

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 499**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/25 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012** **PCT/IB2012/002867**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13088241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012** **E 12829142 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2790721**

54 Título: **Fragmentos de ghrelina no acilada para usar en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi**

30 Prioridad:

15.12.2011 US 201161576217 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2019

73 Titular/es:

MILLENDO THERAPEUTICS SAS (100.0%)
15, Chemin du Saquin Espace Européen
69130 Ecully, FR

72 Inventor/es:

VAN DER LELY, AART JAN y
ABRIBAT, THIERRY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 705 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de ghrelina no acilada para usar en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi

Campo de la invención

Esta invención se refiere al uso de ghrelina no acilada, sus fragmentos y/o análogos para modular los niveles de ghrelina y/o la relación ghrelina/ghrelina no acilada en un sujeto en el que dicha modulación es beneficiosa para dicho sujeto. La invención se refiere también a la composición que comprende ghrelina no acilada, sus fragmentos y/o análogos que modulan los niveles de ghrelina y/o la relación ghrelina/ghrelina no acilada en un sujeto en el que dicha modulación es beneficiosa para dicho sujeto. La invención se refiere además al uso del nivel de ghrelina y/o la relación ghrelina/ghrelina no acilada como biomarcadores para determinar la probabilidad de que un sujeto responda y/o se beneficie de la administración de ghrelina no acilada.

Fundamento de la invención

La ghrelina (también denominada "ghrelina acilada" o abreviadamente "AG") es un péptido de 28 aminoácidos, purificado e identificado a partir de estómago de rata y caracterizado por la presencia de una modificación de *n*-octanoilo en el residuo Ser3 (Ref. 1). La acilación de la ghrelina es catalizada por la enzima ghrelina-O-acil-transferasa (GOAT). La expresión de GOAT se encuentra principalmente en el estómago y en el intestino. La ghrelina es el ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GH) (GHSR-1a) (Ref. 2,3). La ghrelina es reconocida ahora principalmente como un potente factor orexigénico que estimula la ingesta de alimentos y modula el gasto de energía (Ref. 4, 5 y 6). A nivel periférico, la ghrelina ejerce probablemente su principal acción fisiológica regulando la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Ref. 7). De hecho, la ghrelina tiene una acción diabetogénica (Ref. 8) y suprime la secreción de insulina estimulada por glucosa y deteriora la tolerancia a la glucosa (Ref. 9). Como tal, la ghrelina plasmática elevada es relevante en ciertos trastornos del metabolismo y el crecimiento, tal como en la diabetes y en la obesidad. También se han demostrado niveles elevados de ghrelina en plasma entre adultos y niños con síndrome de Prader-Willi (PWS) (Ref. 10 y 11). El PWS es un síndrome de obesidad genética asociado en la mayoría de los pacientes a deficiencia de la GH. Los niños con PWS presentan un rápido aumento de peso junto con un apetito voraz. Los estudios sobre la participación de ghrelina en el PWS han proporcionado una explicación racional significativa de que la hiperfagia observada en el PWS está correlacionada positivamente con niveles elevados de ghrelina, compatibles con el efecto orexigénico conocido de la ghrelina (Ref. 12).

La ghrelina no acilada (también denominada "des-acil-ghrelina" o abreviadamente "UAG") es la forma no acilada de ghrelina. Su concentración en plasma y tejido es mayor en comparación con la ghrelina. La UAG se ha considerado durante mucho tiempo como un producto sin función fisiológica, puesto que no se une al único receptor conocido de la ghrelina el GHSR-1a en concentraciones fisiológicas y no tiene efecto fisiológico sobre la secreción de la GH (Ref. 15). Sin embargo, la UAG es un péptido biológicamente activo, particularmente a nivel metabólico y se ha demostrado que su administración induce un balance energético negativo disminuyendo la ingesta de alimentos y retrasando el vaciado gástrico (Ref. 16). La sobre-expresión de la UAG en ratones da como resultado una disminución en la acumulación de grasa con un aumento de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa (Ref. 16 y 17).

Se ha demostrado que UAG previene los efectos hiperglucémicos de la ghrelina, cuando se administra de forma concomitante en voluntarios sanos. Véase en particular la Patente de EE.UU. 7.825.090, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad. Esta observación inicial fue seguida por varios informes sobre el potencial anti-diabetogénico de la UAG (Ref. 18, 19, 30, 31 y 32).

