

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 675**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/72** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61K 31/497** (2006.01)

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 31/4164** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2006 E 15153180 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2933265**

54 Título: **Chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la 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:

**26.04.2019**

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**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 710 675 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 el tratamiento de la obesidad

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a procedimientos para potenciar la actividad normal del receptor de melanocortina-4 (MC4R), y a potenciar la actividad de un MC4R que tiene una mutación o mutaciones que afectan al plegamiento de proteínas y/o al procesamiento del MC4R. La invención proporciona un procedimiento para tratar a un individuo que padece una afección en la que un aumento en la actividad de un MC4R en la superficie celular sería beneficioso, tal como en la obesidad, mediante la administración de una cantidad eficaz de una chaperona farmacológica para el MC4R. La invención proporciona chaperonas farmacológicas para el MC4R que potencian la actividad del MC4R. La invención proporciona además un procedimiento de cribado para identificar chaperonas farmacológicas que mejoran el plegamiento de un MC4R en el retículo endoplasmático (RE), a fin de potenciar la actividad del MC4R en la superficie celular.

Antecedentes de la invención

## 20 Obesidad

La obesidad representa el trastorno de peso corporal más frecuente, y es el trastorno nutricional más importante en el mundo occidental, estimándose que su prevalencia varía entre el 30% y el 50% de la población de mediana edad. Las cifras de estadounidenses con sobrepeso y obesos han seguido aumentando desde 1960, una tendencia que no se está ralentizando. Actualmente, el 64,5 por ciento de los adultos estadounidenses (aproximadamente 127 millones) se clasifican como obesos o con sobrepeso. Cada año, la obesidad causa al menos 300.000 muertes en Estados Unidos, y los costes sanitarios de adultos estadounidenses con obesidad ascienden a aproximadamente 100 mil millones de dólares (American Obesity Association).

La obesidad aumenta el riesgo de un individuo de desarrollar afecciones tales como hipertensión arterial, diabetes (tipo 2), hiperlipidemia, cardiopatía, hipertensión, apoplejía, enfermedad de la vesícula biliar y cáncer de mama, de próstata y de colon (véase, por ejemplo, Nishina, P. M. et al., 1994, *Metab.* 43: 554-558; Grundy, S. M. y Barnett, J. P., 1990, *Dis. Mon.* 36: 641-731). En los Estados Unidos, la incidencia de sobrepeso u obesidad se produce en tasas más elevadas en poblaciones de minorías raciales/étnicas, tales como los afroamericanos y los hispanos, en comparación con los estadounidenses de raza blanca. Las mujeres y las personas de bajo estatus socioeconómico dentro de poblaciones minoritarias parecen verse 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 (de 6 a 11 años) tienen sobrepeso y el 15,3 por ciento son obesos. Para los adolescentes (de 12 a 19 años), el 30,4 por ciento tiene sobrepeso y el 15,5 por ciento es obeso. La diabetes, la hipertensión y otras enfermedades crónicas relacionadas con la obesidad que están generalizadas entre adultos se han vuelto ahora más comunes en niños y adultos jóvenes. Se ha informado que los malos hábitos alimenticios y la inactividad contribuyen al aumento de la obesidad en los jóvenes.

Además, los factores de riesgo para el desarrollo de obesidad infantil incluyen tener padres con sobrepeso, o padres despreocupados por el peso de sus hijos, una mayor ingesta de energía debido al mayor tamaño de las porciones, un estilo de vida más sedentario y una menor actividad relacionada con el transporte (caminar a la escuela o a la parada de autobús), tener un temperamento con altos niveles de enfado/frustración (lo que puede hacer que los padres den a sus hijos alimentos y calorías adicionales para disminuir las rabietas); padecer síndrome de Down, el índice de masa corporal (IMC) durante el embarazo de la madre y ser el primogénito (mayor prevalencia de obesidad).

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

Los factores de riesgo para desarrollar obesidad en la edad adulta incluyen una dieta deficiente (alta en calorías y baja en nutrientes); falta de actividad física; trabajar en turnos variados; dejar de fumar, padecer determinadas afecciones médicas tales como enfermedades hereditarias raras y desequilibrios hormonales (como hipotiroidismo, enfermedad de Cushing y síndrome del ovario poliquístico); determinados medicamentos (esteroides y algunos antidepresivos); pertenecer a una minoría racial o étnica (especialmente una minoría femenina); bajo estatus socioeconómico; edad (aumento del riesgo de 20 a 55 años), embarazo; y jubilación (debido a la alteración del horario).

## 65 Receptor de melanocortina 4 y obesidad

El receptor de melanocortina 4 (MC4R) se ha implicado en la regulación del peso corporal (Graham et al., *Nat. Genetics* 1997; 17: 273-4). El MC4R se expresa en el cerebro, incluido el hipotálamo, lo que influye en la ingesta de alimentos. Se han encontrado numerosas mutaciones que afectan a la actividad de MC4R y muchas están asociadas con la obesidad, incluida la 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).

#### Tratamientos actuales

Los fármacos actuales contra la obesidad tienen una eficacia limitada y numerosos efectos secundarios (Crowley, V. E., Yeo, G. S. y O'Rahilly, S., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1, 276-86). Con la obesidad alcanzando proporciones epidémicas a lo largo del mundo, existe la necesidad apremiante de desarrollar productos terapéuticos adecuados en este campo. En los últimos años, han surgido hormonas y neuropéptidos implicados en la regulación del apetito, el gasto de energía corporal y la acumulación de masa grasa como fármacos potenciales contra la obesidad (McMinn, J. E., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W., *Obes Rev* 2000; 1: 37-46; Drazen, D. L. y Woods, S. C., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 621-629). En la actualidad, no obstante, estos péptidos requieren administración parenteral. La perspectiva de inyecciones diarias para controlar la obesidad durante largos períodos 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 plegamiento apropiado de proteínas

Las proteínas se sintetizan en el citoplasma y las proteínas recién sintetizadas se secretan en el lumen del retículo endoplasmático (RE) en un estado en gran parte desplegado. En general, el plegamiento de proteínas se rige por el principio de autoensamblaje. Los polipéptidos recién sintetizados se pliegan en su conformación nativa basándose en sus secuencias de aminoácidos (Anfinsen y otros, *Adv. Protein Chem.* 1975; 29: 205-300). El plegamiento de proteínas *in vivo* es complicado, debido a que la combinación de temperatura ambiente y una concentración elevada de proteínas estimula el proceso de agregación, en el que los aminoácidos, normalmente enterrados en el núcleo hidrófobo, interactúan de forma no específica con sus vecinos. Para evitar este problema, el plegamiento de proteínas viene generalmente facilitado por un grupo especial de proteínas denominadas chaperonas, que evitan que las cadenas polipeptídicas emergentes formen agregados uniéndose a la proteína desplegada de forma que la proteína se vuelva a plegar en la conformación nativa (Hartl, *Nature* 1996; 381: 571-580).

En prácticamente todos los tipos de células y en la mayor parte de los compartimentos celulares hay presencia de chaperonas moleculares endógenas. Algunas están implicadas en el transporte de proteínas y permiten que las células sobrevivan bajo tensiones tales como choque térmico y carencia 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, la BiP (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina, Grp78) es la chaperona mejor caracterizada del RE (Haas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991; 167: 71-82). Al igual que otras chaperonas, la BiP interactúa con muchas proteínas secretoras y de membrana dentro del RE a lo largo de su maduración. Cuando el plegamiento de proteínas incipiente se produce sin problemas, esta interacción es normalmente débil y de corta duración. Una vez que se logra la conformación de proteína nativa, la chaperona molecular ya no interactúa con la proteína. La unión de BiP a una proteína que no se pliega, no se ensambla o no está adecuadamente glicosilada se vuelve estable, y generalmente conduce a la degradación de la proteína mediante la ruta de degradación asociada al RE. Este proceso sirve como un sistema de "control de calidad" en el RE, asegurando que solo las proteínas plegadas y ensambladas se transporten fuera del RE para una posterior maduración, y las proteínas incorrectamente plegadas se retengan para su posterior degradación (Hurtley et al., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1989; 5: 277-307). Debido a las acciones combinadas de ineficacia del proceso de plegamiento de la proteína termodinámico y del sistema de control de calidad del RE, solo una fracción de las proteínas emergentes (no mutadas) se pliegan en una conformación funcional y abandonan exitosamente el RE.

Las chaperonas farmacológicas derivadas de inhibidores de enzimas específicos rescatan enzimas mutantes y mejoran enzimas de tipo silvestre

Se ha demostrado previamente que los inhibidores de molécula pequeña de enzimas asociadas con trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD) pueden rescatar el plegamiento y la actividad de la enzima mutante, y mejorar el plegamiento y la actividad de la enzima de tipo silvestre (véanse las patentes de Estados Unidos N° 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964, 6.599.919 y 6.916.829, que se incorporan todas al presente documento por referencia). En particular, se descubrió que la administración de derivados de molécula pequeña de glucosa y galactosa, que eran inhibidores competitivos específicos de enzimas mutantes asociadas con LSD, aumentaba eficazmente la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de las enzimas mutantes y potenciaba la actividad de las enzimas mutante. La teoría original detrás de esta estrategia es la siguiente: dado que la proteína enzimática mutante se pliega incorrectamente en el RE (Ishii et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retrasa en la ruta de transporte normal (RE → aparato de Golgi → endosoma → lisosoma) y se degrada rápidamente. Por lo tanto, un compuesto que estabiliza el plegamiento correcto de una proteína mutante servirá como una chaperona específica del sitio activo para promover que la proteína mutante escape sin problemas del sistema de control de

calidad del RE. Los inhibidores de la enzima ocupan el centro catalítico, lo que tiene como resultado la estabilización de la conformación de la enzima en células en cultivo y en animales. Estas chaperonas específicas se denominaron "chaperonas específicas del sitio activo (ASSC)", ya que se unen al sitio activo de la enzima.

5 Además de rescatar las enzimas mutantes, las ASSC potencian la secreción del RE y la actividad de las enzimas de tipo silvestre recombinantes. Una ASSC facilita el plegamiento de la enzima de tipo silvestre sobreexpresada, que de otra manera se retrasaría en el sistema de control de calidad del RE debido a que la sobreexpresión y la producción excesiva de la enzima excede la capacidad del RE y conduce a la agregación y degradación de proteínas. Por lo tanto, un compuesto que induce una conformación molecular estable de una enzima durante el plegamiento sirve como "chaperona" para estabilizar la enzima en una conformación adecuada para abandonar el RE. Tal como se ha indicado anteriormente, para enzimas, uno de dichos compuestos resultó ser inesperadamente un inhibidor competitivo de la enzima.

Mejora de otras proteínas con chaperonas

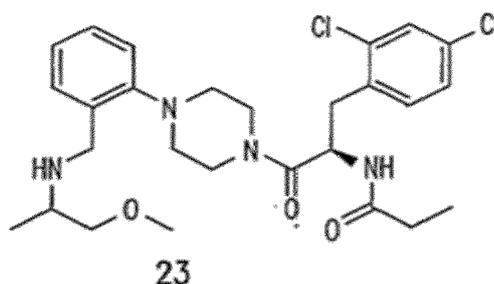
15 Además de los LSD, una serie amplia y diversas de enfermedades se reconocen actualmente como "enfermedades conformacionales" que están provocadas por la adopción de conformaciones de proteína no nativa, lo que puede llevar a un retraso de la proteína en el RE y a una degradación final de las proteínas. (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 ha descubierto que algunos compuestos sintéticos pequeños estabilizan el dominio de unión al ADN de formas mutantes de la proteína p53 supresora de tumores, lo que permite a la proteína mantener una conformación activa (Foster et al., *Science* 1999; 286: 2507-10). Se ha demostrado que la síntesis de receptores está rescatada por antagonistas y ligandos de receptores de molécula pequeña (Morello y otros, *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 de canal de membrana y otros transportadores de la membrana plasmática mediante el uso de fármacos o sustratos bloqueadores de canales (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. Invest.* 2005; 115: 2564-71).

Sigue existiendo en la técnica la necesidad particular de abordar las deficiencias en la función de la proteína MC4R que están relacionadas y no relacionadas con una mutación de MC4R.

35 Sumario de la invención

Tal como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona una chaperona farmacológica para el receptor de melanocortina 4 (MC4R) para su uso en el tratamiento de la obesidad o la prevención de la obesidad en un paciente que posee un polipéptido MC4R mutante, en el que la chaperona farmacológica es el compuesto 23:



45 y en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación asociada con el plegamiento incorrecto del polipéptido MC4R.

Preferentemente, la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante para

- 50 i. aumentar la actividad de MC4R mutante;
- ii. aumentar la expresión en la superficie celular de MC4R mutante y/o
- iii. aumentar la estabilidad.

55 De forma más preferida, el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en P78L, R165Q, R165W, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, I97D, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, Y157S, I102S, L106P, L250Q y Y287X en comparación con la SEQ ID NO: 2.

De forma aún más preferida, el polipéptido MC4R mutante comprende la mutación C271Y, R165Q, R165W, S58C o N62S en comparación con la SEQ ID NO: 2.

5 Preferentemente, la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante cuando se está plegando en una conformación funcional.

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

10 Preferentemente, la chaperona farmacológica aumenta el transporte del polipéptido MC4R mutante a la membrana celular.

Preferentemente, la chaperona debe administrarse a un individuo que comprende una mutación en un gen de MC4R que se ha asociado con la obesidad.

15 Preferentemente, la chaperona farmacológica debe 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.

20 La presente invención se entenderá adicionalmente mediante referencia a la Descripción detallada y a los Ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Un agonista de los receptores de melanocortina-4 de rata y humanos, según se informa por Sebhat, 2002, *J Med Chem*, 45, 4589-4593 (compuesto 1).

Figura 2. Un agonista del MC4R humano, según se informa por Richardson, 2004, *J Med Chem* 47, 744-755 (compuesto 2).

30 Figura 3. Esquema de síntesis para el compuesto 1.

Figura 4. Esquema de síntesis para el compuesto 2.

35 Figura 5. Un antagonista de MC4R, según se informa por Arasasingham, 2003, *J Med Chem* 46, 9-11 (compuesto 3).

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

40 Figura 7. Esquema de síntesis para el compuesto 3.

Figura 8. Esquema de síntesis para el compuesto 4.

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

Figura 10A-D. Compuestos 6-25 descritos más adelante.

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

Figura 12. Actividad media de  $\alpha$ -galactosidasa A en leucocitos de voluntarios sanos y normales que recibieron 50 mg de 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) dos veces al día (triángulos), 150 mg de DGJ dos veces al día (cuadrados) o placebo (círculos sin relleno).

55 Figura 13. Estructura de la clase de compuestos basada en los compuestos 1, 2, 6, 7 y 12-17.

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

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

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

Descripción detallada

65 La presente invención se refiere al descubrimiento de que pueden identificarse moléculas pequeñas para rescatar el

5 plegamiento y el procesamiento de proteínas de los polipéptidos MC4R mutantes y de tipo silvestre y mejorar la estabilidad de las proteínas en la superficie celular de neuronas, lo que a su vez disminuye el apetito y la sobrealimentación. Las chaperonas farmacológicas se unen específicamente a la proteína MC4R e inducen o estabilizan una conformación funcional del MC4R mutante o de tipo silvestre. Por lo tanto, la invención permite el rescate específico de MC4R mutante, así como la expresión potenciada de MC4R de tipo silvestre en la superficie celular. En consecuencia, las chaperonas farmacológicas para MC4R pueden usarse para el tratamiento de trastornos en los que se desea el rescate, o el aumento de la estabilidad o de la actividad, de MC4R, por ejemplo, el trastorno de padecer sobrepeso u obesidad.

10 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de una chaperona farmacológica a un ser humano dio como resultado un aumento significativo en el nivel de actividad de una proteína de tipo silvestre. Este descubrimiento, combinado con un entendimiento de la capacidad de una chaperona farmacológica para promover el plegamiento apropiado de proteínas en el RE, lo que conduce a un transporte correcto de proteínas y a un aumento significativo de la actividad proteica, proporciona la capacidad de lograr una actividad proteica suficiente como para revertir o mejorar una enfermedad, un trastorno o una afección, en particular en un sujeto humano. Este fenómeno es altamente específico con respecto a la proteína unida específicamente por la chaperona farmacológica particular, a diferencia de los procedimientos que utilizan compuestos que operan generalmente aumentando la expresión de todas las proteínas, denominados "chaperonas químicas".

20 La presente invención se fundamenta en determinados resultados experimentales: las chaperonas farmacológicas aumentaron la actividad de proteína de tipo silvestre endógena en humanos a aproximadamente el 120% de lo normal, 130% de lo normal y 145% de lo normal a una dosis más baja, y al 150% y el 185% de lo normal a una dosis más elevada después de la administración de una chaperona farmacológica (véanse el ejemplo 7 y figura 12). Este nivel de aumento *in vivo* no era predecible a partir de los resultados con células en cultivo tisular que permanecen expuestas a la chaperona farmacológica. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.274.597 describe un aumento del 30% de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A) en linfoblastos normales cultivados *in vitro* con desoxigalactonojirimicina (DGJ), una chaperona farmacológica. Dada la expectativa de que se esperaría que los procesos de depuración fisiológicos redujeran los efectos de chaperonas farmacológicas sobre proteínas normales *in vivo*, no se esperaba que una chaperona farmacológica produjera un aumento significativo en la actividad de las proteínas de tipo silvestre. El ejemplo 10 de la patente de Estados Unidos N° 6.274.597 describe un aumento en la actividad de una enzima mutante en ratones transgénicos tratados durante una semana con una chaperona farmacológica. No obstante, estos experimentos involucraron formas mutantes de la proteína rescatada, no de tipo silvestre, y se realizaron en ratones, por lo que los resultados no predijeron ni sugirieron los resultados observados para proteína de tipo silvestre en seres humanos.

35 No había ninguna base para esperar que una chaperona farmacológica pudiera aumentar el nivel de actividad de una proteína de tipo silvestre *in vivo* en al menos el 20-25%, es decir, en al menos 1,2 veces o el 120% de lo normal, o el 30% (1,3 veces, el 130% de lo normal), el 40% (1,4 veces, el 140% de lo normal), y en particular no en al menos aproximadamente el 50% (1,5 veces, el 150% de lo normal). Sin embargo, como se ejemplifica en el presente documento, la administración de DGJ a sujetos dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en  $\alpha$ -Gal A. Este efecto extraordinario es consecuencia de la titulación de la chaperona farmacológica que ya se ha demostrado según la tecnología existente en el rescate de una forma mutante de la proteína para lograr el aumento de actividad de una proteína de tipo silvestre. Por consiguiente, la invención se refiere a la titulación de 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 de tipo silvestre en una cantidad definida.

#### Definiciones

50 Los términos que se usan en la presente memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Determinados términos se describen a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones de la invención y cómo producirlas y usarlas.

55 Tal como se usa en el presente documento, la locución "chaperona farmacológica" o, a veces, "chaperona farmacológica específica" ("SPC"), se refiere a una molécula que se une específicamente a MC4R y que tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) mejora la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) mejora el transporte adecuado de la proteína desde el RE a otra ubicación celular, preferentemente una ubicación celular nativa, es decir, previene la degradación asociada al RE de la proteína; (iii) evita la agregación de proteínas conformacionalmente inestables, es decir, plegadas incorrectamente; (iv) restaura o mejora al menos parcialmente la función, la estabilidad y/o la actividad de tipo silvestre de la proteína; y/o (v) mejora el fenotipo o la función de la célula que alberga MC4R. Por lo tanto, una chaperona farmacológica para MC4R es una molécula que se une a MC4R, lo que da como resultado un plegamiento adecuado, un transporte adecuado, la no agregación y la actividad adecuada de MC4R. Tal como se utiliza en el presente documento, esta locución 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; la patente de Estados Unidos N° 5.900.360; la patente de Estados Unidos N° 6.270.954 y la patente de Estados Unidos N° 6.541.195). Incluye moléculas de unión específicas, por ejemplo, chaperonas farmacológicas específicas (descritas anteriormente), inhibidores o antagonistas, y agonistas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con MC4R, específicamente, una interacción con residuos de aminoácidos de MC4R que participan directamente en la puesta en contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, en el presente documento MC4R, para ejercer un efecto de chaperona sobre el MC4R, y no sobre un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los residuos de aminoácidos de MC4R que interactúan con cualquier chaperona farmacológica de MC4R pueden estar o no dentro del dominio de unión al 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 a la proteína G. La unión específica puede evaluarse mediante ensayos de unión rutinarios o mediante estudios estructurales, por ejemplo, cocrystalización, RMN y similares. Los ejemplos de aminoácidos en el dominio de unión al ligando MSH de MC4R incluyen, pero sin limitación, Phe284 y Tyr268 (usando, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 como secuencia de referencia).

