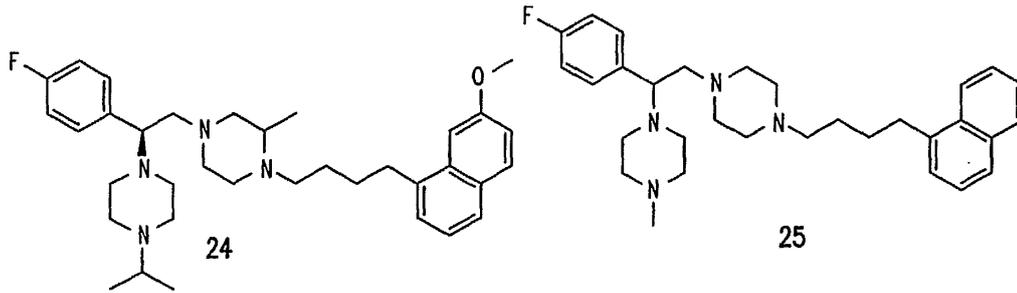
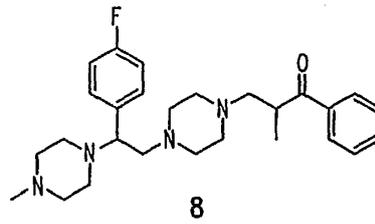
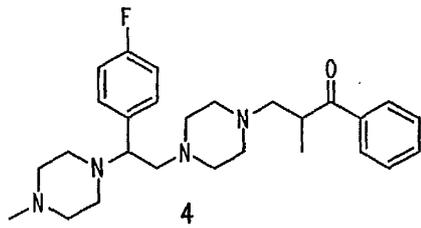
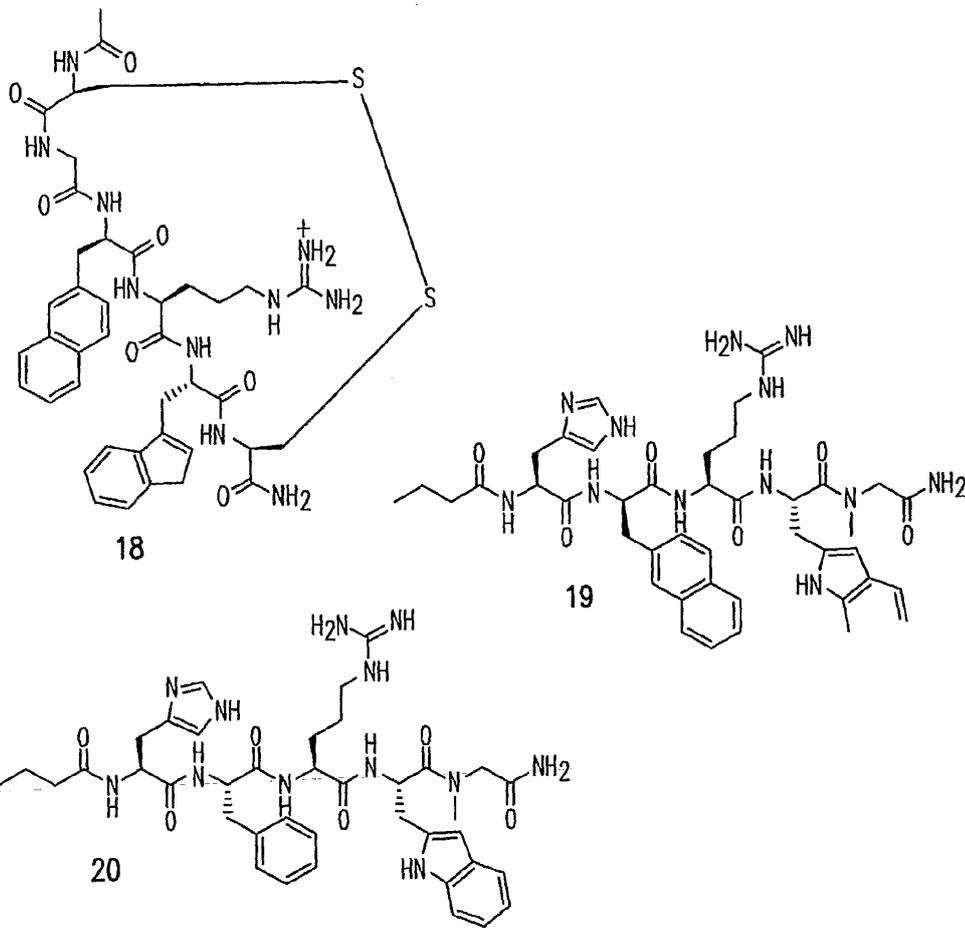


FIG. 14



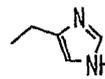
en la que X es F, Cl, Br o I; en realizaciones particulares X es F en la posición para.
 R₁ es alquilo, alquinilo, alquenilo, alilo, alcoxi, heteroalquilo, etc.; en realizaciones particulares el grupo alquilo tiene C₁₋₆, más preferentemente C₁₋₃;
 R₂ es arilo, heteroarilo o arilcarbonilalquilo sustituido o sin sustituir;
 n es 1-4.

FIG. 15

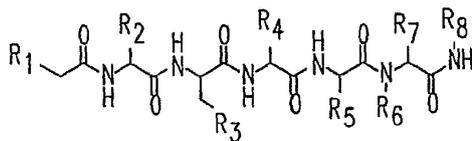


En la que R₁ es alquilo con C₁₋₃;
R₂ es -S- o H;

R₃ es H o



R₄ es aminoalquilo teniendo el alquilo C₁₋₅, en realizaciones particulares guanidinoalquilo teniendo el alquilo C₁₋₅, preferentemente C₁₋₃;



R₅ es un arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; y

R₆ es H, CH₃ o alquilo C₁₋₃;

R₇ es H o -S-

R₈ es H, CH₃ o alquilo C₁₋₃.

FIG.16