In vitro, *in vivo* y la evidencia clínica indican que la UAG previene los efectos diabetogénicos de la ghrelina en voluntarios sanos y en pacientes con deficiencia de GH (Ref. 18 y 19). Inhibe la secreción de glucosa tanto basal como inducida por ghrelina por los hepatocitos humanos (Ref. 31). En ratas, la UAG potencia la respuesta de la insulina portal a la glucosa (Ref. 32) y reduce la deposición de grasa y los niveles de triglicéridos, como se observa en ratones transgénicos que sobre-expresan la UAG (Ref. 16). *In vitro*, la UAG estimula la secreción de insulina por las células de insulinoma (Ref. 32) y promueve la proliferación e inhibe la apoptosis de las células beta (Ref. 33).

Los efectos anti-diabetogénicos y los efectos antagonizantes de la ghrelina de la UAG, sus fragmentos y análogos se han descrito en la Patente de EE.UU. Nº 7.485.620; la Patente de EE.UU. Nº 8.222.217; la Patente de EE.UU. Nº 8.318.664 y en la solicitud de patente WO 2008/145749.

Experimentos recientes en células angiogénicas circulantes (CAC) indican que la UAG afecta de manera beneficiosa al proceso de remodelación vascular que se sabe que está deteriorado en pacientes con diabetes de tipo 2. Los efectos de la UAG sobre las CAC se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. Nº de serie 2010/0016226 y en la solicitud WO 2009/150214.

Se ha informado que los ratones y seres humanos obesos presentan niveles de UAG menores que los sujetos de peso normal, lo que indica que la obesidad podría estar correlacionada con una deficiencia relativa de UAG (Ref. 34,

35 y 21). Se ha observado que los sujetos obesos resistentes a la insulina tienen una relación AG/UAG elevada en comparación con los sujetos obesos sensibles a la insulina (Ref. 20 y 22).

Se han sugerido tratamientos dirigidos a la ghrelina y al GHS-R (es decir, antagonistas de la ghrelina) como vías farmacológicas atractivas para luchar contra la obesidad y otras afecciones, trastornos y enfermedades asociados a la ghrelina. Se han propuesto varios ligandos de GHS-R y vacunas anti-obesidad (Ref. 24). Se han investigado otros enfoques farmacológicos que inducen anticuerpos contra la ghrelina, enantiómeros de ghrelina y la inhibición de la ghrelina-acil-transferasa (GOAT) (Ref. 25); sin embargo, debido a la falta de eficacia, la no selectividad y la falta de pérdida de peso sostenida, estos enfoques farmacológicos aún no han llegado al mercado (Ref. 26).

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de una forma eficaz y más directa de modular los niveles de ghrelina circulante y/o la relación ghrelina/ghrelina circulante en sujetos en los que dicha modulación sea beneficiosa para el sujeto y para formas más eficaces de identificar los sujetos que pueden beneficiarse de la modulación de los niveles de ghrelina y de la relación ghrelina/ghrelina no acilada.

Sumario de la invención

La invención proporciona fragmentos de ghrelina no acilada que consisten en el péptido que se expone en la SEQ ID NO: 6 o en la SEQ ID NO: 25, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi en un sujeto que tenga niveles elevados de ghrelina, particularmente niveles elevados de ghrelina circulante. La invención proporciona en particular fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi en un sujeto que tenga niveles elevados de ghrelina, que comprende administrar una cantidad eficaz de dicho fragmento de ghrelina no acilada y sal desde aproximadamente 0,001 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg.

De acuerdo con la invención, dicho fragmento de ghrelina no acilada y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar por una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, subcutánea, transdérmica, oral, bucal, sublingual, nasal e inhalación.

La invención también proporciona fragmentos de ghrelina no acilada que consisten en el péptido que se expone en la SEQ ID NO: 6 o en la SEQ ID NO: 25, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi en un sujeto que tenga niveles elevados de ghrelina, en el que el paciente fue identificado por:

- determinación de un nivel de ghrelina circulante en el sujeto, y
- procesamiento del nivel de ghrelina circulante, al menos en parte, sobre la base de un nivel de referencia de ghrelina circulante para obtener información que transmita si el nivel de ghrelina circulante es elevado.

Breve descripción de las figuras.

La Figura 1 es una representación esquemática de un protocolo de estudio que implica sujetos con diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM) de acuerdo con una realización de la presente invención. SBM se refiere a la comida de desayuno estándar (SBM son las iniciales de la expresión inglesa *Standard Breakfast Meal*).