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

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "mejoran la estabilidad conformacional de MC4R" o "aumentan la estabilidad conformacional de MC4R" se refieren al aumento de la cantidad o la proporción de MC4R que adopta una conformación funcional en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R con respecto al MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R. En un caso, las células no expresan un mutante conformacional de MC4R. En otro caso, las células expresan un polinucleótido MC4R mutante que codifica un polipéptido, por ejemplo, un mutante conformacional de MC4R.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "mejoran el transporte de MC4R" o "aumentan el transporte de MC4R" se refieren a aumentar la eficacia del transporte de MC4R a la membrana plasmática en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R con respecto a la eficacia de transporte del MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "mejoran la actividad de MC4R" o "aumentan la actividad de MC4R" se refieren a aumentar la actividad de MC4R, tal como se describe en el presente documento, en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para MC4R con respecto a la actividad del MC4R en una célula (preferentemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "mejoran el nivel de MC4R" o "aumentan el nivel de MC4R" se refieren a aumentar el nivel de MC4R en una célula 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) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para MC4R.

La expresión "estabilizan una conformación apropiada" se refiere a la capacidad de una chaperona farmacológica de MC4R para inducir o estabilizar una conformación de una proteína MC4R mutada que es funcionalmente idéntica a la conformación de la proteína MC4R de tipo silvestre. La expresión "funcionalmente idéntica" significa que aunque pueden existir pequeñas variaciones 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 a través de la ruta de degradación asociada al retículo endoplasmático, (3) deterioro de la función de la proteína, por ejemplo, la capacidad de unirse al ligando y/o de activar la actividad de la adenilil ciclasa y/o (4) un transporte inapropiado dentro de la célula, por ejemplo, una localización en la membrana plasmática en mayor o menor grado que la de la proteína de tipo silvestre.

La expresión "conformación molecular estable" se refiere a la conformación de una proteína, es decir, MC4R, inducida por una chaperona farmacológica que proporciona una función de tipo silvestre al menos parcial en la célula. Por ejemplo, una conformación molecular estable de un MC4R mutante sería aquella en la que el MC4R abandona el RE y se envía a la membrana celular como un MC4R de tipo silvestre, en lugar de plegarse incorrectamente y degradarse. Además, una conformación molecular estable de un MC4R mutado también puede

poseer actividad de MC4R total o parcial, por ejemplo, actividad activadora de la adenilil ciclasa para mejorar la generación de AMPc a través de su proteína G fisiológica cognada. Sin embargo, no es necesario que la conformación molecular estable tenga todos los atributos funcionales de la proteína de tipo silvestre.

5 La expresión "actividad de MC4R" se refiere a la función fisiológica normal de un MC4R de tipo silvestre en una célula. Por ejemplo, tras la unión de un agonista, el MC4R señala la vía de interacción con una proteína G,  $G_{\alpha_s}$ , y la activación de adenilato ciclasa (véase, por ejemplo, VanLeeuwen et al., *J. Biol. Chem.* 2003; 18: 15935-40). Esto da como resultado la acumulación intracelular de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA). Dicha funcionalidad se puede evaluar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de unión del ligando  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -MSH, o el agonista  $^{125}\text{I}$ -[Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>] $\alpha$ -MSH a MC4R, o el uso de ensayos de activación de la adenilil ciclasa, o ensayos del gen indicador de luciferasa, se pueden usar para determinar aumentos en el AMPc intracelular. Los ensayos de acumulación de AMP cíclico son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, VanLeeuwen et al., *J. Biol. Chem.* 2003; 18: 15935-40).

15 "MC4R" se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia representada en una cualquiera de: la SEQ ID NO: 1 (humana; N° de acceso de GenBank BC069172); 3 (humana; N° de acceso de GenBank NM\_005912); 5 (de rata; N° de acceso de GenBank NM\_013099); o 7 (murina; N° de acceso de GenBank NM\_016977).

20 Un "polipéptido MC4R" también se refiere a una secuencia de aminoácidos tal como se representa en las SEQ ID NO: 2 (humana; N° de acceso de GenBank AAI01803); 4 (humana; N° de acceso de GenBank NM\_005912); 6 (de rata; N° de acceso de GenBank NM\_013099); u 8 (murina; N° de acceso de GenBank AF201662), y cualquier otra secuencia de aminoácidos que codifique un polipéptido MC4R que tenga la misma función y afinidad de unión al ligando que cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8.

25 La expresión "MC4R de tipo silvestre" se refiere a las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7) que codifican MC4R y a las secuencias polipeptídicas (SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8) codificadas por las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente (MC4R humano-N° de acceso de GenBank AAI01803; MC4R humano-N° de acceso de GenBank NM\_005912; MC4R de rata-N° de acceso de GenBank NM\_013099; MC4R de ratón-N° de acceso de GenBank AF201662); y a cualquier otra secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido MC4R (que tenga las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que las secuencias polipeptídicas mencionadas anteriormente), tal como variantes alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad de lograr una conformación funcional en el RE, lograr una ubicación adecuada dentro de la célula y mostrar actividad de tipo silvestre (por ejemplo, la estimulación por MC4R de la acumulación de AMPc).

35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "MC4R mutante" se refiere a un polipéptido MC4R traducido por un gen que contiene una mutación genética que da como resultado una secuencia de aminoácidos de MC4R alterada. En un caso, la mutación da como resultado una proteína MC4R que no consigue obtener una conformación nativa en las condiciones normalmente presentes en el RE, en comparación con el MC4R de tipo silvestre, o muestra una disminución de la estabilidad o la actividad en comparación con el MC4R de tipo silvestre. Este tipo de mutación se denomina en el presente documento una "mutación conformacional", y la proteína que posee dicha mutación se denomina "mutante conformacional". La no consecución de esta conformación tiene como consecuencia que la proteína MC4R se degrade o forme agregados, en lugar de ser transportada a través de una ruta normal en el sistema de transporte de proteínas a su ubicación nativa en la célula o al entorno extracelular. En algunos casos, puede producirse una mutación en una parte no codificante del gen que codifica MC4R que da como resultado una expresión menos eficaz de la proteína, por ejemplo una mutación que afecta a la eficacia de la transcripción, la eficacia del corte y empalme, la estabilidad del ARNm y similares. Al aumentar el nivel de expresión de las variantes de tipo natural, así como variantes mutantes conformacionales de MC4R, la administración de una chaperona farmacológica MC4R puede mejorar el déficit resultante de dicha expresión de proteína ineficaz.

50 Las mutaciones ejemplares (utilizando 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 y la inserción TGAT en el codón 244. Además, otras mutaciones de MC4R (de nuevo utilizando la SEQ ID NO: 2 como referencia) incluyen las descritas en la tabla 1, más adelante.

60 Determinados ensayos pueden evaluar los atributos de una proteína que pueden o no corresponder a su actividad real *in vivo*, pero que, no obstante, son sustitutos apropiados de la funcionalidad de la proteína, y el comportamiento de tipo silvestre en dichos ensayos muestra evidencias que apoyan las técnicas de rescate o de mejora del plegamiento de proteínas de la invención. Una de dichas actividades según la invención es el transporte apropiado de un MC4R funcional desde el retículo endoplasmático a la membrana celular.

65 Las locuciones "expresión endógena" y "expresados de forma endógena" se refieren a la expresión fisiológica normal de MC4R en células en un individuo que no padezca ni se sospeche que padece una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de MC4R, la sobreexpresión 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. Estas locuciones también se refieren a la expresión de MC4R en células o tipos de células en los 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.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "eficacia de transporte" se refiere a la capacidad de una proteína mutante para ser transportada fuera del retículo endoplasmático a su ubicación nativa dentro de la célula, la membrana celular o al entorno extracelular.

10 Las expresiones "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para mejorar el procesamiento de proteínas en el RE (permitiendo una conformación funcional), sin inhibir la proteína ya expresada en la ubicación celular apropiada (en el caso de un antagonista), o sin inducir la internalización del receptor mediada por ligando de la proteína desde la ubicación celular apropiada (en el caso de un agonista), y aumentar la actividad de la proteína diana, dando como resultado, de esta forma, una respuesta terapéutica en un sujeto. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un facultativo (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz al tratamiento, incluidos los síntomas anteriores y los marcadores clínicos sustitutos. Por lo tanto, una respuesta terapéutica generalmente será la mejora o la inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, obesidad o apetito desenfrenado.

20 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, un coadyuvante, un excipiente o un compuesto transportador con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. El agua o las soluciones salinas acuosas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, edición 18, u otras ediciones.

35 La expresión "alrededor de" y el término "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Los grados de error típicos ejemplares se encuentran dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y de forma más preferida dentro del 5% de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que se encuentran dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y de forma más preferida dentro de 2 veces a partir de un valor dado. Las cantidades numéricas indicadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indica expresamente.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que el material de referencia se ha retirado del entorno en el que normalmente se encuentra. Por lo tanto, un material biológico aislado puede estar exento de componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que se encuentra o se produce el material. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc o un fragmento de restricción. En otro caso, un ácido nucleico aislado se ha escindido preferentemente del cromosoma en el que puede encontrarse, y de forma más preferida ya no está unido a regiones no reguladoras no codificantes, o a otros genes, ubicados cadena arriba o cadena abajo del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En otro caso 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 un caso específico, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado está extraído del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede estar, pero no necesita estar, purificado.

60 El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material, tal como un ácido nucleico o polipéptido MC4R, que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína purificada carece preferentemente sustancialmente de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "carece sustancialmente" se usa operativamente, en el contexto de ensayos analíticos del material. Preferentemente, el material purificado que carece sustancialmente de contaminantes es al menos el 50% puro; de forma más preferida, al menos el 90% puro, y de forma aún más preferida al menos el 99% puro. La pureza puede evaluarse utilizando medios convencionales, por ejemplo, cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros procedimientos conocidos en la técnica.

El término "Me" significa metilo, "Et" significa etilo y "Ac" significa acetilo.

El término "halo", a menos que se indique lo contrario, significa flúor, cloro, bromo o yodo. Los grupos halo preferidos son flúor, cloro y bromo.

5 El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, incluye radicales hidrocarburo monovalentes saturados que tienen restos lineales, ramificados o cíclicos (incluyendo restos bicíclicos y espirocíclicos fusionados y unidos con puentes), o una combinación de los restos anteriores. Para que un grupo alquilo tenga restos cíclicos, el grupo debe tener al menos tres átomos de carbono.

10 El término "cicloalquilo", a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo cíclicos en los que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente. El uso del término "cicloalquilo" no debe interpretarse como una limitación del término "alquilo" con respecto a restos no cíclicos.

15 El término "alqueno", a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono en los que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente e incluye los isómeros E y Z de dicho resto alqueno.

20 El término "alquino", a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un enlace triple carbono-carbono en los que alquilo es tal como se ha definido anteriormente.

El término "alcoxi", a menos que se indique lo contrario, incluye grupos O-alquilo en los que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente.

25 El término "arilo", a menos que se indique lo contrario, incluye un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un hidrógeno, tal como fenilo o naftilo.

La expresión "heterocíclico de 4 a 10 miembros", a menos que se indique lo contrario, incluye grupos heterocíclicos aromáticos y no aromáticos que contienen de uno a cuatro heteroátomos, cada uno seleccionado de entre O, S y N, en los que cada grupo heterocíclico tiene de 4 a 10 átomos en su sistema de anillo, y con la condición de que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos O o S adyacentes. Los grupos heterocíclicos no aromáticos incluyen grupos que tienen solo 4 átomos en su sistema de anillo, pero los grupos heterocíclicos aromáticos deben tener al menos 5 átomos en su sistema de anillo. Los grupos heterocíclicos incluyen sistemas de anillos benzo-fusionados. 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, tetrahidrofurano, dihidrofurano, tetrahidrotienilo, tetrahidropirano, dihidropirano, tetrahidropiperano, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-pirano, 4H-pirano, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditanilo, ditiolanilo, dihidropirano, dihidrotienilo, dihidrofurano, pirazolidinimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolilo y quinolinizino. 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. Los restos espiro también se incluyen dentro del ámbito de esta definición, incluido 1-oxa-6-aza-espiro[2.5]oct-6-ilo. Los grupos precedentes, derivados de los grupos enumerados anteriormente, pueden estar unidos a C o a N si es posible. Por ejemplo, un grupo derivado de pirrol puede ser pirrol-1-ilo (unido a N) o pirrol-3-ilo (unido a C). Además, un grupo derivado de imidazol puede ser imidazol-1-ilo (unido a N) o imidazol-3-ilo (unido a C).

La expresión "sal o sales farmacéuticamente aceptables", a menos que se indique lo contrario, incluye sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en un compuesto de la invención. Los compuestos que son de naturaleza básica 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 dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como sales de acetato, benzenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, calcio-edetato, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, disilato, estolato, esilato, etilsuccinato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, oleato, oxalato, pamoate (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, teoclatato, tosilato, trietiodo y valerato. Dado que un único compuesto puede incluir más de un resto ácido o básico, dicho compuesto puede incluir mono, di o tri-sales en un único compuesto.

65 Receptor de melanocortina 4

Los receptores de melanocortina (MC) son miembros de la superfamilia del receptor acoplado a la proteína G de siete dominios transmembrana que activan la generación del AMP cíclico (AMPC) del segundo mensajero. Existen cinco receptores MC aislados hasta la fecha: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R. El MC2R es el receptor de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). El MC4R humano tiene 332 aminoácidos de longitud.

El receptor de melanocortina 4 (MC4R) se ha implicado en la regulación del peso corporal (Graham et al., *Nat. Genetics* 1997; 17: 273-4). El MC4R se expresa en el cerebro, incluido el hipotálamo, que influye en la ingesta de alimentos. La señalización a través de MC4R estimula las rutas neuronales anorexigénicas. Los ratones nulos en MC4R desarrollan obesidad de aparición tardía con hiperglucemia e hiperinsulinemia. Los ratones que carecen de un alelo de MC4R (heterocigotos) tienen un peso corporal intermedio entre ratones nulos homocigotos y de tipo silvestre. En los 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). Los ratones transgénicos que sobreexpresan un antagonista endógeno de MC4R, una proteína relacionada con agouti (AgRP), mostraron un aumento de peso, un consumo de alimentos y una longitud corporal incrementados en comparación con compañeros de camada no transgénicos (Ollman et al., *Science* 1997; 278: 135-37).

Se han identificado numerosas mutaciones, que se encuentran principalmente en individuos obesos, en el gen MC4R humano, incluidas mutaciones de cambio de marco, sin sentido y en sentido incorrecto (Nijenhuis et al., *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 22939-45). Al menos dos grupos de investigadores han confirmado que el MC4R está mutado en aproximadamente el 5% de los individuos obesos. Los portadores de mutaciones de MC4R mostraron hiperfagia e hiperinsulinemia, tenían una densidad mineral ósea superior a la media y un crecimiento lineal más rápido que los sujetos control emparejados por el IMC. Farooqi et al. también han observado que las propiedades de señalización de los receptores MC4R mutantes se correlacionan con la gravedad de la obesidad.

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

Se espera una pérdida de función para MC4R con algunas mutaciones, dado que la mayor parte 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 con una expresión reducida de MC4R en la superficie celular (Gu et al., *Diabetes* 1999, 48: 635-39.; Nijenhuis et al., anteriormente). Por ejemplo, en un cribado de once mutaciones de sentido incorrecto de MC4R que solo se encontraron en individuos obesos, y que se ubicaron fuera de la región N-terminal de MC4R (que no está involucrada en la unión del ligando), diez mostraron una unión específica más baja en la superficie celular al ligando de la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH)  $^{125}\text{I}$ -[Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>] $\alpha$ -MSH, en comparación con el MC4R de tipo silvestre. Nijenhuis et al., anteriormente, en 22941. Se determinó que la disminución de la unión específica reflejaba una expresión en la superficie celular más reducida, dado que la afinidad por el ligando entre los mutantes fue muy similar al receptor de tipo silvestre, como se muestra en la tabla 1 a continuación (valores de  $\text{CI}_{50}$  en nM +/- S.E.):

Tabla 1:

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

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

Incluso dos mutantes con mayor afinidad de unión (L250Q y T112M) mostraron una menor expresión en la superficie celular según los experimentos de unión de saturación. Además, todos los mutantes mostraron una respuesta

máxima reducida (activación del receptor medida con un ensayo de adenilil ciclasa) tras la unión a  $\alpha$ -MSH. En particular, Nijenhuis et al. concluyeron a partir de los resultados de los datos inmunocitoquímicos que los mutantes P78L, R165Q y R165W se expresan, pero se retienen intracelularmente.

- 5 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 mostraron una actividad reducida, o ninguna actividad, *in vitro* evaluada utilizando un ensayo de gen reportero de luciferasa que responde al AMPc. Sin embargo, este grupo encontró que tres variantes V103I; I251L; y T112M no tienen ningún efecto sobre la señalización de MC4R. Mutaciones asociadas a la infancia, es decir, la obesidad de aparición temprana fueron S58C, N62S, Y157S, C271Y, P78L, G98R que dieron como resultado una disminución en la unión al ligando (S58C, N62S, Y157S, C271Y) o ninguna unión al ligando (P78L, G98R), también mostraron deficiencias proporcionales en la producción de cAMP estimulada por [Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>] $\alpha$ -MSH (Tao et al., *Endocrinology* 2003; 144 (10): 4544-51).
- 10
- 15 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 en la obesidad, el MC4R se ha implicado en el apetito desenfrenado. Según el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Text Revision (DSM-IV-TR™, cuarta edición), el apetito desenfrenado implica episodios recurrentes de ingerir una cantidad anormalmente grande de alimentos y experimentar sentimientos de falta de control sobre el comportamiento. En un estudio de 469 sujetos obesos blancos, se encontró que aunque solo se diagnosticó apetito desenfrenado a un pequeño porcentaje de sujetos obesos, a todos los sujetos obesos con mutaciones de MC4R se les diagnosticó apetito desenfrenado (Branson et al., anteriormente).

25 Estructura y unión a ligandos de MC4R

Los agonistas endógenos de la melanocortina contienen la secuencia His-Phe-Arg-Trp, que es importante para el reconocimiento molecular y la estimulación del receptor de melanocortina. Los determinantes moleculares de la unión al ligando de MC4R se determinaron en un estudio empleando una amplia serie de ligandos (Nickolls et al., *Pharmacol Exp Ther* 2003; 304 (3): 1217-27). El modelado molecular del receptor se utilizó para identificar Phe284, en el dominio transmembrana (TM) 7 (TM7), como un sitio potencial de interacción del ligando. La mutación de Phe284 a alanina redujo la afinidad de unión y la potencia de los péptidos que contienen L-Phe hasta 71 veces, pero no afectó a la unión de los péptidos lineales que contienen D-Phe. Estos datos fueron coherentes con una interacción hidrófoba entre el Phe7 de  $\alpha$ -MSH y Phe284. En segundo lugar, se examinó el efecto de una mutación natural en TM3 (I137T), que, tal como se ha descrito anteriormente, está relacionada con la obesidad. Esta mutación redujo la afinidad y la potencia de péptidos rígidos cíclicos, pero no de péptidos más flexibles, lo que es coherente con un efecto indirecto de la mutación sobre la estructura terciaria del receptor. También se determinaron los residuos que fomentan la selectividad de ligando para el MC4R con respecto al MC3R. La mutación de Ile125 (TM3) del MC4R al residuo equivalente del MC3R (fenilalanina) redujo selectivamente la afinidad y la potencia de los ligandos selectivos del MC4R. Este efecto se reflejó mediante la mutación recíproca de MC3R 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 podría afectar a la orientación de Asp122, que se ha identificado como un determinante principal de la afinidad de unión al ligando.

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

50 Agonistas y antagonistas de MC4R

Los agonistas y antagonistas de MC4R incluyen los compuestos representados en las figuras 1-8 y 10 del presente documento, y se describen adicionalmente en los ejemplos 3 y 4 a continuación.

- 55 Los agonistas (ligandos) naturales de MC4R incluyen  $\alpha$ -MSH, ACTH,  $\beta$ -MSH y  $\gamma$ -MSH (en orden de mayor a menor afinidad). Otros ligandos de MC4R, incluidos agonistas y antagonistas, que se han descrito hasta la fecha son predominantemente péptidos (patente de Estados Unidos N° 6.060.589) y análogos de péptidos cíclicos (patente de Estados Unidos N° 6.613.874 de Mazur et al.). También se han diseñado una serie de agonistas de péptidos MC4R (Sun et al., *Bioorg Med Chem* 2004; 12 (10): 2671-7). Además, Nijenhuis et al. (*Peptides* 2003; 24 (2): 271-80) han descrito el desarrollo y la evaluación de compuestos antagonistas de melanocortina que eran selectivos para el MC4R. Se encontró que un compuesto, denominado Ac-Nle-Gly-Lys-D-Phe-Arg-Trp-Gly-NH(2) (SEQ ID NO: 9), es el compuesto MC4R más selectivo, con una selectividad 90 y 110 veces superior para el MC4R en comparación con el MC3R y el MC5R, respectivamente. Una modificación subsiguiente proporcionó el compuesto Ac-Nle-Gly-Lys-D-Nal (2)-Arg-Trp-Gly-NH(2) (SEQ ID NO: 10), un antagonista selectivo de MC4R con una selectividad MC4R/MC3R 34 veces superior y una selectividad MC4R/MC5R 119 veces superior. Ambos compuestos fueron activos *in vivo*, y cruzaron la barrera hematoencefálica. Además, las patentes de Estados Unidos N° 6.054.556 y 5.731.408 describen

familias de agonistas y antagonistas para MC4R que son heptapéptidos de lactama que tienen una estructura cíclica.

Otros antagonistas de MC4R de alta afinidad se describen por Grieco et al. (*J Med Chem* 2002; 24: 5287-94). Estos antagonistas cíclicos se diseñaron basándose en el conocido antagonista de alta afinidad SHU9119 (Ac-Nle4-[Asp5-His6-DNaI(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 contiene una sustitución de Che en la posición 6 es un antagonista de MC4R de alta afinidad ( $CI_{50} = 0,48$  nM) con una selectividad 100 veces superior con respecto a MC3R. Otro compuesto con una sustitución de Cpe en la posición 6 era también un antagonista de MC4R de alta afinidad ( $CI_{50} = 0,51$  nM) con una selectividad 200 veces superior con respecto a MC3R. Se usó un modelado molecular para examinar las propiedades conformacionales de los péptidos cíclicos modificados en la posición 6 con aminoácidos conformacionalmente restringidos. Véase también Grieco et al., *Peptides* 2006; 27 (2): 472-81.

En las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas 2003/0158209 de Dyck et al. y 2004/082590 de Briner et al. se han divulgado varios ligandos no peptídicos de MC4R. Además, la patente de Estados Unidos N° 6.638.927 de Renhowe et al. describe guanidobenzamidas pequeñas de bajo peso molecular como agonistas específicos de MC4R. Richardson et al. han descrito nuevas arilpiperizinas que son agonistas de MC4R (*J Med Chem* 2004; 47 (3): 744-55). Las patentes de Estados Unidos N° 6.979.691 de Yu et al. y 6.699.873 de Maguire también describen compuestos no peptídicos que se unen selectivamente a MC4R.

El documento WO 99/55679 de Basu et al. divulga derivados de isoquinolina, compuestos no peptídicos de molécula pequeña, que muestran bajas afinidades (micromolares) para el MC1R y el MC4R, reducción de la inflamación dérmica inducida por ácidos araquidónicos y reducción del peso corporal y la ingesta de alimentos.

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

Se han descrito otros antagonistas de MC4R no peptídicos. Así, las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas 2003/0176425 y 2003/0162819 de Eisinger divulgan derivados de 1,2,4-tiadiazol y 1,2,4-tiadiazolio novedosos, respectivamente, como antagonistas o agonistas de MC4R. Estas solicitudes también divulgan la utilización de estos compuestos para tratar la obesidad.

Varios antagonistas de los receptores de melanocortina han demostrado ser antagonistas competitivos, es decir, que compiten por la unión con un ligando. Por ejemplo, la proteína de señalización agouti antagonista de la melanocortina (ASIP) demostró tener características coherentes con el antagonismo competitivo observado en el hMC1R, y un comportamiento más complejo observado en los otros receptores (Yang et al., *Mol. Endocrinology* 1997; 11 (3): 274-280). De forma similar, ACTH, el ligando natural para MC2R, no puede ser superado por la unión de  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -MSH (Abdel-Malek et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 2001; 48: 434-41).

Otros compuestos de unión a MC4R se describen a continuación: Bednarek y Fong, *Exp Opin Ther Patents* 2004; 14: 327-36; Ujjainwalla et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;15(18):4023-8; documento WO 03/07949 (Merck); documento WO 03/61660 (Eli Lilly); documento WO 03/09847 (Amgen); documento WO 03/09850 (Amgen); documento WO 03/31410 (Neurocrine Biosciences); documento WO 03/94918 (Neurocrine Biosciences); documento WO 03/68738 (Neurocrine Biosciences); documento WO 03/92690 (Procter and Gamble); documento WO 03/93234 (Procter and Gamble); documento WO 03/72056 (Chiron); documento WO 03/66597 (Chiron); documento WO 03/66587 (Chiron); documento WO 03/66587 (Chiron); documento WO 02/67869 (Merck); documento WO 02/68387 (Merck); documento WO 02/00259 (Taisho); documento WO 02/92566 (Taisho); Tran et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 [publicación electrónica antes de la publicación impresa]; 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.* Diciembre de 2005;146(12):5257-66; y Todorovic et al., *Peptides.* Octubre de 2005;26(10):2026-36.

Los agonistas o antagonistas no peptídicos de MC4R específicos contemplados para su uso en los procedimientos reivindicados en el presente documento se describen por Sebhat et al., *J Med Chem* 2002; 45: 4589 (compuestos 1 y 6); Richardson et al., *J Med Chem.* 2004; 47: 744 (compuesto 2); Arasingham et al., *J Med Chem.* 2003; 46: 9 (compuesto 3); documento WO 02/062766 de 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); Ujjainwalla 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.

Los antagonistas peptídicos de MC4R específicos contemplados para su uso en los procedimientos reivindicados en el presente documento 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); cyclo(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 no naturales y peptidomiméticos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.650.489; véase también la patente de Estados Unidos N° 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 representada en la figura 16 pueden no ser naturales.

Se ha demostrado que el MC4R experimenta una internalización del 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 de la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), dio como resultado una formación de AMPc alterada para una segunda provocación con  $\alpha$ -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 se desencadena en receptores acoplados a proteína G por fosforilación de residuos de serina o treonina entre el segmento C-terminal y el tercer bucle intracelular. La fosforilación promueve la unión de beta-arrestinas, que se dirigen a los receptores para la internalización y degradación de lisosomas. Datos recientes demuestran que la cola citosólica de una proteína similar a la atractina (ALP) se une al dominio C-terminal de MC4R (Yeo et al., *Biochem. J.* 2003; 376). Por lo tanto, una chaperona que aumenta la estabilidad de MC4R en la superficie celular será especialmente beneficiosa dada la corta semivida del receptor en la superficie.

Se espera, además, que la chaperona que es un agonista que se unirá reversiblemente a un polipéptido MC4R en el RE no inducirá la internalización del receptor. De forma similar, cuando el compuesto chaperona es un antagonista, se espera que no inhiba la actividad del receptor una vez que el receptor se encuentre en la superficie celular.

#### Procedimientos de tratamiento

Se divulga un procedimiento para tratar una afección asociada con la estabilidad reducida de MC4R, tal como la obesidad, o que tiene factores de riesgo para desarrollar obesidad, mediante la administración a un sujeto que necesita dicho tratamiento de una chaperona para mejorar la estabilidad y/o la actividad de MC4R. El individuo que se va a tratar puede ser un individuo que no muestre una mutación en MC4R que afecte al plegamiento y al procesamiento de MC4R, pero que se beneficiaría de una mayor estabilidad de MC4R en, por ejemplo, las neuronas. El individuo que se va a tratar también puede tener una mutación en MC4R que afecta al plegamiento y al procesamiento de la proteína MC4R, y muestra una estabilidad reducida 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 a MC4R tal como se ha descrito anteriormente, o tal como se identifica a través de los procedimientos de cribado tal como se exponen a continuación, se formula ventajosamente en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La chaperona puede designarse como un ingrediente activo o agente terapéutico para el tratamiento de obesidad u otro trastorno que implique una expresión reducida en la superficie celular de MC4R o el transporte a la superficie celular.

La concentración del ingrediente activo (chaperona farmacológica) depende de la dosis deseada y del régimen de administración, tal como se explica a continuación. Los intervalos de dosificación ejemplares del ingrediente 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.

Los compuestos terapéuticamente eficaces pueden proporcionarse a un sujeto en formulaciones estándar, y pueden incluir cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como excipientes, lubricantes, diluyentes, aromatizantes, colorantes, tampones y disgregantes. Las formulaciones estándar son bien 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 la administración por cualquier vía que permita que la chaperona terapéutica atraviese la barrera hematoencefálica. Las vías ejemplares incluyen las vías oral, parenteral, transmucosa, intranasal, inhalatoria o transdérmica. Las vías parenterales incluyen la administración intravenosa,

intraarteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intratecal e intracraneal.

En una forma de realización, una chaperona farmacológica de MC4R, particularmente el compuesto 23 representado en la figura 10D del presente documento, se formula en una forma de dosificación oral sólida. Para la administración oral, por ejemplo, para una molécula pequeña, la composición farmacéutica puede adquirir la forma de un comprimido o una cápsula preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); materiales de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adquirir la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas 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 acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, 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, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según corresponda.

En otra forma de realización, se formula una chaperona de MC4R para administración parenteral. La chaperona puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adquirir formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, la chaperona también puede formularse como una preparación de acción prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por 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 poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

En otra forma de realización, la chaperona puede administrarse en una vesícula, particularmente un liposoma.

En otra forma de realización, la chaperona puede administrarse en una forma de liberación controlada. Por ejemplo, un agente terapéutico se puede administrar mediante infusión intravenosa con una bomba que opera en continuo, en una matriz polimérica tal como poli(ácido láctico/glutámico) (PLGA), en un gránulo que contiene una mezcla de colesterol y el ingrediente activo (Silastic<sup>TM</sup>; Dow Corning, Midland, MI; véase la patente de Estados Unidos N° 5.554.601), por implante subcutáneo, o mediante un parche transdérmico.

**Politerapia.** La composición farmacéutica también puede incluir otras sustancias biológicamente activas en combinación con el compuesto candidato. Los ejemplos incluyen, entre otros, sibutramina, orlistat (Xenical®), leptina, neuropéptido Y, colecistoquinina o GLP-1.

Ensayos de cribado de chaperonas farmacológicas MC4R

La presente memoria descriptiva divulga además un procedimiento para identificar un compuesto chaperona candidato que modula la estabilidad, la actividad y/o la localización en la superficie celular de un polipéptido MC4R. En un ejemplo, la presente memoria descriptiva divulga un procedimiento para identificar una chaperona para la proteína MC4R, que comprende poner un compuesto de ensayo marcado o no marcado en contacto con la proteína MC4R o un fragmento de la misma y medir la cantidad del compuesto de ensayo unido a la proteína MC4R o al fragmento de la misma. Esto se puede lograr, por ejemplo, de la forma siguiente:

(a) poniendo en contacto una primera célula con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo suficiente para permitir que la célula responda a dicho contacto con el compuesto de ensayo;

(b) determinando la estabilidad conformacional, la actividad y/o la localización en la superficie celular de un polipéptido MC4R (o un fragmento del mismo que comprende un dominio de unión a ligando) en la célula (o en la superficie celular) con la que se ha puesto en contacto en la etapa (a); y

(c) comparando la estabilidad, la actividad y/o la localización en la superficie celular del polipéptido MC4R determinada en la etapa (b) con la de un polipéptido MC4R en una célula de control que no se ha puesto en

contacto con el compuesto de ensayo;

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

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

En otro ejemplo, la presente memoria descriptiva divulga un procedimiento para identificar una chaperona para la proteína MC4R que comprende poner un compuesto de ensayo marcado en contacto con células o una fracción de membrana celular que contiene la proteína MC4R, y medir la cantidad del compuesto de ensayo marcado unido a las células o a la fracción de membrana celular.

Se pueden emplear numerosos procedimientos de cribado de alto rendimiento (HTS) para cribar grandes cifras (por ejemplo, cientos, miles, decenas de miles) de compuestos de ensayo simultáneamente por su unión a un MC4R. Un compuesto de ensayo puede ser, sin limitación, una pequeña molécula orgánica o inorgánica (preferida), un péptido o un polipéptido (incluido un anticuerpo, fragmento de anticuerpo u otra molécula inmuno-específica), una molécula de oligonucleótido (tal como un aptámero), una molécula de polinucleótido, o una quimera o derivado de la misma. Los compuestos de ensayo que son chaperonas candidatas que se unen específicamente a un polipéptido MC4R pueden identificarse usando ensayos basados en células y/o que no utilizan células. Diversos procedimientos de ensayos automatizados que se han desarrollado en los últimos años permiten el cribado de decenas de miles de compuestos en un corto período de tiempo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 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 por medio de un cribado dirigido iterativo de bibliotecas sesgadas de receptores acoplados a proteínas no peptídicas (Richardson et al., *J Med Chem* 2004; 47 (3): 744-55). Dichos procedimientos HTS son particularmente útiles, por ejemplo, en micromatrices.

Para el cribado, las clases purificadas de compuestos que pueden identificarse incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas (es decir, moléculas orgánicas o inorgánicas que tienen menos de aproximadamente 2 kilodaltons (kD) de peso molecular y, de forma más preferida, menos de aproximadamente 1 kD de peso molecular). Estos son componentes de bibliotecas de compuestos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto líder" se refiere a una entidad molecular seleccionada a partir de un cribado primario de antagonistas o agonistas de MC4R que puede ser eficaz por sí mismo para estabilizar la conformación proteica de la proteína MC4R de tipo silvestre o mutante, o que puede modificarse mediante un desarrollo adicional para generar un compuesto farmacéutico apropiado.

**Bibliotecas de compuestos.** Las bibliotecas de ligandos orgánicos y agonistas peptídicos pequeños de alta pureza que tienen actividades farmacológicas bien documentadas están disponibles en Sigma-Aldrich (LOPAC LIBRARY™ y LIGAND-SETS™). También disponible en Sigma-Aldrich se encuentra la Aldrich Library of Rare Chemicals, que es una biblioteca diversa de más de 100.000 compuestos de moléculas pequeñas, incluidos extractos de plantas y extractos de cultivos microbianos. Otras bibliotecas de compuestos están disponibles en Tripos (LeadQuest®) y TimTech (incluidas bibliotecas específicas para moduladores de quinasa).

Otras empresas que suministran o han suministrado bibliotecas de compuestos del tipo adecuado para cribado incluyen las siguientes: 3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc.; Advanced ChemTech; Abinitio PharmaSciences; Albany Molecular; Aramed Inc.; Annovis, Inc. (anteriormente 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; Phytara, Inc.; PTRL East, Inc.; REPLICor Inc.; RSP Amino Acid Analogues, Inc.;

Sanofi- Synthelab (actualmente 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.

5 Además, el Institute of Chemistry and Cell Biology (ICCB), mantenido por la Harvard Medical School, proporciona las siguientes bibliotecas de compuestos químicos, incluidas bibliotecas de productos naturales, para cribado: 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); **Colecciones NCI:** 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 bioactivas conocidas:** NINDS Custom Collection (1.040 compuestos); ICCB Bioactives 1 (489 compuestos); SpecPlus Collection (960 compuestos); ICCB Discretas Collections. Los compuestos ICCB se recogieron individualmente de químicos en el 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 enfocadas en lugar de bibliotecas grandes y diversas. Chemical Computing Group, Inc. (Montreal) ha desarrollado un programa informático con un enfoque novedoso para el diseño de fármacos de alto rendimiento. El procedimiento de la empresa utiliza datos experimentales de cribado de alto rendimiento (HTS) para crear un modelo probabilístico QSAR (relación de actividad de estructura cuantitativa), que posteriormente se utiliza para seleccionar bloques de construcción en una biblioteca virtual combinatoria. Se basa en la estimación estadística en lugar de en un análisis de regresión estándar.

Además, ArQule, Inc. (Woburn, MA) también posee tecnologías integradas para realizar una producción automatizada de alto rendimiento de compuestos químicos y para suministrar estos compuestos de estructura conocida y alta pureza en cantidades suficientes para llevar a cabo una optimización. Su AMAP™ (planta de ensamblaje molecular automatizada) realiza síntesis químicas de alto rendimiento para cada fase del descubrimiento de compuestos.

Compuestos similares a menudo se proporcionan en bases de datos en línea o en CD-ROM para la elección selectiva de compuestos. Véase, por ejemplo, Ablitio 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 and Biospecs; y Bharavi Laboratories.

#### Micromatrices

En un caso, el cribado HTS para chaperonas de MC4R emplea micromatrices.

**Matrices de proteínas.** Las matrices de proteínas son sistemas de ensayo de unión en fase sólida que utilizan proteínas inmovilizadas en diversas superficies que se seleccionan, por ejemplo, de entre vidrio, membranas, pocillos de microtitulación, placas de espectrómetro de masas y perlas u otras partículas. Los ensayos de unión que utilizan estas matrices son altamente paralelos y, a menudo, miniaturizados. Sus ventajas son que son rápidos, se pueden automatizar, son capaces de lograr una alta sensibilidad, son económicos en su uso de reactivos y proporcionan una gran cantidad de datos a partir de un único experimento.

Los formatos automatizados de múltiples pozos son los sistemas HTS mejor desarrollados. Los sistemas de cribado automatizados basados en placas de 96 o 384 pocillos son los más utilizados. La tendencia actual en los sistemas de cribado basados en placas es reducir aún más el volumen de los pocillos de reacción y aumentar la densidad de pocillos por placa (de 96 pocillos a 384 pocillos a 1.536 pocillos por placa). La tendencia se traduce en un aumento del rendimiento, una disminución drástica de los costes de biorreactivos por compuesto cribado y una disminución en el número de placas que deben gestionarse mediante automatización. Para una descripción de las matrices de proteínas que se pueden utilizar para HTS véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.475.809; 6.406.921 y 6.197.599; y las publicaciones internacionales N° WO 00/04389 y WO 00/07024.

Para la construcción de matrices, las fuentes de MC4R o fragmentos del mismo, ya sea en forma silvestre o mutante, pueden incluir sistemas de expresión basados en células para proteínas recombinantes, la purificación de fuentes naturales, la producción *in vitro* mediante sistemas de traducción que no utilizan células y procedimientos sintéticos para producir péptidos MC4R. Para la captura de matrices y el análisis de la función de las proteínas, a menudo se presenta el caso en el que los polipéptidos MC4R están plegados correctamente y son funcionales. Este

no es siempre el caso, por ejemplo, en el que las proteínas recombinantes se extraen de bacterias en condiciones de desnaturalización; otros procedimientos (aislamiento de proteínas naturales, síntesis libre de células) generalmente conservan la funcionalidad. Sin embargo, las matrices de proteínas desnaturalizadas aún pueden ser útiles en el cribado de chaperonas, ya que la chaperona probablemente se unirá a la proteína mutada aunque no esté plegada en su conformación apropiada.

El procedimiento de inmovilización usado se puede aplicar preferentemente a polipéptidos MC4R de diferentes propiedades (por ejemplo, de tipo silvestre, mutantes, de longitud completa, fragmentos de longitud parcial, hidrófilos, hidrófobos, etc.), susceptibles de alto rendimiento y automatización, y generalmente compatibles con la retención de la capacidad de unión a la chaperona. Se pueden utilizar procedimientos tanto covalentes como no covalentes de inmovilización de proteínas MC4R. Los 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), el acoplamiento covalente reversible se logra mediante la interacción entre la proteína derivada de ácido fenildiborónico y ácido salicilhidroxámico inmovilizado en la superficie de soporte. Los procedimientos de acoplamiento covalente que proporcionan un enlace estable se pueden aplicar a una serie de proteínas. La unión no covalente de la proteína no modificada se produce dentro de estructuras porosas tales como HydroGel™ (PerkinElmer), basado en un gel de poliacrilamida tridimensional.

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

Existen numerosas técnicas de matrices basadas en una y múltiples células conocidas en la técnica. Técnicas desarrolladas recientemente, tales como matrices con micropatrones (descritas, por ejemplo, en las publicaciones PCT internacionales WO 97/45730 y WO 98/38490) y matrices microfluidicas proporcionan herramientas valiosas para el análisis comparativo basado en células. Las micromatrices de células transfectadas son una técnica complementaria en la que las características de la matriz comprenden agrupaciones de células que sobreexpresan ADNc definidos. Los ADN complementarios clonados en vectores de expresión se imprimen en portaobjetos de microscopio, que se convierten en matrices vivas después de la adición de un reactivo de transfección de lípidos y células de mamíferos adherentes (Bailey et al., *Drug Discov. Today* 2002; 7 (supl. 18): S113-8). Las matrices basadas en células se describen en detalle por, por ejemplo, Beske, *Drug Discov. Today* 2002; 7 (supl. 18): S131-5; Sundberg et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000; 11: 47-53; Johnston et al., *Drug Discov. Today* 2002; 7: 353-63; patentes de Estados Unidos N° 6.406.840 y 6.103.479 y la solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° 2002/0197656. Para ensayos basados en células específicamente utilizados para cribar moduladores de canales iónicos activados por ligando, véanse 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 las chaperonas de MC4R candidatas utilizando ensayos de selección, se puede usar un ensayo funcional para realizar un seguimiento de las moléculas sin marcar tal como se describe en otra parte en el presente documento. Una molécula de interés (por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o una sonda polinucleotídica) o una biblioteca de la misma también se pueden marcar de forma detectable con un átomo (por ejemplo, un radionúclido), una molécula detectable (por ejemplo, fluoresceína), o un complejo que, debido a una propiedad física o química, sirva para indicar la presencia de la molécula de interés. Una molécula también se puede marcar de forma detectable cuando está unida covalentemente a una molécula "reportera" (por ejemplo, una biomolécula tal como una enzima) que actúa sobre un sustrato para producir un producto detectable. Las marcas detectables adecuadas para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las marcas útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, biotina para la tinción con avidina marcada o perlas magnéticas conjugadas a estreptavidina (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, fluoresceína-isotiocianato (FITC), rojo de Texas, rodamina, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente mejorada, lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy5, Cy7, FluorX de Amersham, SyBR Verde I y II de Molecular Probes, y similares), radiomarcas (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasa tales como fosfatasa alcalina, esterasas y glicosidasas u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas tales como la peroxidasa de rábano picante y similares), sustratos, cofactores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agentes cromogénicos y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.) coloreadas. Los ejemplos de patentes que describen el uso de dichas marcas incluyen las patentes de Estados Unidos N° 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

Los medios para detectar dichas marcas son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las radiomarcas y las marcas quimioluminiscentes se pueden detectar utilizando una película fotográfica o contadores de centelleo;

los marcadores fluorescentes se pueden detectar utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida (por ejemplo, tal como en la clasificación de células activadas por fluorescencia, FACS); y las marcas enzimáticas se pueden detectar 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.