Las Figuras 2A y 2B son gráficos que ilustran el efecto de la infusión de UAG en niveles séricos de AG en sujetos con T2DM. En la Figura 2A, los niveles séricos de AG en pg/mL se midieron después de la administración de placebo o UAG antes y una hora después de la SBM. En la Figura 2B, los niveles séricos de UAG en pg/mL se midieron después de la administración de placebo o UAG antes y una hora después de la SBM.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que ilustran los niveles medios de glucosa posprandial en sujetos con T2DM, medidos con un dispositivo de monitorización continua de glucosa (CGMS® iPro™ *Continuous Glucose Recorder*, Medtronic Trading, Países Bajos). La Figura 3A muestra los niveles medios absolutos de glucosa después de la SBM y después de infusiones de placebo 3 mcg de UAG/kg/h y 10 mcg de UAG/kg/h. Mediciones repetidas ANOVA p <0,0001; comparaciones múltiples de Bonferroni con placebo frente a 3 mcg NS; placebo frente 10 mcg p <0,001; 3 mcg frente a 10 mcg p <0,001. La Figura 3B muestra los niveles medios de glucosa t0-t180 para los tres grupos tratados.

Las Figuras 4A y 4B son gráficos que ilustran los niveles medios de glucosa posprandial en sujetos con T2DM. La Figura 4A muestra el cambio en los niveles de glucosa desde la línea base antes de la comida después de infusiones de placebo, 3 mcg de UAG/kg/h y 10 mcg de UAG/kg/h. Mediciones repetidas ANOVA p <0,0001; comparaciones múltiples de Bonferroni con placebo frente 3 mcg p <0,001; placebo frente a 10 mcg p <0,001; 3 mcg frente a 10 mcg p <0,05. La Figura 4B muestra los niveles medios de glucosa t0-t180 para los tres grupos tratados.

Las Figuras 5A y 5B son gráficos que ilustran los niveles máximos de glucosa en plasma después de la SBM en los ocho sujetos del estudio después de infusiones de placebo, 3 mcg de UAG/kg/h y 10 mcg de UAG/kg/h. Prueba de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon; *: 10 mcg frente a placebo, p <0,05.

- Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos que indican la existencia de una correlación entre las concentraciones de AG basal en ayunas y/o UAG y la respuesta glicémica a la administración de UAG. El gráfico en la Figura 6A ilustra la correlación entre los niveles basales de AG en ayunas y el cambio (después de la administración de UAG frente a placebo) en los niveles máximos de glucosa después de la SBM. El gráfico de la Figura 6B ilustra la correlación entre los niveles basales de AG en ayunas y el cambio (después de la administración de UAG frente a placebo) en los niveles de glucosa AUC después de la SBM utilizando mediciones continuas de glucosa por iPro. El gráfico de la Figura 6C ilustra la correlación entre la relación de AG basal en ayunas sobre los niveles de UAG y el cambio (después de la administración de UAG frente a placebo) en los niveles de glucosa AUC después de la SBM utilizando mediciones continuas de glucosa por iPro.
- La Figura 7A es una representación esquemática de un protocolo de un estudio con la pinza hiperinsulinémica-euglicémica en sujetos con T2DM de acuerdo con una realización adicional de la presente invención.
- La Figura 7B es un gráfico que ilustra los efectos de la UAG sobre el índice M, que refleja la sensibilidad a la insulina, durante el protocolo como se esquematiza en la Figura 7A. El cambio en el índice M desde la línea base se midió después de las infusiones de placebo y UAG. *: $p < 0,05$, prueba de Mann Whitney de una cola.
- Las Figuras 7C y 7D son gráficos que ilustran los efectos de un período corto de infusión de UAG sobre los niveles basales de AG en sujetos con T2DM. La Figura 7C muestra los niveles de AG circulante antes de la infusión de UAG y 2,5 horas después de una infusión de UAG. La Figura 7D muestra el cambio de AG desde la línea base después de 2,5 horas de infusión de UAG (nivel de [AG] a las 12:00 – niveles de [AG] a las 9:30). Prueba de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon de dos colas; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.
- La Figura 8 es un gráfico que ilustra los efectos del fragmento de UAG cíclico (6-13) sobre la ingesta de alimento inducida por AG durante el período de estudio indicado. * $p < 0,001$: ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas por la prueba de Dunn.

Descripción detallada

- La presente invención se deriva, aunque sin limitación, de los hallazgos de los inventores de que la administración de UAG disminuye los niveles de AG circulante en sujetos con T2DM. La presente invención se deriva además de los hallazgos de que cuanto más alto es el nivel de AG basal, más importantes son los efectos de la UAG sobre la reducción de los niveles de AG y sobre la reducción de los efectos nocivos asociados a los niveles de AG, tales como por ejemplo, obesidad, hipergliemia, resistencia a la insulina, deposición de grasa, hiperfagia y obesidad asociada a resistencia a la insulina. Los inventores han encontrado también que cuanto mayor es la relación AG/UAG circulante, más eficaz es UAG en disminuir dicha relación y en suprimir los efectos perjudiciales asociados a la relación AG/UAG.
- En vista de esto, el nivel de AG circulante y la relación AG/UAG circulante se pueden usar cada uno como biomarcadores para identificar la probabilidad de un sujeto de responder y/o beneficiarse de la administración de UAG. Por lo tanto, estos biomarcadores se pueden usar para identificar dentro de una población de sujetos que padecen una afección tal como, aunque sin limitación, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome de Prader-Willi, hiperfagia e hiperghrelinemia, cuál de los sujetos es probable que responda y/o se beneficie de la administración de UAG. Cuanto mayores sean los niveles de AG circulante y/o cuanto mayor sea la relación AG/UAG circulante en un sujeto, más probable es que este sujeto responda y/o se beneficie de la administración de UAG.
- Hasta la fecha, los estudios han informado que UAG contrarresta las acciones periféricas de la ghrelina en, por ejemplo, los metabolismos de la glucosa y la insulina. El presente estudio proporciona la primera evidencia de que la administración de UAG también suprime los niveles de ghrelina circulante y proporciona la primera evidencia de la existencia de una correlación entre el nivel de AG circulante y la eficacia de UAG para mejorar los parámetros metabólicos afectados por los niveles de AG y/o por relación AG/UAG.
- Las demostraciones sorprendentes que se presentan en la presente memoria permiten ampliar las aplicaciones y las indicaciones para las cuales se puede usar ghrelina no acilada de modo que incluyan la facilitación, el mejoramiento y/o el tratamiento de las afecciones que resultan de los niveles de AG y/o de la relación AG/UAG. Estas demostraciones también permiten ampliar las aplicaciones y las indicaciones para las cuales se puede usar ghrelina no acilada de modo que incluyan la facilitación, el mejoramiento y/o el tratamiento de afecciones que resultan de niveles elevados de AG y/o una relación AG/UAG elevada.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "nivel(es) de AG elevado(s)" se refiere a un nivel de AG circulante que está por encima del nivel de AG observado en sujetos normales y/o sanos. En algunas implementaciones, la expresión "nivel(es) de AG elevado(s)" se refiere a un nivel de AG circulante en el que aparecen, persisten o empeoran en un sujeto uno o más síntomas fisiológicos perjudiciales asociados a la AG.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "relación AG/UAG elevada" se refiere a una relación AG/UAG circulante que está por encima de la relación AG/UAG observada en sujetos normales y/o sanos. En algunas

implementaciones, la expresión "relación AG/UAG elevada" se refiere a una relación AG/UAG circulante en la cual aparecen o persisten o empeoran en un sujeto uno o más síntomas fisiológicos perjudiciales asociados a la relación AG/UAG.

- 5 Debe entenderse que varios factores pueden afectar a los niveles de ghrelina circulante y ghrelina no acilada en sujetos normales. Los ejemplos de tales factores incluyen, aunque sin limitación, género, edad, condición física, índice de masa corporal (abreviadamente BMI por la expresión inglesa *Body Mass Index*), hábitos alimenticios, etc.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibición de ghrelina" se refiere a un deterioro de la actividad biológica de ghrelina que se produce debido a una disminución en los niveles de ghrelina y/o debido a un deterioro de su actividad biológica.

- 10 Un experto en la técnica estará familiarizado con las técnicas y los ensayos para medir los niveles de AG y UAG en un sujeto. Dichas técnicas pueden incluir métodos que impliquen el uso de inhibidores de proteasa, tales como hidrocloreuro de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBSF) u otro cóctel de inhibidores de proteasa.

- 15 En una implementación de esta realización, un sujeto obeso se caracteriza por tener un peso corporal aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30% o mayor que el peso corporal normal de dicho sujeto. El peso corporal normal se puede determinar por una comparación del peso del sujeto en un momento anterior, como cuando los niveles de AG eran normales y/o cuando la relación AG/UAG era normal, o por comparación de los niveles de AG y/o la relación AG/UAG del sujeto con los valores medios de otros sujetos de similares edad y/o estado.