5

Ensayos de estabilidad, localización y actividad

Tal como se ha indicado anteriormente, la estabilidad mejorada de MC4R se puede determinar midiendo un aumento en el polipéptido MC4R celular, determinando un aumento en el transporte a la superficie celular, por ejemplo, según se determina por el aumento de la expresión en la superficie celular, o mediante la determinación de una mayor actividad de MC4R. Los procedimientos ejemplares no limitantes para evaluar cada uno de los anteriores se describen a continuación.

10

**Determinación de la estabilidad intracelular de MC4R.** Los procedimientos para determinar los niveles de proteína MC4R intracelular son bien conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen inmunotransferencia Western, inmunoprecipitación seguida de inmunotransferencia Western (IP Western), o inmunofluorescencia utilizando una proteína MC4R marcada.

15

**Determinación del transporte de MC4R.** La evaluación del transporte de proteínas a través de la ruta biosintética se puede realizar por ejemplo, usando experimentos de pulso-persecución con proteína receptora marcada con  $^{35}\text{S}$ , junto con glicosidasas; o mediante inmunofluorescencia directa o indirecta para determinar la modificación de proteínas durante el transporte. Estos y otros procedimientos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Cell Biology* 2001; John Wiley & Sons.

20

Los procedimientos para detectar el transporte alterado de proteínas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para proteínas que están N- y/u O-glicosiladas en el aparato de Golgi, se puede usar el marcado metabólico por pulso-persecución usando proteínas marcadas radiactivamente, combinado con tratamiento con glucosidasa e inmunoprecipitación, para detectar si las proteínas están experimentando una glicosilación completa en el aparato de Golgi, o si se están reteniendo en el RE en lugar de ser transportadas al aparato de Golgi para una glicosilación posterior.

25

30

Los procedimientos sensibles para detectar visualmente la localización celular también incluyen microscopía fluorescente utilizando proteínas fluorescentes o anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, las proteínas MC4R de interés se pueden marcar con, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla y proteína fluorescente roja, operación seguida de microscopía multicolor y de lapso de tiempo y microscopía electrónica para estudiar el destino de estas proteínas en células fijadas y en células vivas. Para una revisión del uso de la toma de imágenes fluorescentes en el transporte 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 colocalización intracelular de proteínas, véase Miyashita et al., *Methods Mol Biol.* 2004; 261: 399-410.

35

40

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

45

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

50

Para las proteínas residentes de la membrana plasmática, se pueden utilizar ensayos menos sensibles para detectar si están presentes en la membrana. Dichos procedimientos incluyen inmunohistoquímica de células fijadas, o marcado de células completas utilizando un ligando radiomarcado (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ).

55

**Determinación de la expresión en la superficie celular de MC4R.** Una vez que se ha identificado un compuesto candidato, la siguiente etapa consiste en determinar si el compuesto candidato puede aumentar la cantidad de MC4R transportado a la superficie celular. Se pueden utilizar numerosos ensayos para evaluar cuantitativamente la expresión del receptor en la superficie celular. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos de unión de ligandos radiactivos, utilizando, por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ -MSH, para determinar la unión a células completas que expresan MC4R o a fracciones de membrana celular. Véase la solicitud publicada de Estados Unidos 2003/0176425 para una descripción de un procedimiento ejemplar; véase también Chhajlani, *Peptides*. 1996; 17 (2): 349-51. Además, también se puede utilizar una tinción de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos marcados o MC4R marcado (por ejemplo, MC4R marcado con FLAG). Otro procedimiento bien conocido es la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que clasifica o distingue poblaciones de células utilizando anticuerpos marcados contra

60

65

marcadores de la superficie celular. Véase también, Nijenhuis et al., anteriormente.

**Determinación de un aumento en la actividad de MC4R.** La actividad de MC4R se puede determinar 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 reportero enlazando de forma operativa un gen reportero tal como la 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 el MC4R estimula la secreción de TNF- $\alpha$  en melanóforos. Por lo tanto, la actividad de MC4R en respuesta a un compuesto candidato puede evaluarse midiendo la secreción de TNF- $\alpha$  (véase, por ejemplo, Ignar et al., *Peptides*, mayo de 2003; 24 (5): 709-16).

Por último, los melanóforos proporcionan un bioensayo rápido y sensible para agonistas y antagonistas de melanocortina. Este procedimiento se basa en la medición de la dispersión de gránulos de pigmento inducida por  $\alpha$ -MSH, determinada mediante 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 descripción, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de los conocimientos de la técnica. Estas técnicas son generalmente útiles para la producción de células recombinantes que expresan MC4R de tipo silvestre o mutantes para su uso en ensayos de cribado. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva 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, cuando estén disponibles.

La expresión "célula huésped" significa cualquier célula de cualquier organismo que se seleccione, modifique, transforme, desarrolle, use o manipule de cualquier forma 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 divulgación, la célula huésped se modifica para expresar un ácido nucleico y un polipéptido MC4R mutante o de tipo silvestre. Las células huésped pueden utilizarse además para cribado u otros ensayos. Células huésped ejemplares son células HEK293, células COS y células CHO.

Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que se ha sometido a manipulación por biología molecular.

Los polinucleótidos MC4R, en el presente documento, pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (control de la expresión), o pueden estar asociados a secuencias heterólogas, incluidos promotores, sitios de entrada al ribosoma interno (IRES) y otras secuencias del sitio de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias de señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes 5' y 3', y similares. Los ácidos nucleicos también pueden modificarse por muchos medios conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones incluyen: metilación, "encapsulado", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Los polinucleótidos pueden contener uno o más restos adicionales unidos covalentemente, 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 oxidativos, etc.) y alquiladores. Los polinucleótidos pueden derivarse mediante la formación de un fosfotriéster metílico o etílico o un enlace de fosforamidato de alquilo. Además, los polinucleótidos, en el presente documento, también pueden modificarse con una marca capaz de proporcionar una señal detectable, directa o indirectamente. Las marcas ejemplares incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden alterarse en una o más bases, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio para facilitar la biología molecular asociada con el uso de las moléculas.

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

El término "gen", también denominado "gen estructural", significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde

a una secuencia particular de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una o más proteínas MC4R, y pueden incluir o no secuencias reguladoras de ADN, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen MC4R.

5 Los términos "expresa" y "expresión", cuando se usan en el contexto de la producción de una secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia de ácidos nucleicos, significan permitir o provocar que la información de un gen MC4R o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo produciendo una proteína MC4R mediante la activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción del gen MC4R o la secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en, o por, una célula para formar un "producto de expresión", tal como una proteína MC4R. También se puede decir que el producto de expresión en sí, por ejemplo, la proteína resultante, se "expresa" por la célula. Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. Según la presente divulgación, el MC4R se expresa en la superficie celular de las neuronas.

15 El término "intracelular" significa algo que está en el interior de una célula. El término "extracelular" significa algo que está en el exterior de una célula. Una sustancia es "secretada" por una célula si aparece en una medida significativa en el exterior de la célula, desde algún lugar sobre la célula o desde el interior de la misma.

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

25 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 huésped.

30 El término "transducción" se refiere a la introducción de ADN, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, en una célula huésped procariota, por ejemplo, en una célula huésped procariota a través de un virus bacteriano, o bacteriófago. Una célula huésped procariota o eucariota que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado" o "transducido" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede provenir de cualquier fuente, incluidas células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de un género o especie diferente, o secuencias sintéticas.

35 La locución "célula manipulada genéticamente de forma recombinante" se refiere a cualquier célula procariota o eucariota que se ha manipulado para que exprese o sobreexpresa el ácido nucleico de interés, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, por medio de cualquier procedimiento apropiado, incluidos transfección, transformación o transducción. Esta locución también incluye la activación endógena de un ácido nucleico en una célula que normalmente no expresa ese producto genético o que expresa el producto genético a un nivel inferior al óptimo.

45 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, una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, de forma que la célula huésped replicará el ADN y expresará el gen o la secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen introducido o la secuencia introducida. El gen, es decir, un ácido nucleico que codifica un polipéptido MC4R, introducido o la secuencia introducida también puede denominarse un gen "clonado" o una secuencia "clonada", puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como secuencias de inicio, de detención, promotoras, de señal, de secreción u otras secuencias utilizadas por la maquinaria genética de la célula. El gen o la secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias sin función conocida. El ADN puede introducirse como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica en una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido.

55 Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación o la transfección se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al. 1989, anteriormente, se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de pared celular. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO, tal como se describe por Chung y Miller (*Nucleic Acids Res.* 1988, 16:3580). Otro procedimiento más es el uso de la técnica denominada electroporación. Alternativamente, cuando se usa un vector vírico, las células huésped pueden infectarse por el virus que contiene el gen de interés.

65 El término "vector" y las locuciones "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen MC4R) se puede introducir en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.; son bien conocidos en la técnica.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3'). Para definir la presente invención, la secuencia promotora está limitada en su extremo terminal 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende

5 cadena 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 inicio de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

10 Una secuencia de codificación está "bajo el control de" o "asociada de manera operativa a" las secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación en el ARNm, que después se empalma al ARN-trans (si contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

15 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de ligadura estándar. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se vuelven a enlazar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

20 Para un análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan mezclas de ligadura para transformar cepas bacterianas, y los transformantes exitosos se seleccionan por su resistencia a la ampicilina o la tetraciclina cuando sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian mediante el procedimiento de Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74: 5463-5467) o Messing et al. (Nucleic Acids Res. 1981, 9:309), o mediante el procedimiento de Maxam et al. (Methods in Enzymology 1980, 65:499). Las células huésped se transforman con los

25 vectores de expresión de la presente divulgación descritos anteriormente y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para el promotor utilizado.

### Ejemplos

30 La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, que se presentan a continuación. El uso de dichos ejemplos es solo ilustrativo y no limita de ninguna manera el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Del mismo modo, la invención no está limitada a ninguna forma de realización preferida particular descrita en el presente documento. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la presente memoria descriptiva y se pueden

35 realizar sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, la invención solo estará limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de los equivalentes a los que están autorizadas las reivindicaciones.

### Ejemplo 1: Generación de líneas celulares que expresan mutantes de plegamiento MC4R

40 Con el fin de determinar si algunos mutantes de MC4R dan como resultado defectos conformacionales de MC4R, los ácidos nucleicos de MC4R que contienen los diversos mutantes se transfectan en células HEK-293T y COS-7 y se evalúa su expresión y su actividad en la superficie celular. Aquellas líneas celulares en las que se observa una expresión reducida o la carencia de la misma en la superficie celular se evalúan adicionalmente para determinar la

45 presencia intracelular y/o la localización del polipéptido MC4R.

#### Procedimientos

50 **Generación de mutantes MC4R.** Un ADNc que codifica un MC4R de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) se modifica utilizando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, PCR, mutagénesis dirigida al sitio) para generar ADNc de MC4R mutantes que contienen alteraciones en los nucleótidos que dan como resultado, por ejemplo, uno de los siguientes polipéptidos mutantes 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. Dichos mutantes también pueden fusionarse con una

55 marca fluorescente, tal como GFP, tal como se describe por Blondet et al., *J Biochem* (Tokio) 2004; 135 (4): 541-6, o marcarse con FLAG, tal como se describe por VanLeeuwen et al., *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 15935-15940 o marcarse con una enzima tal como la luciferasa.

60 **Cultivo de células y transfección.** Dichos ácidos nucleicos de MC4R mutantes se clonan en un vector de expresión apropiado, por ejemplo, pCDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante. La transfección de células se realiza utilizando LipofectAMINE (Invitrogen), y las líneas celulares clonales transfectadas permanentemente se seleccionan por su resistencia al análogo de neomicina G418.

65 En resumen, las células HEK-293T y COS-7 se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco (con glutamina; Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen). Las células se incuban a 37 °C en aire humidificado que contiene el 5% de CO<sub>2</sub>. Las

células se encuentran generalmente en una confluencia del 70-80% el día de la transfección.

**MC4R marcado con GFP.** El ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP) está disponible de BD Biosciences (San Jose, CA) o Clontech (Palo Alto, CA). La GFP se fusiona en marco al extremo C-terminal de MC4R humano con el codón de terminación C-terminal eliminado, según las instrucciones del fabricante. El constructo de proteína de fusión MC4R-GFP quimérica se transfecta entonces como anteriormente. Un constructo de luciferasa se emplea de forma similar.

**Detección de la localización de mutantes de MC4R.** Los experimentos de unión para determinar la localización en la superficie celular se realizan usando las condiciones descritas anteriormente (Yang et al., *J Biol Chem* 1997; 272: 23000-23010). En resumen, se usan  $2 \times 10^5$  cpm de  $^{125}\text{I}$ -NDP-MSH (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en combinación con ligandos NDP-MSH no radiomarcados, AgRP 87-132 o AgRP 110-117. Las reacciones de unión se terminan eliminando el medio y lavando las células dos veces con medio esencial mínimo que contiene el 0,2% de albúmina de suero bovino. A continuación, las células se lisan con NaOH 0,2 N y la radioactividad del lisado se cuantifica en un contador analítico. La unión no específica se determina midiendo la cantidad de marca  $^{125}\text{I}$  unida en presencia de ligando sin marcar  $10^{-6}$  M. Además, se puede usar FACS tal como se describe a continuación en el ejemplo 4. La unión específica se calcula restando la radioactividad unida no específicamente de la radioactividad unida total. La unión máxima (Bmax) se puede calcular utilizando la ecuación  $B_{max} = [\text{unión específica de NDP-MSH}] / ([\text{NDP-MSH}] / (K_d + [\text{NDP-MSH}]))$ .  $K_i = CI_{50}/1 + \text{concentración de ligando}/K_d$ .

Cuando el mutante MC4R está marcado de forma fluorescente, se utiliza microscopía confocal para realizar un seguimiento del transporte 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). En resumen, las células se cultivan en cubres de vidrio de cámara de 24 a 48 h antes de los experimentos. Después de los tratamientos apropiados, las células se lavan con PBS frío y se fijan en formalina durante 20 minutos, y se observan en un microscopio de barrido de láser LSM 510 META (Carl Zeiss, Thornwood, NY). La fluorescencia de GFP se excita utilizando un láser de argón/criptón de 488 nm y se detecta con un filtro de paso de 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 de paso de 565 a 615.

Las imágenes tomadas digitalmente se cuantifican utilizando un Scion Image Beta 4.02. Las imágenes confocales de fluorescencia verde originales se convierten a escala de grises y se realiza un filtrado de mediana. A cada píxel se le asigna un valor de intensidad que varía de 0 (negro) a 255 (blanco). La superficie celular y la intensidad de fluorescencia celular total se miden después de seleccionar manualmente el área correspondiente. La distribución subcelular de MC4R-GFP se expresa como la relación entre la intensidad de fluorescencia de la superficie celular y la intensidad de fluorescencia celular total. Una disminución en la proporción indica la internalización del receptor.

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

#### 40 Ejemplo 2: Estructuras de agonistas y antagonistas de MC4R

Los agonistas y antagonistas potenciales de MC4R se seleccionaron basándose en la revisión de referencias de patentes publicadas y referencias de la literatura (en particular, Bednarek y Fong, *Exp. Opin Therapeutic Patents* 2004; 14 (3): 327-326 y el documento WO 02/062766). Los criterios utilizados para seleccionar los compuestos descritos en el presente documento incluyen los datos de  $CI_{50}$  publicados, datos de animales *in vivo* y datos de biodisponibilidad (por ejemplo, farmacocinética), cuando estén disponibles.

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

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

Denominación	Actividad de MC4R			PK	Referencia(s)
	$CI_{50}$ (nM)	$CE_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)		
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) <i>J Med Chem</i> 45:4589.

La síntesis de esta molécula (11 etapas) se realizó en base al esquema descrito 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 datos siguientes:

Denominación	Actividad de MC4R			PK	Referencia(s)
	$K_i$ (nM)	$CE_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)		
Compuesto 2	24	39	ND	ND	Richardson et al. (2004) <i>J Med Chem</i> 47:744.

La síntesis de esta molécula (11 etapas) se realizó en base al esquema descrito en la **figura 4**.

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

Este compuesto se seleccionó en base a los datos de  $\alpha$ MSH/MC4R comunicados por Arasasingham (*J Med Chem* 2003, 46: 9-11). La síntesis de este compuesto se realizó según el procedimiento descrito en el presente documento, que se resume en la **figura 7**.

10

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

Este compuesto se seleccionó y se sintetizó basándose en los datos y el procedimiento sintético descrito en la publicación de patente internacional PCT WO 02/062766 de Millennium Pharmaceuticals; el esquema de síntesis se resume en la **figura 8**. De la actividad biológica de este compuesto se informa en el documento WO 02/062766 utilizando un ensayo de proximidad de centelleo.

15

En resumen, la síntesis se realizó mediante el procedimiento siguiente: se añade 1,3-diaminopropano (Acros, 27,7 g, 0,374 mmol) a ácido tiosalicílico (Acros, 20 g, 0,130 mmol) en 1,2-diclorobenceno (Acros, 200 ml), esta mezcla se calienta a 170 °C durante 4 horas. Al enfriar 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, proporcionando 9 g de producto puro.

20

Se añade bromuro de 2-metoxi-5-nitrobenzilo (Fluka, 1,86 g, 7,559 mmol) a 2-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzotriol (1 g, 5,201 mmol) en metanol (60 ml) a temperatura ambiente, se mantiene concentrado durante 12 horas y se añade éter (10 ml), las agujas de color amarillo claro resultantes se recogen y se lavan con éter, proporcionando 1,28 g de producto puro.

25

**Ejemplo 3: Rescate de MC4R plegado incorrectamente utilizando baja temperatura o chaperonas químicas**

30

Dado que se sabe que tanto las bajas temperaturas (rescate térmico) como las chaperonas químicas generales tales como el DMSO restauran el plegamiento de proteínas mutantes, se evaluó la expresión en la superficie celular de mutantes de plegamiento de MC4R de tipo silvestre y de diversos MC4R en células que albergan MC4R de WT y mutante, y en esas células se cultivaron a 30 °C o con DMSO al 1%.

35

Procedimientos

**Células y transfecciones.** Se transfectaron células HEK 293 transitoriamente con mutantes de hMC4R de tipo silvestre (WT) o con los siguientes mutantes de hMC4R doblemente marcados con 3HA y Venus (proteína fluorescente verde amarilla aumentada; EYFP): S58C; N62S; R165W; R165Q y P299H.

40

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

45

**Ensayo de chaperona química:** Se incubaron células WT y transfectadas transitoriamente en presencia o ausencia de DMSO al 1% durante 12 horas antes de la evaluación de la expresión en la superficie de las células MC4R.

50

**Análisis de FACS.** El análisis de FACS se realizó después de marcar células de forma fluorescente con anticuerpo primario anti-HA.11 (ratón; dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 647 (anti-ratón de cabra; dilución 1:1000). Las células vivas (negativas a yoduro de propidio) se clasificaron en las siguientes dos poblaciones relevantes:

55

**P4:** Total de células positivas a YFP (representativas de la expresión total de MC4R)

**P5:** Porcentaje de células positivas tanto a YFP como a Alexa 647 (células positivas a Alexa y YFP) / (células positivas a YFP + células positivas a Alexa y YFP) (representativas de la expresión en la superficie celular)

Resultados

60

**Expresión en la superficie celular de MC4R.** La expresión en la superficie basal de la expresión en la superficie de

células de WT alcanza el 90%. Ninguno de los mutantes expresó MC4R en la superficie celular tal como se detectó mediante la unión de NDP- $\alpha$ -MSH marcado con I<sup>125</sup> (datos no mostrados). Cuando se analizaron por FACS, todos los mutantes mostraron una expresión en la superficie significativamente reducida en comparación con células transfectadas con MC4R de WT (datos no mostrados). Aproximadamente el 90% de las células 3HA-hMC4R-Venus de WT mostraron expresión en la superficie de MC4R (P5), mientras que la expresión en la superficie basal en los mutantes fue de entre el 12% y el 18% para N62S, R165W, R165Q y P299H. S58C muestra alrededor del 40% de expresión en superficie.