- 20 En otra implementación de esta realización, un sujeto con sobrepeso se caracteriza por tener un peso corporal aproximadamente 5% mayor a aproximadamente 20% mayor que el peso corporal normal de dicho sujeto. El peso corporal normal se puede determinar por una comparación del peso del sujeto en un momento anterior, como cuando los niveles de AG eran normales y/o cuando la relación AG/UAG era normal, o por una comparación de los niveles de AG y/o la relación AG/UAG con los valores medios de otros sujetos de similares edad y/o estado.

- 25 En otra implementación de esta realización, un sujeto normal se caracteriza por tener un peso corporal aproximadamente 5% mayor a aproximadamente 5% menor que el peso corporal normal para dicho sujeto. El peso corporal normal se puede determinar por una comparación del peso del sujeto en un momento anterior, como cuando los niveles de AG eran normales y/o cuando la relación AG/UAG era normal, o por una comparación de los niveles de AG y/o la relación AG/UAG con los valores medios de otros sujetos de similares edad y/o estado. Un sujeto con peso normal puede tener un BMI en el intervalo aproximado de 19-22.

- 30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

i) Ghrelina no acilada y fragmentos.

Los términos "ghrelina no acilada", "des-acil-ghrelina" y la abreviatura "UAG" pretenden significar péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO: 1 cuya secuencia de aminoácidos es:

Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-

- 35 Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1)

La ghrelina no acilada se puede denominar también UAG (1-28).

- 40 Por "péptido", "polipéptido" o "proteína" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), o modificación química, o los que contienen aminoácidos no naturales o inusuales, como D-Tyr, ornitina, ácido amino-adípico. Los términos se usan indistintamente en la presente solicitud.

Las expresiones "fragmentos" y "sus fragmentos" se refieren a fragmentos de aminoácidos de un péptido, tal como UAG.

- 45 Los fragmentos de UAG son más cortos que la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, por lo tanto, son más cortos que 28 residuos de aminoácidos. Por lo tanto, los fragmentos de UAG pueden tener una longitud de 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, los fragmentos de UAG pueden tener las secuencias de aminoácidos representadas en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1:

Fragmento	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
UAG (1-14)	2	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln
UAG (1-18)	3	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser
UAG (1-5)	4	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu
UAG (17-28)	5	Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg
UAG (6-13)	6	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-13)	7	Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-12)	8	Glu-His-Gln-Arg-Val
UAG (6-18)	9	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser
UAG (8-11)	10	Glu-His-Gln-Arg
UAG (9-12)	11	His-Gln-Arg-Val
UAG (9-11)	29	His-Gln-Arg
UAG (14-1)	30	Gln Gln Val Arg Gln His Glu Pro Ser Leu Phe Ser Ser Gly

Algunos fragmentos de UAG han sido descritos en Patente de EE. UU. N° 8.222.217; la Patente de EE.UU. N° 8.318.664 y en la solicitud de patente WO/2008/145749, en las que se ha demostrado que el fragmento de UAG más pequeño que retiene la actividad biológica de UAG es UAG (9-12) representado en la presente memoria como SEQ ID NO: 11.

En una primera realización de la invención, el fragmento de UAG es UAG (6-13) como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En una realización, los polipéptidos tales como UAG, sus fragmentos o análogos, se usan en una forma que está "purificada", "aislada" o "sustancialmente pura". Los polipéptidos están "purificados", "aislados" o "sustancialmente puros" cuando están separados de los componentes que naturalmente los acompañan. Típicamente, un compuesto es sustancialmente puro cuando constituye al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en peso, del material total en una muestra.

Ciertos péptidos de acuerdo con la presente invención también pueden estar en forma cíclica, de modo que los extremos N- o C- están unidos de cabeza a cola. Dichos derivados peptídicos pueden tener una estabilidad y biodisponibilidad mejoradas en relación con los péptidos no ciclizados.

Los ejemplos de péptidos cíclicos incluyen: UAG cíclico (1-14), UAG cíclico (1-18), UAG cíclico (17-28), UAG cíclico (6-13), UAG cíclico (8-13), UAG cíclico (8-12), UAG cíclico (8-11), UAG cíclico (9-12) y UAG cíclico (9-11).

En otra realización de la invención, el fragmento de UAG es UAG cíclico (6-13), tal como se expone en la SEQ ID NO: 25.