**Rescate termico.** Los cinco mutantes mostraron la ganancia en la expresión de la superficie celular de MC4R (P5) que se expone en la tabla 2:

Tabla 2

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

**Chaperona química:** No se detectó una mejora significativa de la expresión en la superficie celular en presencia de DMSO al 1%.

#### Ejemplo 4: Rescate de MC4R plegado incorrectamente utilizando chaperonas farmacológicas MC4R

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

#### Procedimientos

**Ensayo de chaperona farmacológica.** En resumen, las células que albergan cada uno de los mutantes MC4R referenciados anteriormente (transfectadas tal como se describe en el ejemplo 3) se cultivaron con cada uno de los compuestos antagonistas a concentraciones de 1,0  $\mu$ M y 10  $\mu$ M durante 12 h y se evaluó la expresión en la superficie celular de MC4R utilizando análisis de clasificación de células activadas fluorescentemente tal como se ha descrito anteriormente. Los niveles de expresión en la superficie celular se comparan entre condiciones de tratamiento y basales. El porcentaje de ganancia se determina según lo siguiente: [Ganancia = [(% de la expresión en la superficie (con tratamiento) - % de la expresión en la superficie (sin tratamiento)) / % de la expresión en la superficie (sin tratamiento)] \* 100.

**Ensayo de actividad de MC4R.** La acumulación de AMPc se evaluó para los mutantes de MC4R S58C, N62S, R165W y P299H en respuesta al tratamiento con el agonista de MC4R NDP-MSH (10<sup>-7</sup> M) en presencia o ausencia de cada uno de los antagonistas utilizando el kit de ensayo fluorescente de AMPc Catch Point de Molecular Devices (ensayo de células enteras; N° de cat. R8044). Los controles no se trataron o se trataron solo con NDP-MSH.

#### Resultados

**Rescate con chaperona farmacológica.** Tal como se muestra en la tabla 3, a continuación, ambos antagonistas fueron capaces de aumentar la expresión en superficie de los mutantes de MC4R R165W, S58C y R165Q en concentraciones de 1,0  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, con un efecto dependiente de la dosis. Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión en la superficie basal en los mutantes fue de entre el 12% y el 18% para N62S, R165W, R165Q y P299H. S58C muestra aproximadamente el 40% de expresión en la superficie. Inesperadamente, con el tratamiento con 10  $\mu$ M de cada compuesto se pudo restaurar la expresión en la superficie celular de MC4R R165W a niveles idénticos a las células que expresan MC4R de tipo silvestre.

Para el mutante N62S no se observó ningún efecto a 1,0  $\mu$ M con ninguno de los compuestos, aunque se observó un porcentaje significativo de ganancia en la expresión en la superficie celular del MC4R mutante con ambos compuestos a la concentración de 10  $\mu$ M. El compuesto representado en la figura 5 era más potente, es decir, se observó más expresión en la superficie celular que con el compuesto que se muestra en la figura 6.

Para el P299H mutante, el compuesto que se muestra en la figura 6 no tuvo ningún efecto de restauración de la

expresión en la superficie celular del receptor mutante tanto a 1,0  $\mu\text{M}$  como a 10  $\mu\text{M}$ , y solo se observó un efecto pequeño con el compuesto mostrado en la figura 5 a 10  $\mu\text{M}$ .

Tabla 3

5

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

Estos resultados demuestran que los mutantes de plegamiento de MC4R pueden "rescatarse" poniéndolos en contacto con concentraciones bajas de antagonistas de MC4R, que actúan como chaperonas farmacológicas para restaurar la expresión en la superficie celular.

10

Por último, un compuesto de bisaminotiazol descrito por Pedemonte et al., *J. Clin. Inves.* 2005; 115: 2564-71 (figura 9) mostró un pequeño efecto sobre los mutantes S58C (31,25% de ganancia) y R165W (28,95% de ganancia).

**Actividad de MC4R.** Tal como se muestra en la figura 11, la recuperación de la señalización a través de MC4R se observó en la misma medida que hMC4R de WT en S58C y R165W después del tratamiento con ambos antagonistas a 10  $\mu\text{M}$ . La capacidad de señalización en el mutante de MC4R N62S también se restauró en una menor medida. No se restauró la señalización en P299H, tal como se esperaba, dado que en este mutante, esta mutación se encuentra en un dominio necesario para el acoplamiento de la proteína G.

15

#### 20 **EJEMPLO 5: Cribado de chaperonas de MC4R que restauran la estabilidad y la actividad de MC4R mutante o aumentan la estabilidad de MC4R de tipo silvestre**

Este ejemplo describe un procedimiento para cribar compuestos de chaperona de MC4R para mejorar la expresión y/o la actividad en la superficie celular de MC4R mutante o de tipo silvestre plegado incorrectamente.

25

#### **Procedimientos**

**Transfección de MC4R mutante o de tipo silvestre.** La identificación de mutantes de MC4R de plegamiento/de transporte se realiza tal como se describe en el ejemplo 1. La transfección de dichos MC4R mutantes de plegamiento y/o de tipo silvestre se logra tal como se ha descrito anteriormente, o mediante el uso de cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar la expresión de proteínas en la superficie celular, incluidos inmunoensayos tales como ELISA y análisis FACS.

30

**Administración de chaperonas.** A los cultivos o matrices de células que expresan MC4R de tipo silvestre o mutantes de plegamiento se añaden diversas concentraciones de compuestos de ensayo de chaperona. Después se determina la localización celular de MC4R, además de la actividad del MC4R que se transporta a la superficie de la célula. Por ejemplo, se criban compuestos basados en piperazina, en piperidina, en 1,4-diazapano, en guanidina u otros compuestos de ensayo tal como se describe, por ejemplo, en los siguientes documento: Bednarek y Fong, *Exp Opin Ther Patents* 2004; 14: 327-36; Ujjainwalla et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13: 4431-4435; documento WO03/07949; documento WO03/61660; documento WO03/09847; documento WO03/09850; documento WO03/31410; documento WO03/94918; documento WO03/68738; documento WO03/92690; documento WO03/93234; documento WO03/72056; documento WO03/66597; documento WO03/66587; documento WO03/53927; documento WO02/67869; documento WO02/68387; documento WO03/68738; documento WO02/00259; documento WO02/92566; documento WO02/81443; documento WO02/81430 y documento WO02/80896.

40

**Detección del transporte de MC4R a la superficie celular.** La detección de la localización celular y/o en la superficie celular de células que expresan MC4R tratadas con el compuesto en comparación con las células no tratadas se realiza tal como se ha descrito anteriormente.

50

**Detección de la actividad de MC4R mediante la medición de la acumulación de AMPc.** 48 h después de la transfección, las células se lavan una vez con PBS y después se desprenden de la placa con PBS que contiene EDTA al 0,02% (Sigma). Las células desprendidas se recogen mediante centrifugación y se vuelven a suspender 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 minutos, para permitir la absorción de IBMX, se añaden 0,4 ml de suspensión celular (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml) a 0,1 ml de tampón IBMX que contiene diversas concentraciones de agonistas (por ejemplo, [Nle4-D-Phe7]-MSH(NDP-MSH),  $\alpha$ -MSH), u otros candidatos

55

chaperonas o forskolina 10  $\mu$ M. Las células se incuban posteriormente a 37 °C durante 15 minutos para permitir la acumulación de AMPc. La actividad se concluye añadiendo 0,5 ml de ácido tricloroacético al 5%, y el AMPc liberado de las células lisadas se analiza mediante el sistema de ensayo de proximidad de centelleo  $^{125}$  de AMPc (Amersham Biosciences). Los valores de  $CE_{50}$  se calculan con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa informático GraphPad Prism (utilizando un análisis de regresión no lineal ajustado con una curva de dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable).

**Ejemplo 6: Administración de una monodosis de DGJ para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética y los efectos sobre la actividad enzimática de la  $\alpha$ -galactosidasa A**

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

**Diseño del estudio y duración.** Este estudio fue el primer estudio en seres humanos, de un único centro, de fase I, aleatorizado, de doble ciego, de dosis dos veces al día, controlado con placebo para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética y los efectos de la actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A de DGJ después de administración oral. El estudio sometió a ensayo a dos grupos de 8 sujetos (6 activos y 2 de placebo) que recibieron una dosis dos veces al día de 50 o 150 mg de DGJ o placebo administrado por vía oral durante siete días consecutivos, acompañados de una visita de seguimiento a los siete días. Los sujetos se alojaron en la instalación de tratamiento desde 14 horas antes de la administración hasta 24 horas después de la administración. Las comidas se controlaron por medio de una agenda y los sujetos permanecieron ambulatorios durante 4 horas después de la administración del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon para DGJ en plasma el día 1 y el día 7. Además, se calculó el porcentaje acumulativo de DGJ excretado (12 horas después de la dosis) en la orina. La actividad de  $\alpha$ -Gal A se calculó en glóbulos blancos (leucocitos) antes de comenzar la dosificación, y nuevamente a las 100 horas, 150 horas y 336 horas durante el ensayo.

**Población de estudio.** Los sujetos eran voluntarios varones sanos, no institucionalizados y no fumadores, de entre 19 y 50 años de edad (inclusive), integrados por miembros de la comunidad en general.

**Evaluaciones de seguridad y tolerabilidad.** La seguridad se determinó mediante la evaluación de los signos vitales, los parámetros de laboratorio (química del suero, hematología y análisis de orina), los ECG, el examen físico y el registro de eventos adversos durante el período de tratamiento.

**Muestreo farmacocinético.** Se recogieron muestras de sangre (10 ml cada una) en tubos de recolección de sangre que contenían EDTA antes de la dosificación y en los momentos posteriores siguientes: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas. Las muestras de sangre se enfriaron en un baño de hielo y se centrifugaron con refrigeración lo antes posible. Las muestras de plasma se dividieron en dos partes alícuotas y se almacenaron a  $20 \pm 10$  °C en espera del ensayo. Al final del estudio, todas las muestras se transfirieron a MDS Pharma Services Analytical Laboratories (Lincoln) para su análisis. Se recogió la producción de orina completa de cada sujeto para el análisis de DGJ para determinar el aclaramiento renal durante las primeras 12 horas después de la administración de DGJ los días 1 y 7.

**Muestreo de actividad enzimática de  $\alpha$ -GAL en leucocitos.** Se recogieron muestras de sangre (10 ml cada una) en tubos de recolección de sangre que contenían EDTA y leucocitos extraídos antes de la dosificación y en los momentos posteriores siguientes: 100 horas, 150 horas y 336 horas. Las muestras se trataron tal como se ha descrito anteriormente, y se determinaron los niveles de actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A de leucocitos.

**Análisis estadístico.** Los datos de seguridad que incluyen evaluaciones de laboratorio, exámenes físicos, eventos adversos, supervisión de ECG y evaluaciones de signos vitales se resumieron por grupo de tratamiento y el punto temporal de recogida. Las estadísticas descriptivas (media aritmética, desviación estándar, mediana, mínima y máxima) se calcularon para los datos cuantitativos de seguridad, así como para la diferencia con la línea base. Los recuentos de frecuencia se compilaron para la clasificación de datos de seguridad cualitativos.

Los eventos adversos se codificaron utilizando el diccionario MedDRA versión 7.0 y se resumieron por tratamiento para la cantidad de sujetos que informaron del evento adverso y la cantidad de eventos adversos de los que se informó. Se proporcionó una lista de datos de eventos adversos por sujeto que incluía el término literal, el término codificado, el grupo de tratamiento, la gravedad y la relación con el tratamiento. Los medicamentos concomitantes y la historia médica se enumeraron por tratamiento.

Los parámetros farmacocinéticos se resumieron por grupo de tratamiento utilizando estadísticas descriptivas (medias aritméticas, desviaciones estándar, coeficientes de variación, tamaño de la muestra, mínimo, máximo y mediana).

## Resultados

5 Ningún sujeto tratado con placebo experimentó eventos adversos (EA) y ningún sujeto presentó EA después de recibir 50 mg dos veces al día o 150 mg dos veces al día de DGJ. La DGJ parecía ser segura y bien tolerada por este grupo de sujetos varones sanos, ya que las dosis se administraron a 50 mg dos veces al día y 150 mg dos veces al día

10 Las desviaciones de laboratorio de los intervalos normales se produjeron después de la dosificación, pero ninguna se consideró clínicamente significativa. No hubo cambios de datos promedio clínicamente relevantes en ningún parámetro investigado a lo largo del transcurso del estudio. No se produjo ninguna anomalía clínicamente relevante en ningún parámetro de signo vital, ECG o examen físico.

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

Tabla 4

	Dosis de 50 mg dos veces al día		Dosis de 150 mg dos veces al día	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
C <sub>max</sub> (µM)	2,3 ± 0,3	3,9 ± 0,5	11,3 ± 1,5	10,8 ± 1,4
t <sub>max</sub> (h)	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,4
t <sub>1/2</sub> (h)	2,5 ± 0,1		2,4 ± 0,05	
C <sub>min</sub> (µM)		0,4 ± 0,03		1,2 ± 0,1
excreción renal acumulativa a las 12 h (%) <sup>a</sup>	16 ± 6	48 ± 7	42 ± 7	60 ± 5

<sup>a</sup> Porcentaje acumulativo de DGJ excretada a lo largo del período de 12 horas posteriores a la dosis.

20 La farmacocinética de DGJ estaba bien caracterizada en todos los sujetos y en todos los niveles de dosis. En promedio, las concentraciones máximas se produjeron en aproximadamente 3 horas para todos los niveles de dosis. La C<sub>max</sub> de DGJ aumentó de manera proporcional a la dosis cuando las dosis aumentaron de 50 mg a 150 mg.

Las semividas de eliminación medias (t<sub>1/2</sub>) fueron comparables a niveles de dosis de 50 y 150 mg en el día 1 (2,5 frente a 2,4 horas).

25 El porcentaje medio de DGJ excretada durante las 12 horas posteriores a la dosis fue del 16% y el 42% a niveles de dosis de 50 mg y 150 mg, respectivamente, el día 1, aumentando al 48% y al 60%, respectivamente, el día 7.

30 **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. La DGJ no inhibió la actividad enzimática de α-Gal A de leucocitos en sujetos a dosis de 50 mg dos veces al día o 150 mg dos veces al día. Además, la DGJ produjo una tendencia dependiente de la dosis de aumento de la actividad de α-Gal A de leucocitos en voluntarios sanos. La actividad enzimática de α-Gal A se midió en leucocitos de sujetos que recibieron placebo, 50 mg dos veces al día y 150 mg dos veces al día de DGJ. El placebo no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática de α-Gal A de leucocitos. Las variaciones en la actividad enzimática en respuesta al placebo no fueron clínicamente significativas. Tanto 50 mg dos veces al día como 150 mg dos veces al día de DGJ aumentaron la actividad enzimática de α-Gal A de leucocitos normalizada. En respuesta a 50 mg dos veces al día de DGJ, la actividad enzimática de α-Gal A de leucocitos aumentó al 120%, 130% y 145% de antes de las dosis a las 100 horas, 150 horas y 336 horas después de la dosis, respectivamente. En respuesta a 150 mg dos veces al día de DGJ la actividad enzimática de α-Gal A de leucocitos aumentó al 150%, 185% y 185% de antes de las dosis a las 100 horas, 150 horas y 336 horas después de la dosis, respectivamente.

45 La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## Apartado de ventajas

50 1. Un procedimiento para mejorar la actividad de un polipéptido MC4R, procedimiento que comprende poner en contacto una célula que expresa MC4R con una chaperona farmacológica que se une al polipéptido MC4R en una cantidad eficaz para aumentar la actividad de MC4R.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R de tipo silvestre.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el polipéptido MC4R tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 8.
- 5 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R mutante.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación asociada con el plegamiento incorrecto del polipéptido MC4R.
- 10 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en P78L, R165Q, R165W, I125K, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, N62S, N97D, Y157S, I102S, L106P, L250Q, Y287X y P299H.
- 15 7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el polipéptido MC4R mutante es R165Q, R165W, S58C, N62S o P299H.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica es un antagonista de MC4R.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el antagonista de MC4R tiene una estructura tal como se expone en la figura 5 o la figura 6.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R cuando se pliega en una conformación funcional.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la actividad potenciada por la chaperona farmacológica es la activación de la adenilil ciclasa.
12. Un procedimiento para potenciar la expresión en la superficie celular de un polipéptido MC4R, procedimiento que comprende poner en contacto una célula que expresa MC4R con una chaperona farmacológica que se une al polipéptido MC4R en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de la superficie celular MC4R.
- 30 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la chaperona farmacológica se disocia del polipéptido MC4R cuando se pliega en una conformación funcional.
- 35 14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R de tipo silvestre.
15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el polipéptido MC4R tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 8.
- 40 16. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R mutante.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación asociada con el plegamiento incorrecto del polipéptido MC4R.
- 45 18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en P78L, R165Q, R165W, I125K, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, N62S, N97D, Y157S, I102S, L106P, L250Q, Y287X y P299H.
- 50 19. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el polipéptido MC4R mutante es R165Q, R165W, S58C, N62S o P299H.
20. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la chaperona farmacológica es un antagonista de MC4R.
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el antagonista de MC4R tiene una estructura tal como se expone en la figura 5 o la figura 6.
- 55 22. Un procedimiento para tratar a un individuo con necesidad de un aumento de la estabilidad de un polipéptido MC4R, procedimiento que comprende administrar al individuo una chaperona farmacológica que se une al polipéptido MC4R en una cantidad eficaz para aumentar la estabilidad.
- 60 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la chaperona farmacológica es un antagonista de MC4R que tiene una estructura tal como se expone en la figura 5 o la figura 6.
24. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la chaperona farmacológica aumenta el transporte del polipéptido MC4R a la membrana celular.
- 65

25. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el individuo es obeso o está en riesgo de volverse obeso.
26. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el individuo comprende una mutación en un gen MC4R que se ha asociado con la obesidad.
- 5 27. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la chaperona farmacológica se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
28. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R de tipo silvestre.
- 10 29. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R mutante.
30. Un procedimiento para identificar una chaperona farmacológica para un MC4R, procedimiento que comprende:
- 15 (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una mezcla de reacción que comprende una célula o un extracto celular que expresa un polipéptido MC4R, en el que las condiciones de la mezcla de reacción permiten la unión del compuesto de ensayo al polipéptido MC4R;
- (b) detectar la estabilidad, la actividad o la localización en la superficie celular del polipéptido MC4R en la mezcla de reacción en presencia del compuesto de ensayo; y
- 20 (c) comparar la estabilidad, la actividad o la localización en la superficie celular del polipéptido MC4R en presencia del compuesto de ensayo con la estabilidad, la actividad o la localización en la superficie celular del polipéptido MC4R en ausencia del compuesto de ensayo,
- 25 en el que la detección de la estabilidad, la actividad o la localización en la superficie celular mejorada en presencia del compuesto de ensayo en relación con la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es una chaperona farmacológica para el MC4R.
- 30 31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R de tipo silvestre.
32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que el polipéptido MC4R comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.
- 35 33. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que el polipéptido MC4R es un polipéptido MC4R mutante.
34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que el polipéptido MC4R comprende una mutación asociada con el plegamiento incorrecto del polipéptido MC4R.
- 40 35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que la mutación de plegamiento incorrecto de MC4R se selecciona del grupo que consiste en P78L, R165Q, R165W, I125K, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, N62S, N97D, Y157S, I102S, L106P, L250Q, Y287X, P299H y S58C, con respecto a la secuencia del polipéptido MC4R de tipo silvestre tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.
- 45 36. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la mezcla de reacción está basada en células.
37. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la mezcla de reacción está exenta de células.
38. El procedimiento de la reivindicación 30, que comprende además detectar la actividad de un polipéptido MC4R ubicado en la superficie celular.
- 50 39. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que la actividad detectada es la activación de AMPc.
40. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica tiene una estructura tal como se representa en la figura 13.
- 55 41. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica tiene una estructura tal como se representa en la figura 14.
- 60 42. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica tiene una estructura tal como se representa en la figura 15.
43. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica tiene una estructura tal como se representa en la figura 16.
- 65

ES 2 710 675 T3

Listado de secuencias

<110> Amicus Therapeutics Inc.

5 <120> CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

<130> 077376.0346

<150> 60/687.648

10 <151> 03/06/2005

<150> 60/799.968

<151> 12/05/2006

15 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 1000

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

```

atggtgaact ccaccaccg tgggatgcac acttctctgc acctctggaa cgcagcagt    60
tacagactgc acagcaatgc cagtgagtc cttggaaaag gctactctga tggaggggtgc    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 ggcaactggtg ccatccgcca aggtgccaat    720
atgaaggagg cgattacctt gaccatcctg attggcgtct ttgttgtctg ctgggccccca    780
ttcttctctc acttaaatatt ctacatctct tgtcctcaga atccatattg tgtgtgcttc    840
atgtctcact ttaacttgta tctcatactg atcatgtgta attcaatcat cgatcctctg    900
atztatgcac tccggagtca agaactgagg aaaaccttca aagagatcat ctgttgctat    960
cccctgggag gcctttgtga cttgtctagc agatattaa                               1000

```

<210> 2

30 <211> 332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

35

Met Val Asn Ser Thr His Arg Gly Met His Thr Ser Leu His Leu Trp



ES 2 710 675 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  
 290 300

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  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

atggtgaact ccaccaccg tgggatgcac acttctctgc acctctggaa cgcagcagt 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 atgctgggtga gcgtttcaa 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 ctcatagatg agtgctgtca tcatctgcct catcaccatg 600  
 ttcttcacca tgctggctct catggcttct ctctatgtcc acatgttctc gatggccagg 660  
 cttcacatta agaggattgc tgtcctcccc ggcactgggtg ccatccgcca aggtgccaat 720  
 atgaaggag cgattacctt gaccatcctg attggcgtct ttgttgtctg ctgggccccca 780  
 ttcttctcc acttaatatt ctacatctct tgtcctcaga atccatattg tgtgtgcttc 840  
 atgtctcact ttaacttga tctcactatg atcatgtgta attcaatcat cgatcctctg 900  
 atttatgcac tccggagtca agaactgagg aaaaccttca aagagatcat ctgttgctat 960  
 cccctgggag gcctttgtga cttgtctagc agatattaa 999

10

<210> 4  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 4

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

20

ES 2 710 675 T3

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 2 710 675 T3

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

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  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5