Los métodos para ciclar péptidos son bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, se pueden lograr por formación de enlaces disulfuro entre dos grupos funcionales de cadenas laterales, la formación de enlaces amida o éster entre un grupo funcional de cadena lateral y la función α -amino o carboxilo de la cadena principal, la formación de enlaces amida o éster entre dos grupos funcionales de cadenas laterales, o la formación de enlaces amida entre las funciones α -amino y carboxilo de la cadena principal. Estas reacciones de ciclización se han llevado a cabo tradicionalmente a alta dilución en solución. La ciclización se realiza comúnmente mientras que el péptido está unido a una resina. Una de las formas más comunes de sintetizar péptidos cíclicos sobre un soporte sólido es uniendo la cadena lateral de un aminoácido a la resina. Usando estrategias de protección apropiadas, los extremos C y N se pueden desproteger selectivamente y ciclar en la resina después del ensamblaje de la cadena. Esta estrategia se usa ampliamente y es compatible con los protocolos de *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Sin embargo, está restringida a péptidos que contienen una funcionalidad de cadena lateral apropiada para ser unida al soporte sólido. Se pueden usar varios métodos para lograr una síntesis eficaz de péptidos cíclicos. Un procedimiento para sintetizar péptidos cíclicos se basa en la ciclización con escisión simultánea de la resina. Después de que una secuencia peptídica apropiada se ensambla por síntesis en fase sólida en la resina o se añade una secuencia lineal a la resina, el grupo amino desprotegido puede reaccionar con su enlace activo de anclaje para producir péptidos cíclicos protegidos. En general, se requiere una etapa de desprotección final para producir el péptido cíclico deseado.

La formación de lactama, una forma de ciclización, se puede realizar formando un puente de lactama utilizando la síntesis con Fmoc, se pueden introducir aminoácidos con diferentes grupos protectores en las cadenas laterales, tales como, aunque sin limitación, ácido aspártico (o glutámico) protegido con éster alílico en el beta-éster (o gamma-éster para el ácido glutámico) y lisina protegida con aliloxi-carbamato en el N- ϵ . Al final de la síntesis, con el extremo N del péptido protegido con Fmoc, Boc u otro grupo protector diferente de Alloc, los grupos protectores alilo y Alloc del ácido aspártico y de la lisina se pueden desproteger, por ejemplo, con paladio (0) seguido por ciclización usando PyAOP (7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio-hexafluorofosfato) para producir el puente de lactama.

A menos que se indique lo contrario, un aminoácido mencionado en la presente memoria se refiere a la forma L. Se utilizarán abreviaturas muy reconocidas en la técnica para describir los aminoácidos, incluyendo aminoácidos levógiros (L-aminoácidos o L o forma L) y aminoácidos dextrógiros (D-aminoácidos o D o forma D), alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), ácido glutámico (Glu o E), glutamina (Gln o Q), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). Un residuo de L-aminoácido dentro de la secuencia peptídica natural se puede alterar en cualquiera de los 20 L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas o en cualquiera de los D-aminoácidos correspondientes, aminoácidos raros, tales como, aunque sin limitación, 4-hidroxiprolina o hidroxilisina, o un aminoácido no proteico, tal como P-alanina u homoserina.

Ciertos aspectos de la invención usan polinucleótidos UAG. Estos incluyen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos UAG, sus fragmentos y análogos definidos en la solicitud.

Como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula que comprende una pluralidad de desoxirribonucleótidos o subunidades de nucleósidos. El enlace entre las subunidades de nucleósidos puede ser proporcionar por fosfatos, fosfonatos, fosforamidados, fosforotioatos o similares, o por grupos que no son fosfato, como se conocen en la técnica, tales como enlaces de tipo peptido utilizados en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los grupos enlazadores pueden ser quirales o aquirales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden variar en longitud desde 2 subunidades de nucleósidos hasta cientos o miles de subunidades de nucleósidos. Aunque los oligonucleótidos tienen preferiblemente una longitud de 5 a 100 subunidades, y más preferiblemente una longitud de 5 a 60 subunidades, pudiendo ser la longitud de los polinucleótidos mucho mayor (por ejemplo, hasta 100). El polinucleótido puede ser cualquiera de DNA y RNA. El DNA puede estar en cualquier forma de DNA genómico, una genoteca de DNA genómico, cDNA derivado de una célula o tejido y DNA sintético. Además, la presente invención puede, en ciertos aspectos, usar vectores que incluyen bacteriófagos, plásmidos, cósmidos o fagémidos.