5

10

```

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

ES 2 710 675 T3

cagaatttgt cactcaggca caacctgagc agtgacttcc ccaacagctg cctctactgt 1500  
 atagtgcctt ggttggaaaa tatctactgt ataaaatgta agtttatgac ttttgacgtg 1560  
 gggaaaaagt ctcaacgtgt tatgtttatt gaccttactt tttttgtgtg taaactgctt 1620  
 atttatgttc tacagcgtgg gcgctatgga gttccataaa agaaaaagac acccttatta 1680  
 aaactttgac agtgtttctt tccatgttat ttatcaagag tcaacccttg ttctttctgt 1740  
 ggtagcagaa atcagagcct tctgaaaagc tgtttccatt gcatcacccc cacagcacag 1800  
 cagaagcctg attccactgt ttatggggaa atatttaaac actggatgct cgatcatta 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  
 100 105 110  
 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

10

ES 2 710 675 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  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5

<400> 7

gctggctcac aaagatgctc aggaagctga acttctgaga ggctgcggtg tgagtgtggg 60  
 cgcgcatg cagacgaggc tcccagcagt acagcgagtc tcagggaaaa ggactctgaa 120  
 aagaccccca gtgaatacta aagtgaaagc cgcactgaga gagagagaaa aaaaagcaaa 180  
 cagcagactg gtcaaccgag aatgagcatt cagaagcacc agcttctaaa gagacgatga 240  
 tctgagccga acccagaaga gaccaacaac tcctttgcca gttccgctgc ttctgaccct 300  
 gctcctagca ggcgccaagc gcagcctccc aacttctaca ggcatacaga ctgggagaga 360  
 atcactcgga gcttcctga cccaggaggt tggatcagtt caaggaggac tcaaatccag 420  
 ctgctgcagg aagatgaact ccaccacca ccatggcatg tatacttccc tccacctctg 480  
 gaaccgcagc agctacgggc tgcacggcaa tgccagcgag tcgctgggga agggccaccc 540  
 ggacggagga tgctatgagc aactttttgt ttccccgag gtgtttgtga ctctgggtgt 600

10

ES 2 710 675 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 ttgcggtgga caggatattc actatctttt acgcgctcca 900  
gtaccataac atcatgacgg ttaggcgggt cgggatcatc ataagttgta tctgggcagc 960  
ttgactgtg tcaggcgtcc tcttcatcat ttactcggac agcagcgtg tcatcatctg 1020  
cctcatttcc atgttcttca ctatgctagt tctcatggcc tctctctatg tccacatggt 1080  
cctgatggcg aggcctcaca ttaagaggat tgctgtcctc ccaggcacag ggaccatccg 1140  
ccagggtagc aacatgaagg gggcgattac cttgaccatc ctgattggag tctttgttgt 1200  
ctgctgggcc ccgttctttc tccatttact gttctacatc tcttgcctc agaatccata 1260  
ctgctgtgac tcatgtctc attttaattt gtatctcata ctgatcatgt gtaacgccgt 1320  
catcgaccct ctcatattg ccctccggag tcaagaactg aggaaaactt tcaaagagat 1380  
catctgtttc tatcctctgg gaggcattct tgagttgtct agcaggtatt aagtggggga 1440  
cagagtgcaa actaggtaga tacctgcaga ctttgtcact ctggccgat ctgagcagtg 1500  
tacttcccaa cagctgcctc ttctgtgtaa tgctttgggt gaaaatatct actgtataaa 1560  
tgtaagttt tgacttttga catggaaaaa aaagtctcaa cgtgttatgt ttattgacac 1620  
gctatTTTT ttgtttgtaa aatgcttatt tatgttctat atagtgtggg cgttatgaat 1680  
tgacatgaaa gaaaaacaga cacccttatt aaaacttga cagtgtttct ttcctgttat 1740  
ttatcaaggt tccacacttg ttctttctgt agtggccgaa atcagaacct tattaacgt 1800  
gttctcagct gttctcatgt attagcccca cagtactgca gaggcactga cccactggt 1860  
tatggggaaa ttttaaca ctacatgctt gatcattaaa atgagtcagc tctcttagtg 1920  
aaatttcgag caatcgaata aaagcttgcc tattatcctt gctgtccaaa taaactgatg 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 atagattaa 2220  
gtgtcctggt aatataaac tgtccacacc atgctgaaat ttcctatgcc aatgatacc 2280  
ccaccataac agaattgattt ctttctggct tcttaccagg gatctgggtc ctacagaaag 2340  
gtctagaaca gctccctctg cacttagagg tccagcgttc atttcatctt agagttaata 2400  
gtgagttgtg ctatctttca tgtggcgggg gacttgttgt tcaacttctg attacttttt 2460  
gagctggaat ataagtgtg aagatcaagt gatttaattc ccaagccaaa tccacatcac 2520  
aaaacatttt gggacagggt ttgtaaatat ctaaagtgtg gagccctgtg gtgcttgcac 2580

ES 2 710 675 T3

ataacgagat ggaaagagaa cacaaatggg gtcctggaag gtacagtaaa acaccctgct 2640  
 gttcttagtc atgtcttggg atggggaatg cttgttttct ccaaactaat accaaagggtg 2700  
 tggccactga gcaaccaaat ctatgctttc tagtctgtgt atactttgaa ataaaaggga 2760  
 taaaaacct 2769

<210> 8  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

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

10

ES 2 710 675 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  
 225 230 235 240

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 Gln 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> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> D aminoácido  
 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 25 <223> AMIDACIÓN

<400> 9

Xaa Gly Lys Phe Arg Trp Gly  
 1 5  
 30

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 40

<222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN, Nle  
  
 <220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> beta-naftilalanina (2)  
  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 10  
 15  
 xaa Gly Lys Xaa Arg Trp Gly  
 1 5  
  
 <210> 11  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético, cíclico  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN, Nle  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(4)  
 <223> Nle  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> beta-naftilalanina (2 ')  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> AMIDACIÓN  
 45  
 <400> 11  
  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp His Xaa Arg Trp Lys  
 1 5 10  
 50 <210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)  
 <223> D-(2) beta-naftilalanina  
  
 <220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN  
  
 <400> 12  
 10 Cys Glu His Xaa Arg Trp Gly Cys Pro Pro Lys Asp  
     1                  5                          10  
  
 <210> 13  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Nle  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D-(2') beta-naftilalanina  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> AMIDACIÓN  
 40  
 <400> 13  
  
 Cys Xaa Arg His Xaa Arg Trp Gly Cys  
 1                  5  
 45 <210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60 <222> (4)..(4)  
 <223> D-Phe(3,4-di-cl)  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN  
  
 <400> 14  
 5 Cys Glu His Phe Arg Trp Gly Cys Pro Pro Lys Asp  
   1                  5                                  10  
  