Las expresiones "actividad biológica" o "propiedad biológica", o el término "actividad" con referencia a los polipéptidos de la presente invención, se usan de manera intercambiable en la presente memoria y se refieren a las capacidades farmacológicas, biológicas o celulares de los polipéptidos de la invención e incluyen, aunque sin limitación, la capacidad de reemplazar UAG en las funciones biológicas de UAG como se describe en la presente solicitud, tales como, aunque sin limitación, modular AG; inhibir AG; disminuir los niveles de AG circulante; disminuir los niveles elevados de AG circulante; disminuir la relación AG/UAG circulante; disminuir la relación AG/UAG circulante elevada; mejorar los síntomas inducidos por los niveles de AG y/o los niveles de AG/UAG; facilitar, prevenir y/o tratar afecciones asociadas a AG circulante y/o a la relación AG/UAG circulante, y facilitar, prevenir y/o tratar afecciones asociadas a AG circulante elevada y/o a la relación AG/UAG circulante elevada.

Se ha descrito previamente que las acciones de UAG son conservadas por los fragmentos UAG (6-13) (SEQ ID NO: 6), UAG (8-13) (SEQ ID NO: 7), UAG (8-12) (SEQ ID NO: 8), UAG (8-11) (SEQ ID NO: 12), UAG (9-12) (SEQ ID NO: 13).

11) y UAG (9-11) (SEQ ID NO: 29). Las patentes de EE.UU. Nº 8.222.217 y 8.318.664, han descrito que estos fragmentos conservan la actividad de UAG de longitud completa sobre los metabolismos de glucosa, insulina y lípidos. Un péptido con la secuencia inversa de UAG (1-14) (SEQ ID NO: 3) y denominado UAG (14-1) (SEQ ID NO: 30) se usó como control negativo en los experimentos que analizaron fragmentos de UAG. La UAG (8-11) (SEQ ID NO: 10) demostró que era el fragmento más pequeño de UAG que retenía las actividades de UAG. Los resultados proporcionados en la presente memoria indican además que los fragmentos de UAG, UAG (6-13) (SEQ ID NO: 6) y UAG cíclico (6-13) (SEQ ID NO: 25) retienen la capacidad de UAG de disminuir los niveles de AG y disminuir la relación AG/UAG.

La UAG, sus fragmentos y/o análogos se utilizan para reducir los niveles elevados de AG asociados al síndrome de Prader-Willi (PWS). Las personas que padecen el PWS muestran un desarrollo lento, obesidad severa y un apetito insaciable. Su hambre es tan fuerte que requiere frecuentemente el control de la disponibilidad de los alimentos para evitar la muerte prematura como resultado de la hiperfagia. Las concentraciones de AG en estos sujetos son mayores que las normales. Esta correlación entre hiperfagia y aumento en los niveles de AG es consistente con el efecto orexigénico conocido de la AG. Los datos presentes en esta memoria demuestran que la administración de UAG puede disminuir los niveles elevados de AG en sujetos con el PWS. Los fragmentos de UAG de la invención se pueden usar para ayudar a los pacientes con síndrome de Prader-Willi a reducir sus niveles de ghrelina hasta niveles más normales/saludables, refrenar su apetito y/o mejorar otras manifestaciones de este trastorno. Se espera que esta disminución de la AG se traduzca en una disminución del apetito y en una reducción subsiguiente en la masa grasa asociada al PWS.

Como se usa en la presente memoria, el término "hiperfagia" se refiere al hambre excesiva y a la ingesta anormalmente grande de sólidos por vía oral. Las afecciones hiperfágicas pueden ocurrir en asociación con, por ejemplo, trastornos del sistema nervioso central (SNC) que incluyen gangliocitoma del tercer ventrículo, astrocitoma hipotalámico, síndrome de Kleine-Levin, síndrome de Froehlich, enfermedad de Parkinson, trastornos genéticos incluyendo el síndrome de Prader-Willi, trastornos psiquiátricos importantes, incluyendo ansiedad, trastorno depresivo importante, fase depresiva del trastorno bipolar, trastorno afectivo estacional y esquizofrenia, medicación psicotrópica, incluyendo delta-9 tetrahidrocanabinol, antidepresivos y neurolépticos y trastornos del sueño, incluyendo la apnea del sueño. La hiperfagia puede ocurrir en trastornos psiquiátricos tales como depresión, ansiedad y esquizofrenia.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere tanto a tratamientos terapéuticos, así como a medidas profilácticas. Los que necesitan tratamiento incluyen quienes ya tienen el trastorno, enfermedad o afección, así como quienes en los que se ha de prevenir la enfermedad, trastorno o la afección. Quienes necesitan tratamiento también son en los que se ha producido el trastorno, enfermedad o afección y les han dejado secuelas o cicatrices. El tratamiento también se refiere a la administración de una sustancia terapéutica eficaz para mejorar o disminuir los síntomas asociados a una enfermedad, un trastorno o una afección para disminuir la gravedad o curar la enfermedad, trastorno o afección o para prevenir que vuelva a ocurrir o recaer en la enfermedad, trastorno o afección.