 <210> 15  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético, cíclico  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN, Nle  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> c [Asp  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Che  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> DNal (2 ')  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> AMIDACIÓN  
 40 <400> 15  
  
 Xaa Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys  
   1                  5  
  
 <210> 16  
 45 <211> 7  
   <212> PRT  
   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Péptido sintético  
   <220>  
   <221> MOD\_RES  
   <222> (1)..(1)  
   <223> ACETILACIÓN, Nle  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> c [Asp  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Cpe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 5 <223> DNal (2 ')

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 10 <223> AMIDACIÓN

<400> 16  
 Xaa Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys  
 1 5

15 <210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> BLOQUEADO, ciclo(1,6)-suc

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 30 <223> D aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 35 <223> AMIDACIÓN

<400> 17  
 His Phe Arg Trp Lys  
 40 1 5

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN, D aminoácido

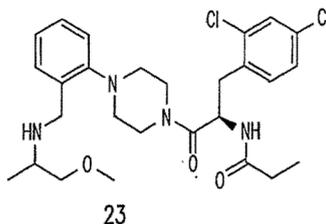
55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D aminoácido

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 18

Arg Cys Glu His Phe Arg Trp Cys  
1 5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una chaperona farmacológica del receptor de melanocortina 4 (MC4R) para su uso en el tratamiento de la obesidad o la prevención de la obesidad en un paciente que posee un polipéptido MC4R mutante, siendo la chaperona farmacológica el compuesto 23:



- 10 y en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación asociada con el plegamiento incorrecto del polipéptido MC4R.

2. La chaperona para su uso según la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante para

- 15 i. aumentar la actividad del mutante MC4R;  
 ii. aumentar la expresión en la superficie celular del mutante MC4R y/o  
 20 iii. aumentar la estabilidad del mutante MC4R.

3. La chaperona para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en P78L, R165Q, R165W, C271Y, T11A, A175T, I316L, I316S, I317T, N97D, G98R, N62S, C271R, S58C, Y157S, I102S, L106P, L250Q e Y287X en comparación con la SEQ ID NO: 2.

25 4. La chaperona para su uso según la reivindicación 3, en el que el polipéptido MC4R mutante comprende la mutación C271Y, R165Q, R165W, S58C o N62S en comparación con la SEQ ID NO: 2.

30 5. La chaperona para su uso según la reivindicación 1, en el que la chaperona farmacológica se une al polipéptido MC4R mutante cuando se pliega dando una conformación funcional.

6. La chaperona para su uso según la reivindicación 2, en el que la actividad de MC4R mutante potenciada por la chaperona farmacológica es la activación de la adenilil ciclasa.

35 7. La chaperona para su uso según la reivindicación 2, en el que la chaperona farmacológica aumenta el transporte del polipéptido MC4R mutante a la membrana celular.

8. La chaperona para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la chaperona se debe administrar a un individuo que comprende una mutación en un gen MC4R que está asociado con la obesidad.

40 9. La chaperona para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la chaperona farmacológica debe administrarse en un vehículo farmacológicamente aceptable.

45 10. La chaperona para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la chaperona se administra en una cantidad de 1 a 100 mg/kg de peso corporal por día.

AGONISTA DE MC4R

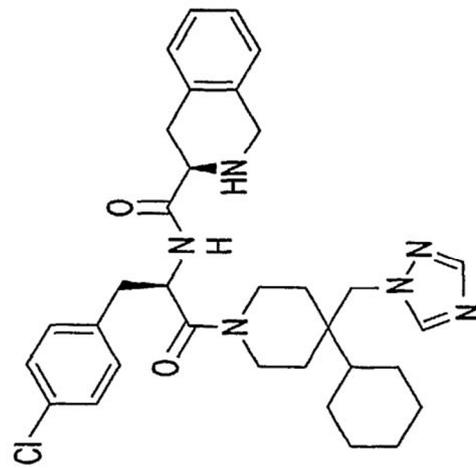


FIG.1

AGONISTA DE MC4R

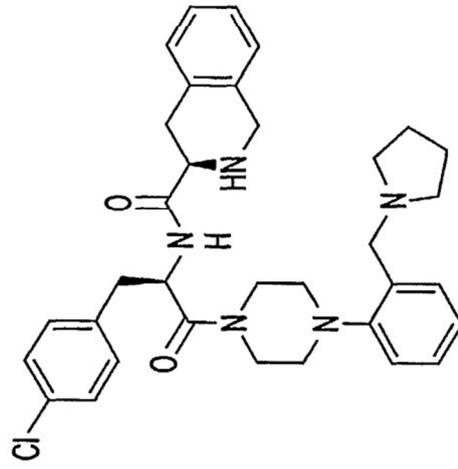


FIG.2

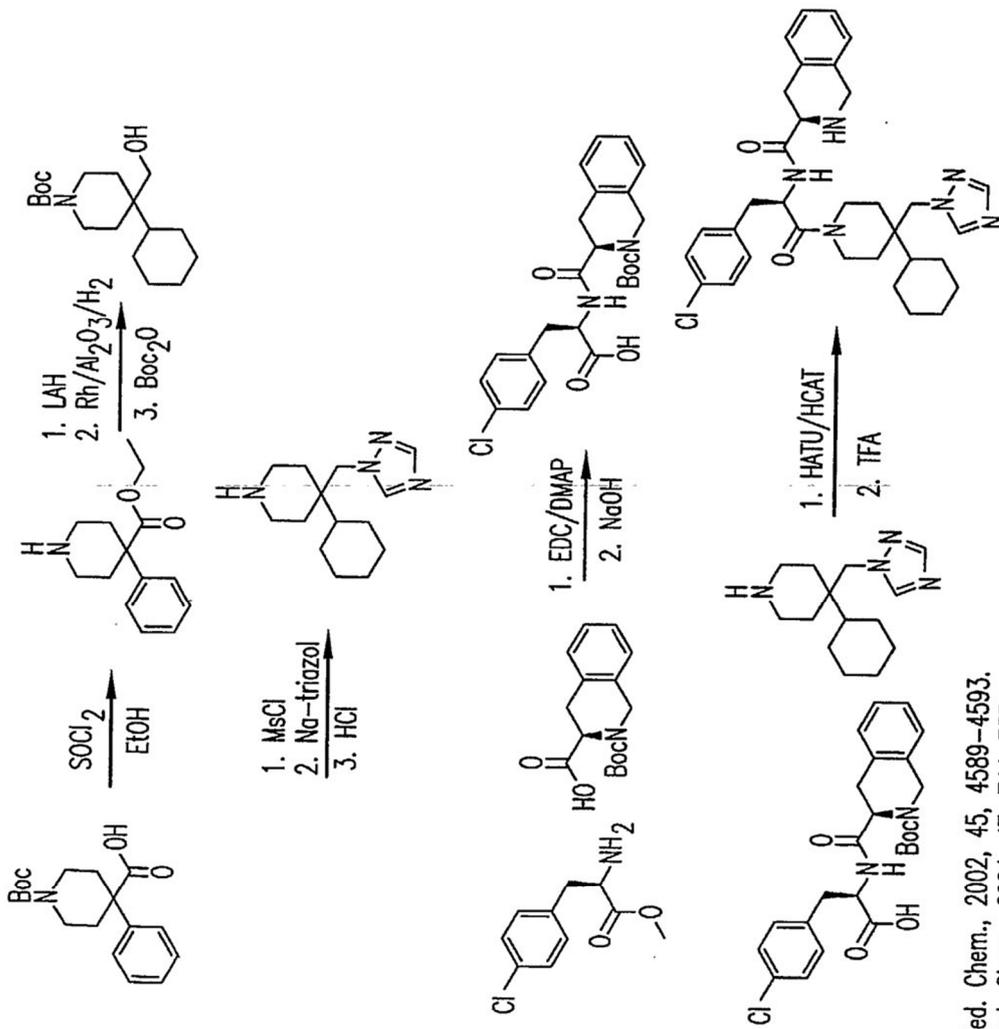
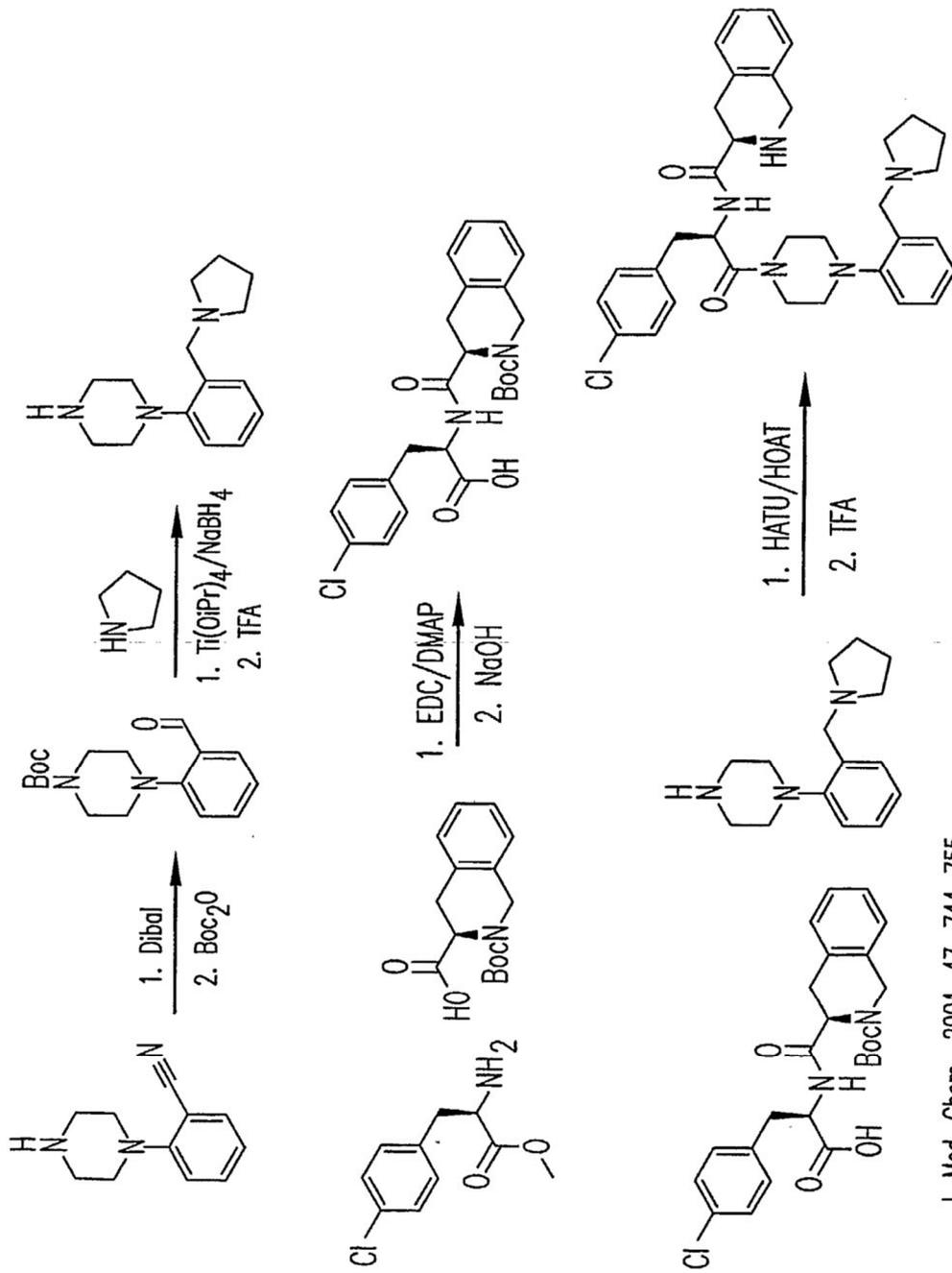


FIG.3

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



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

FIG.4

ANTAGONISTA DE MC4R

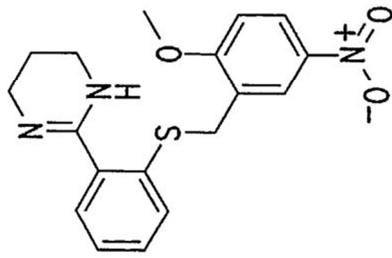


FIG.5

ANTAGONISTA DE MC4R

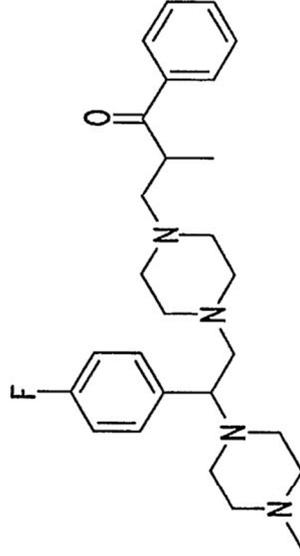


FIG.6



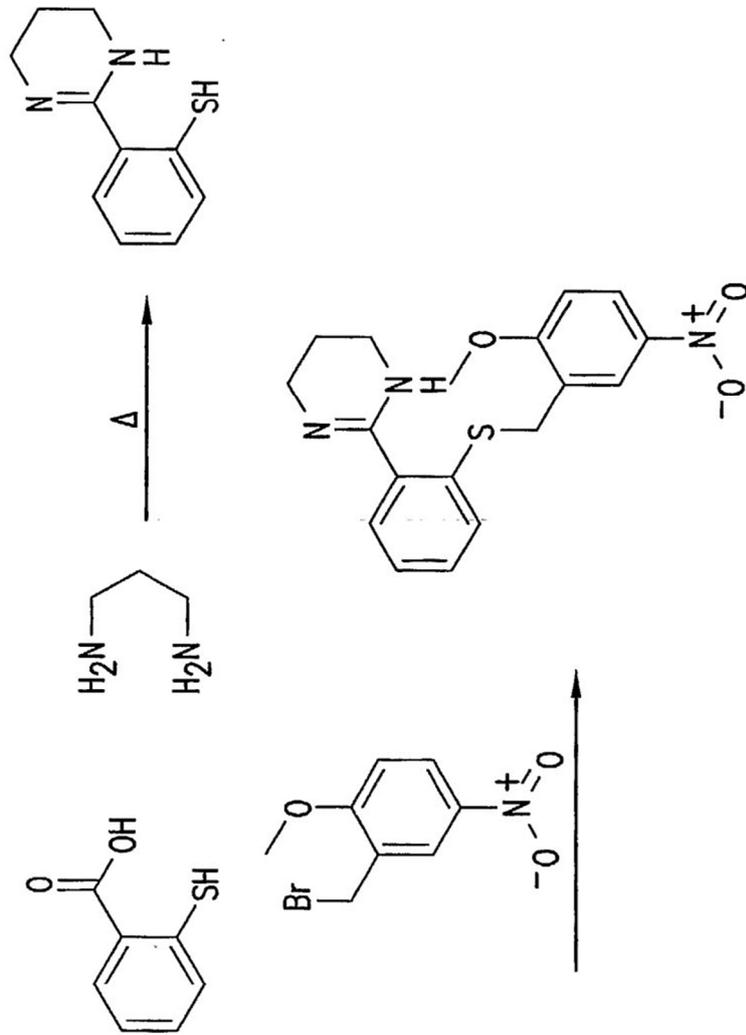


FIG.8

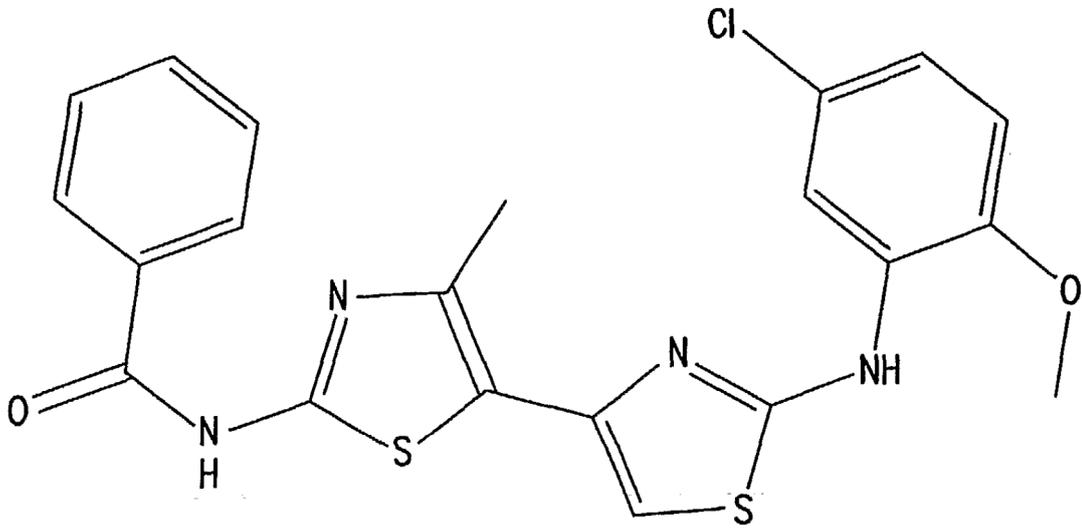


FIG. 9

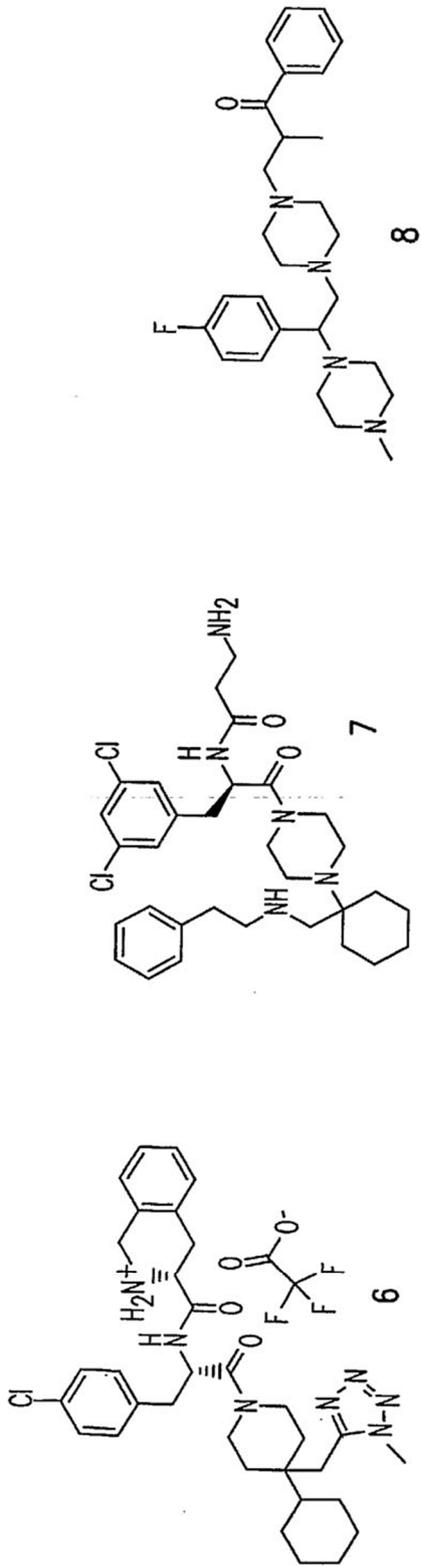


FIG. 10A

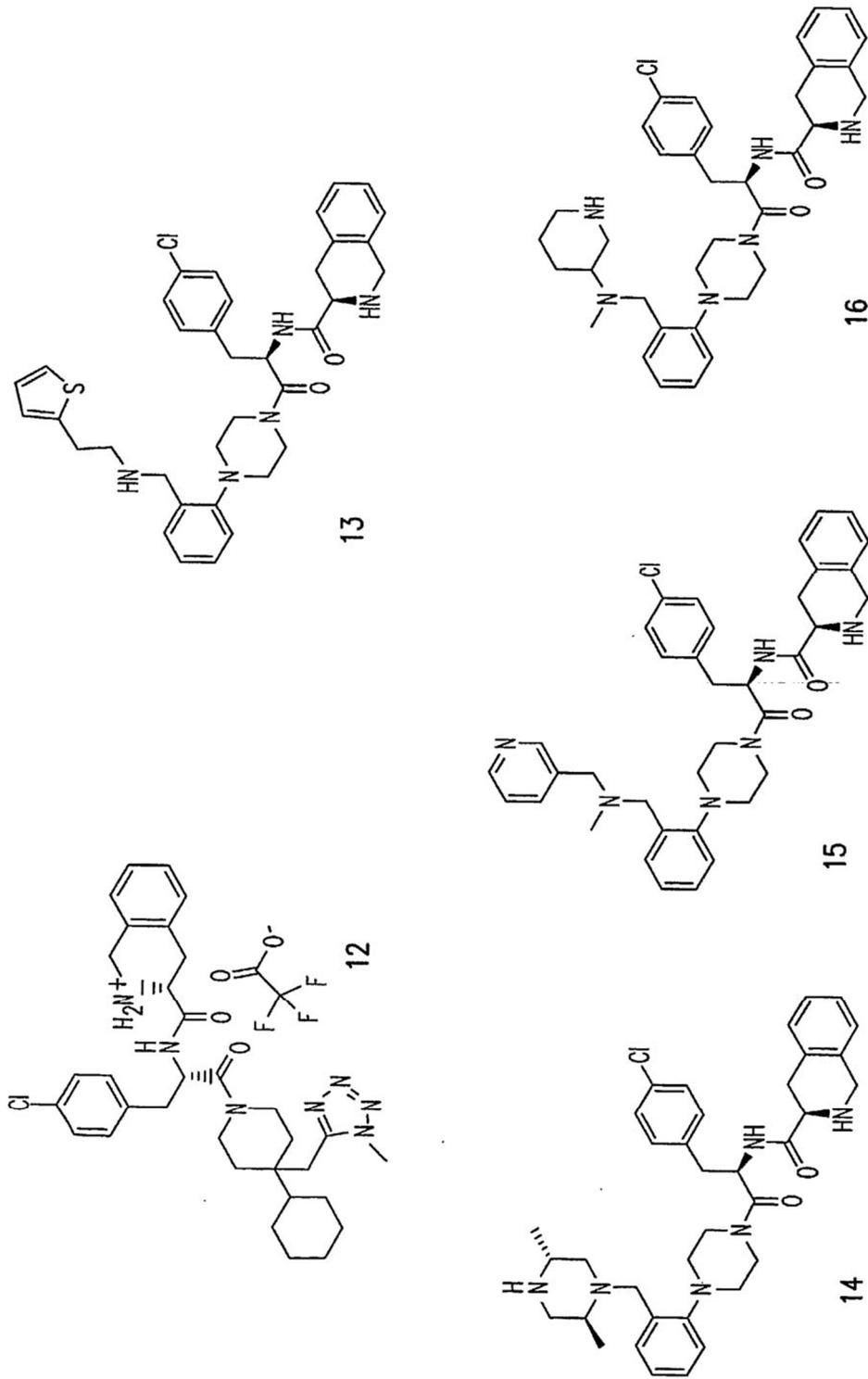


FIG. 10B

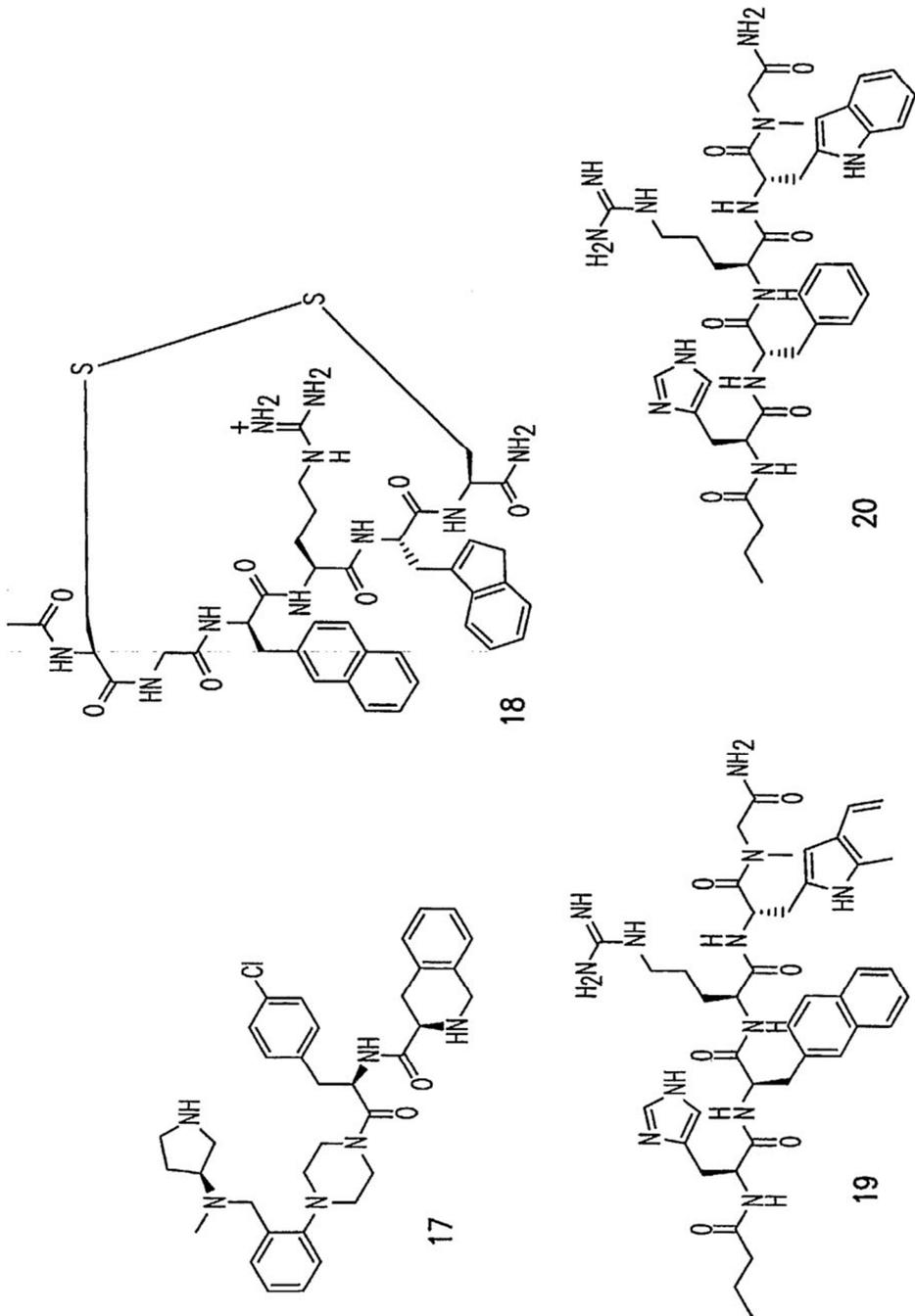


FIG.10C

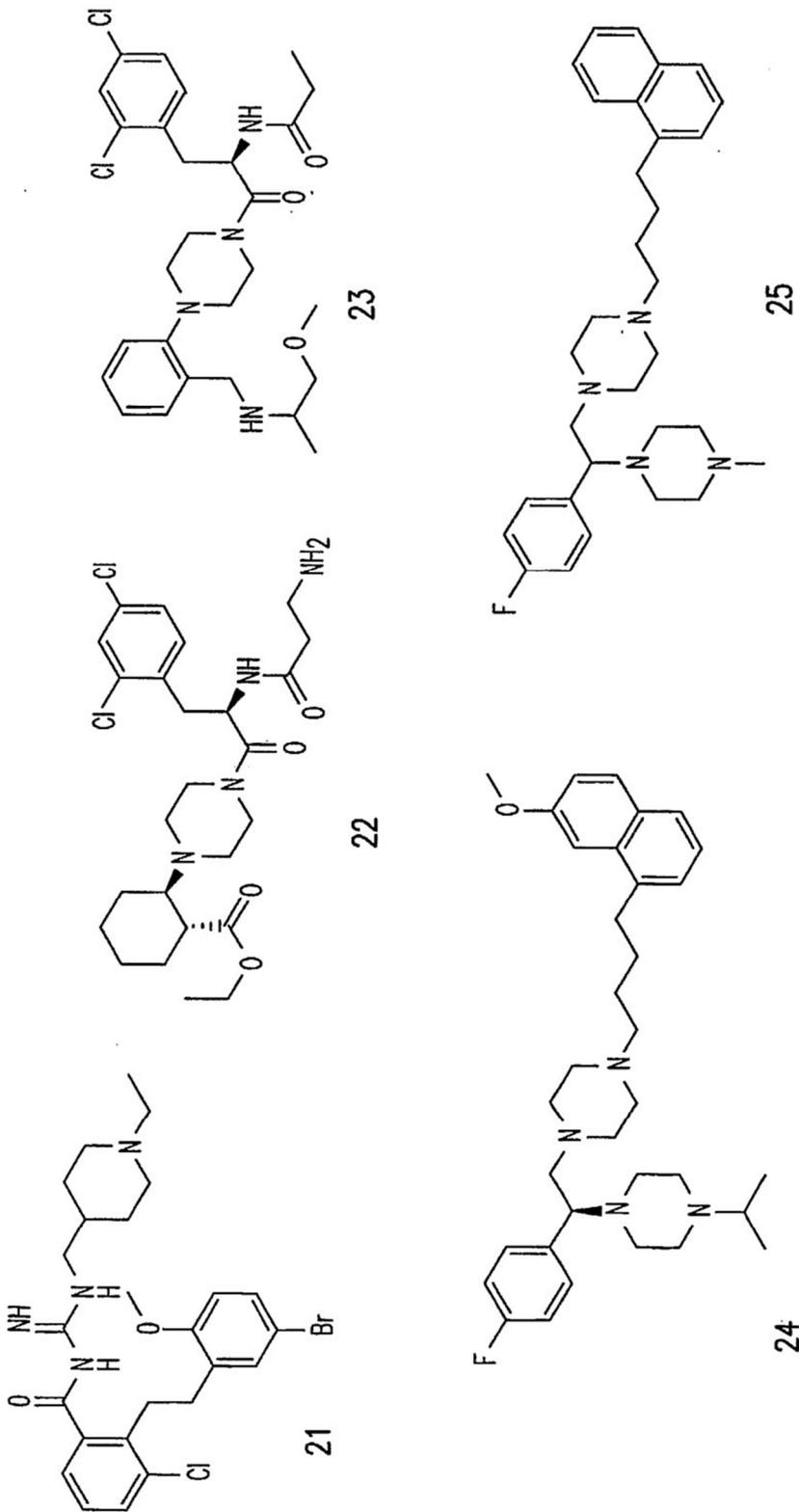


FIG. 10D

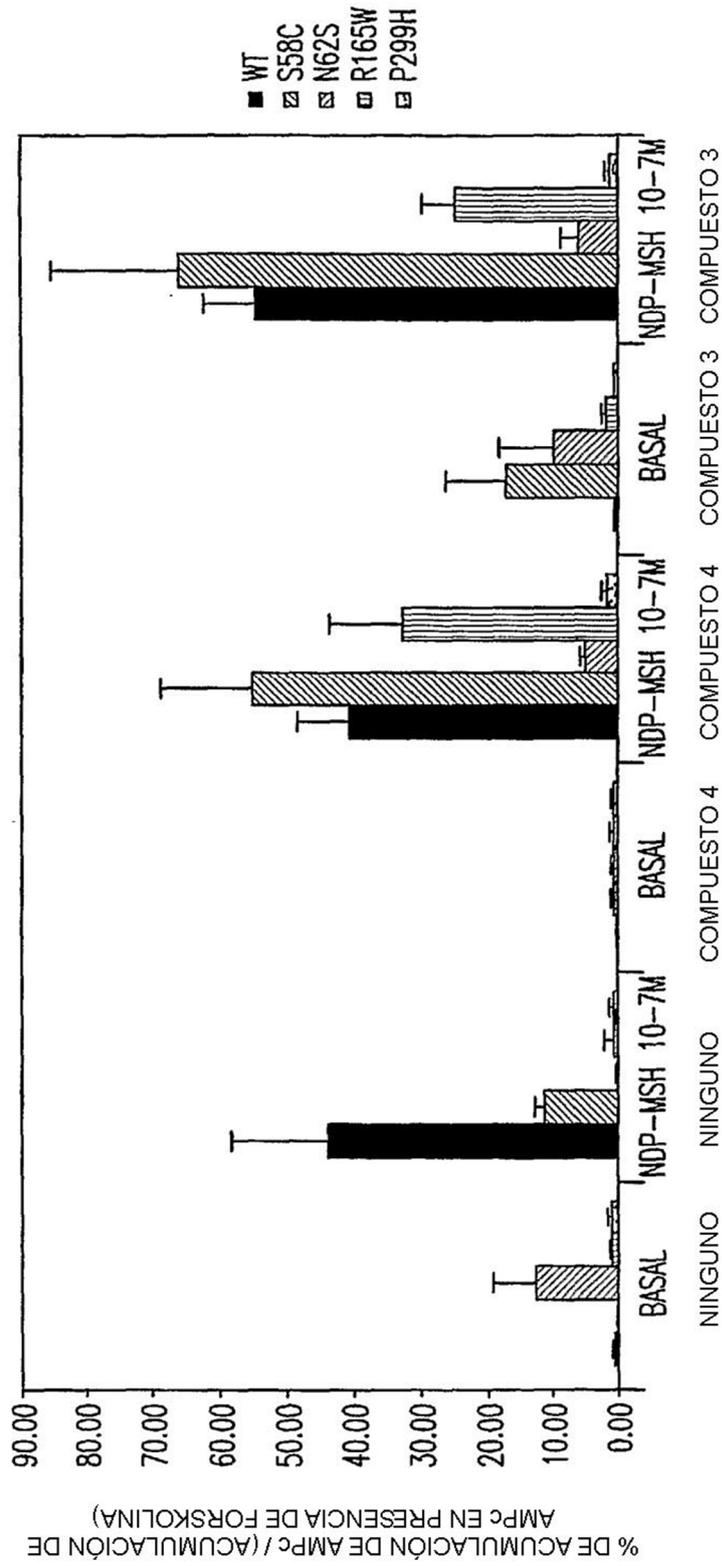
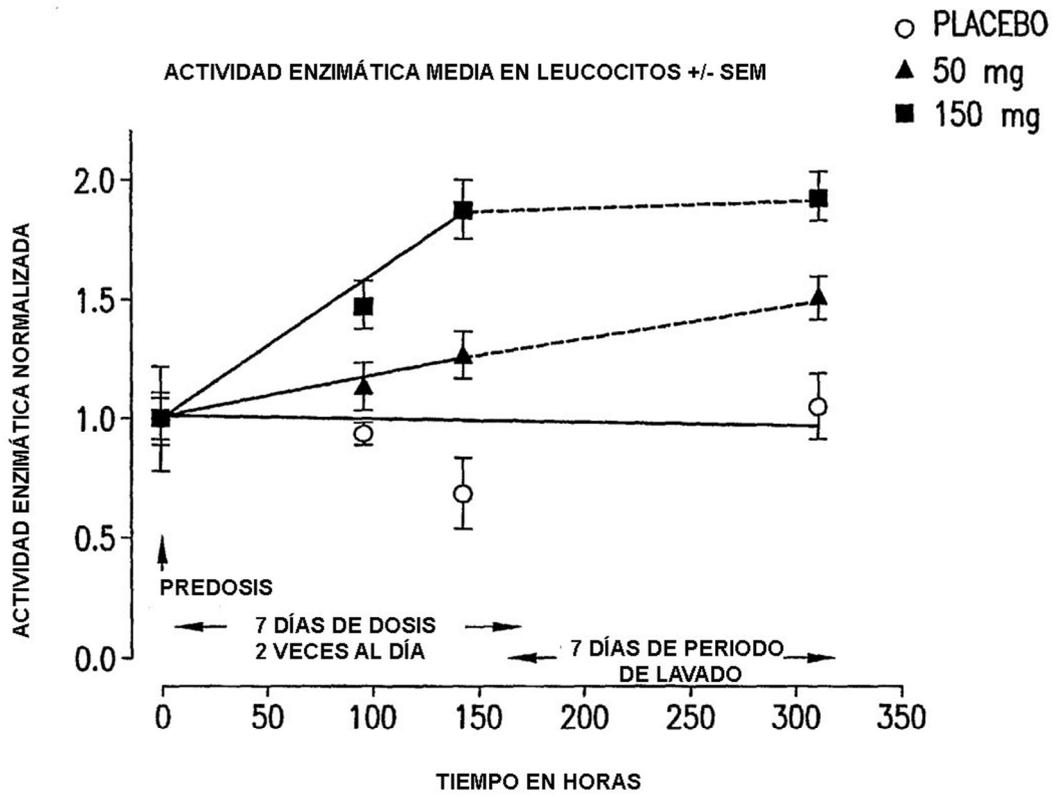


FIG.11



LOS VALORES SE NORMALIZARON A LOS VALORES DE PREDOSIS DE CADA GRUPO  
(N = 6 PARA GRUPOS TRATADOS, N = 4 PARA EL GRUPO DE PLACEBO)

FIG.12

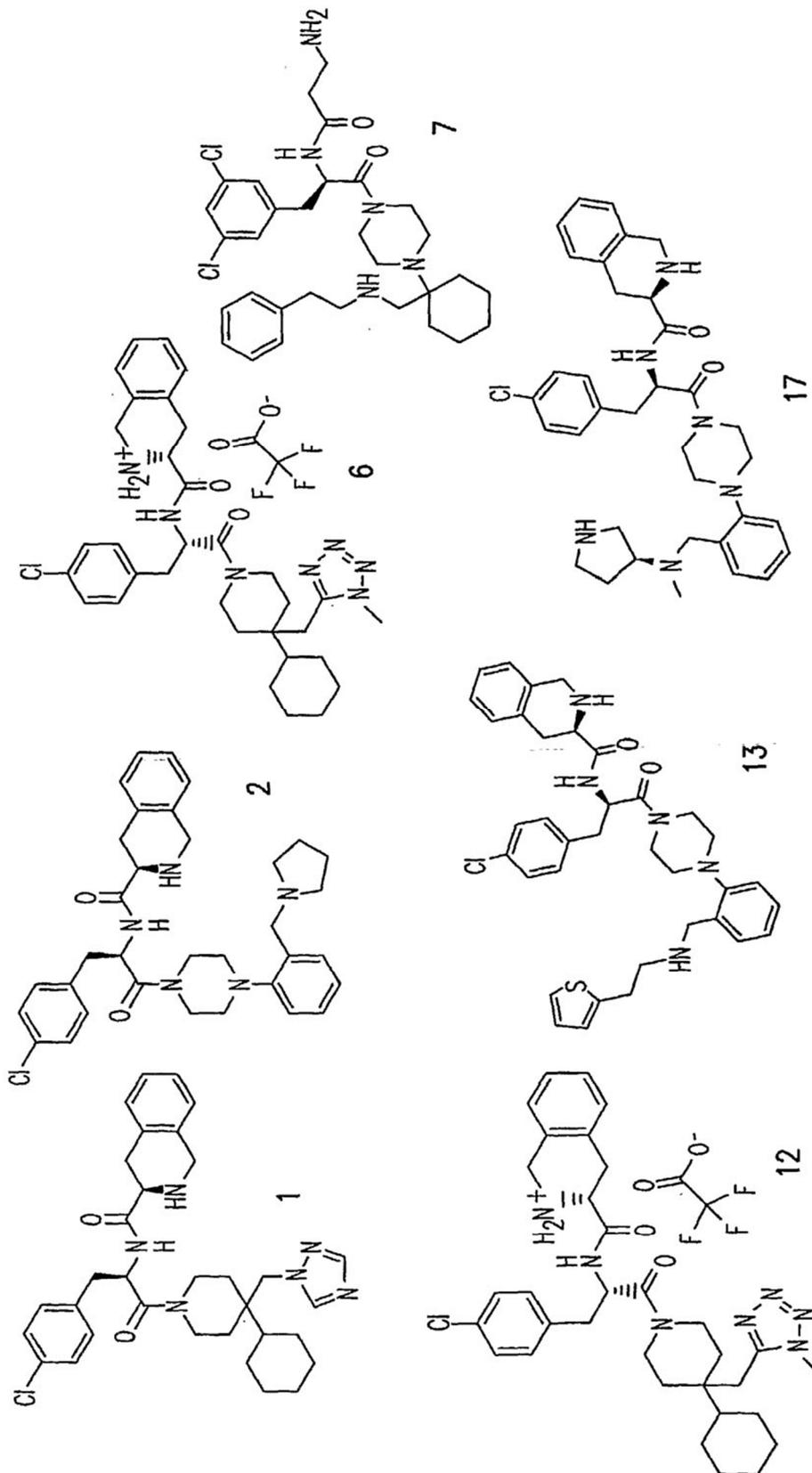
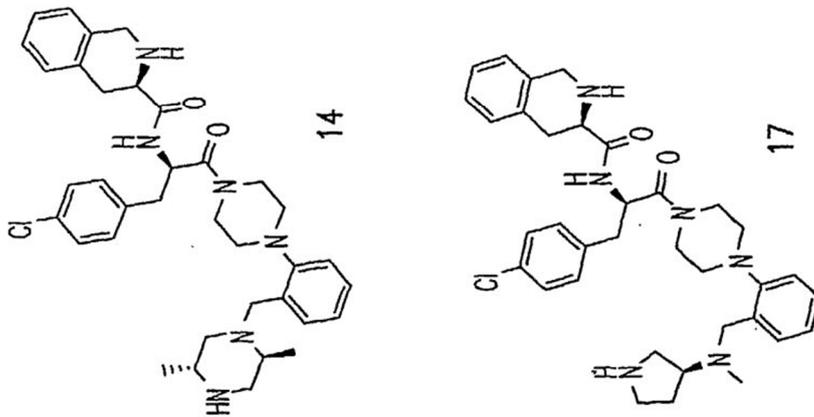
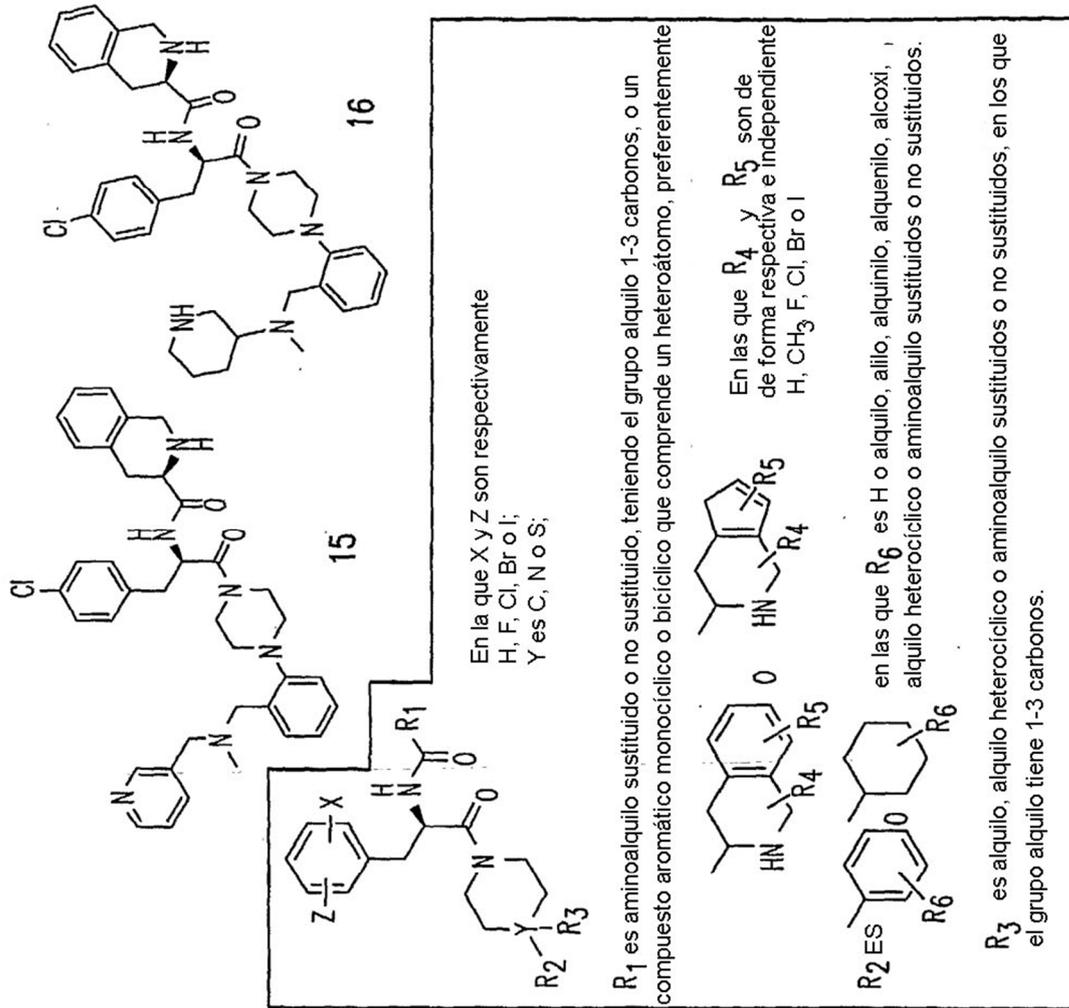
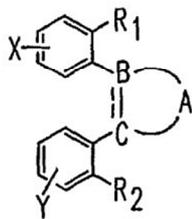
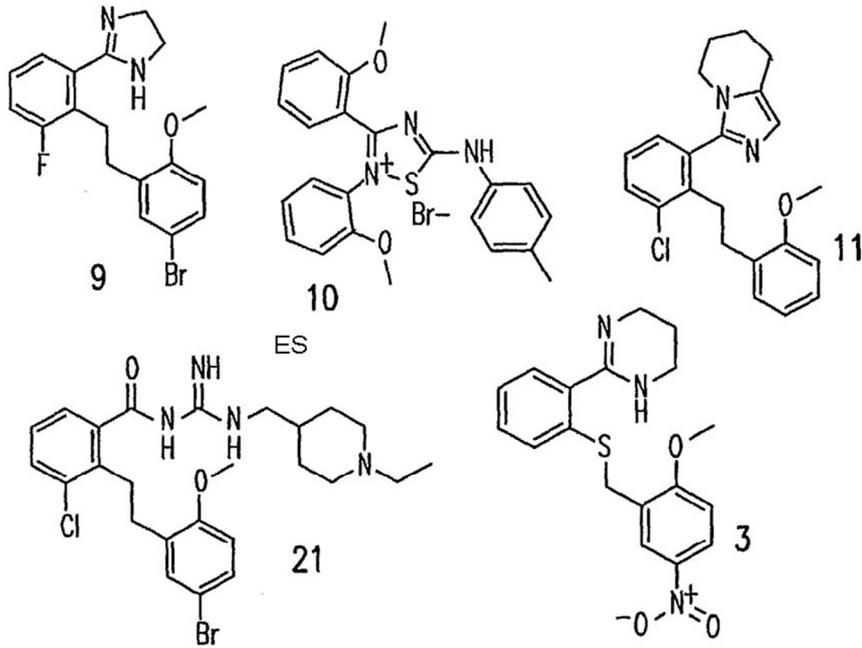


FIG. 13



**FIG. 13 continuación**



en las que X e Y son respectivamente e independientemente H, F, Cl, Br, I o NO<sub>2</sub>;

A es o ningún enlace;

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

R<sub>1</sub> es un heterociclilo, un alcoxi o un carbamoilo sustituido

R<sub>2</sub> es H o -OCH<sub>3</sub>; y

R<sub>3</sub> es amino sustituido

Cuando R<sub>1</sub> es un heterociclilo, el heterociclilo incluye preferentemente

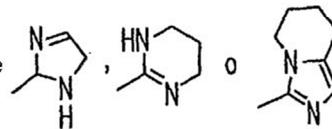


FIG. 14

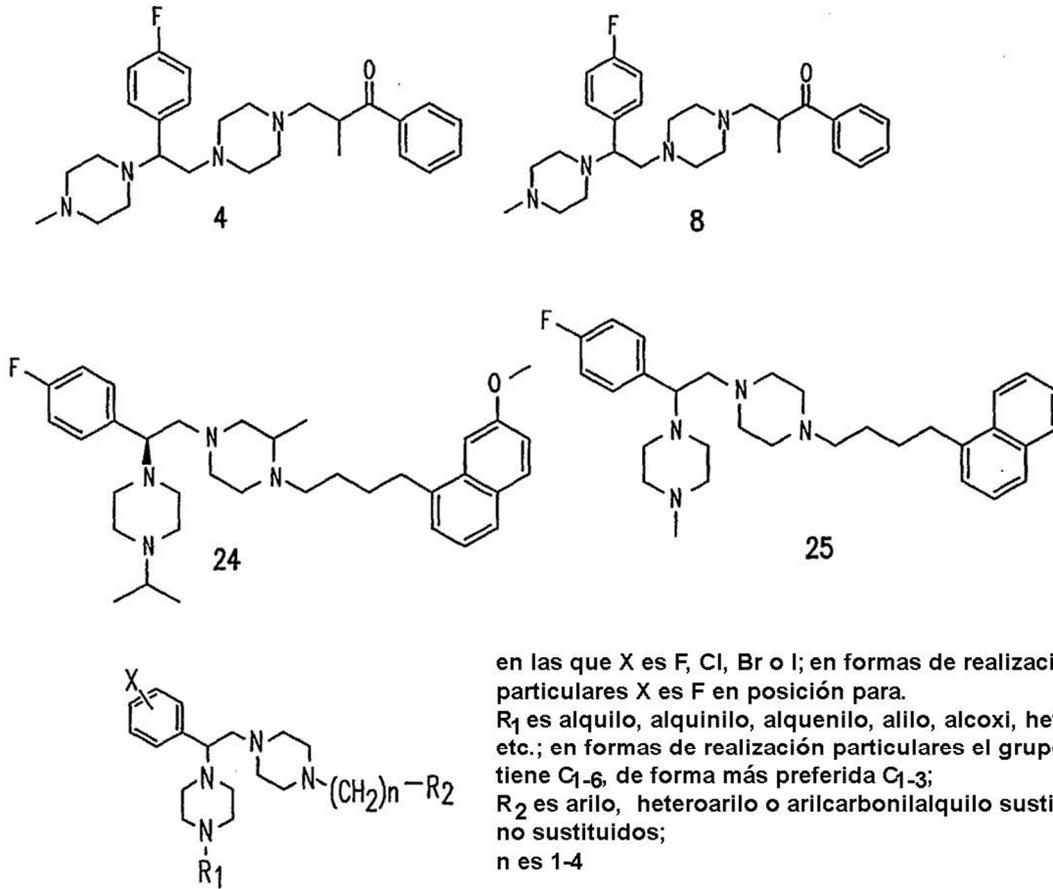
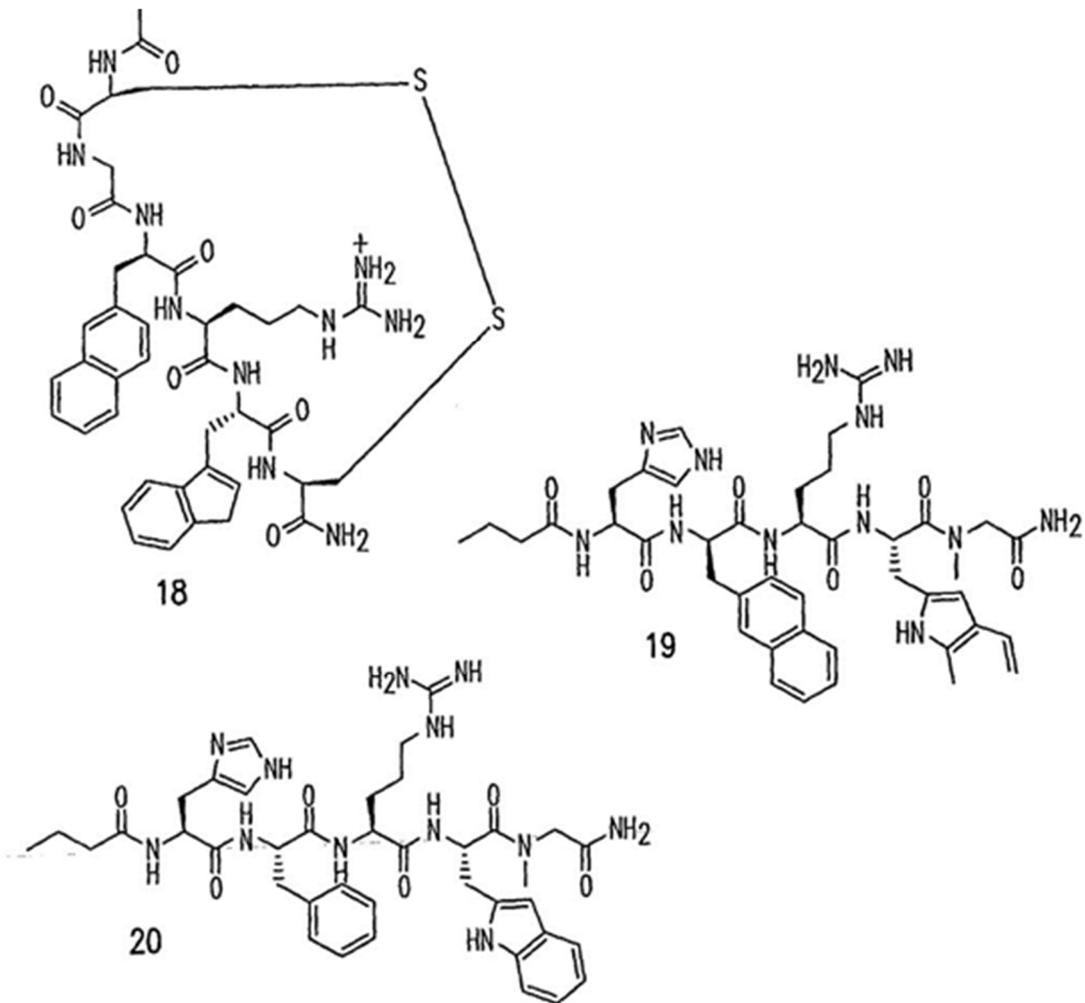
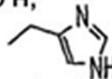


FIG. 15



En las que R<sub>1</sub> es alquilo con C<sub>1-3</sub>;

R<sub>2</sub> es -S- o H;

R<sub>3</sub> es H o 

R<sub>4</sub> es aminoalquilo, teniendo el alquilo C<sub>1-5</sub> en formas de realización particulares guanidinoalquilo teniendo el alquilo C<sub>1-5</sub>, preferentemente C<sub>1-3</sub>;

R<sub>5</sub> es un arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido; y

R<sub>6</sub> es H, CH<sub>3</sub> o alquilo C<sub>1-3</sub>;

R<sub>7</sub> es H o -S-

R<sub>8</sub> es H, CH<sub>3</sub> o alquilo C<sub>1-3</sub>

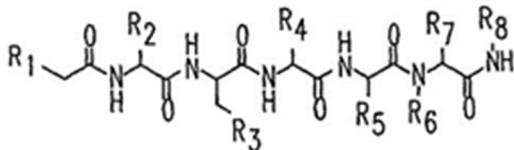


FIG.16