Los estudios han demostrado un aumento persistente en los niveles de AG en plasma hasta un año después de una pérdida de peso inducida por la dieta en sujetos obesos (Ref. 28 y 29). La reducción de los niveles elevados de AG en estos sujetos podría por tanto prevenir la recaída en la obesidad mientras el sujeto está bajo dieta.

Para usos terapéuticos y/o farmacéuticos, los polipéptidos como se definen en la presente memoria se pueden formular, aunque sin limitación, para administración intravenosa, subcutánea, transdérmica, tópica, oral, bucal, sublingual, nasal, por inhalación, pulmonar o parenteral de acuerdo con métodos convencionales. La inyección intravenosa puede ser por bolo o infusión durante un período de tiempo convencional. Los polipéptidos como se definen en la presente memoria se pueden administrar también directamente a un sitio diana dentro de un sujeto, por ejemplo, por suministro biolístico a un sitio diana interno o externo o por catéter a un sitio en una arteria.

En una realización, los polipéptidos definidos en la presente memoria se administran en forma de un bolo. Por consiguiente, en una implementación de esta realización, el medicamento se administra en forma de un bolo antes de la comida, en el que el bolo comprende una cantidad eficaz de UAG, uno de sus fragmentos y/o análogos de una de sus sales. El bolo se puede administrar una, dos, tres veces o más al día o se puede administrar de acuerdo con otros regímenes de dosificación.

Los regímenes de dosificación adecuados se determinan teniendo en cuenta factores muy conocidos en la técnica, tales como, aunque sin limitación, el tipo de sujeto que se dosifica, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto, la vía de administración, el efecto deseado, etc.

Los ingredientes activos, tales como los polipéptidos definidos en la presente memoria, se pueden administrar por vía oral en forma de una suspensión y se pueden preparar de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener, aunque sin limitación, celulosa microcristalina para impartir voluminosidad, ácido alginico o alginato de sodio como agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad y edulcorantes/agentes aromatizantes. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones

pueden contener, aunque sin limitación, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, extendedores, disgregantes, diluyentes y lubricantes. Los ingredientes activos se pueden administrar por medio de un sistema de liberación controlada.

- 5 Las formulaciones administradas por aerosol nasal o inhalación se pueden preparar, por ejemplo, en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, empleando fluorocarbonos y/o empleando otros agentes solubilizantes o dispersantes.

- 10 Los polipéptidos de la invención se pueden administrar por vía intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión o intramuscular. Cuando se administran por inyección, la solución o suspensión inyectable se puede formular utilizando diluyentes o disolventes adecuados, no tóxicos y aceptables para la vía parenteral, muy conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de la invención se pueden formular también para administración tópica. El término "tópica", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier vía de administración que permita que los compuestos recubran la piel o los tejidos de la mucosa.

- 15 La formulación adecuada para la aplicación tópica puede estar en forma de, por ejemplo, crema, loción, solución, gel, pomada, pasta, apósito, pintura, bioadhesivo o similares, y/o se puede preparar para que contenga liposomas, micelas, micropartículas y/o microesferas. La formulación puede ser acuosa, es decir, puede contener agua, o puede ser no acuosa y, opcionalmente, ser usada en combinación con una sobre-capa oclusiva para que la humedad que se evapora de la superficie del cuerpo se mantenga dentro de la formulación después de la aplicación a la superficie del cuerpo y posteriormente.

Las pomadas, como es bien conocido en la técnica de la formulación farmacéutica, son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo.

- 25 Las formulaciones se pueden preparar también con liposomas, micelas, micropartículas y/o microesferas. Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica, y se pueden usar como sistemas de administración de fármacos. En la técnica es conocido que las micelas comprenden moléculas de tensioactivo dispuestas de modo que sus grupos de cabeza polar forman una envoltura esférica externa, mientras que las cadenas de hidrocarburos hidrófobas están orientadas hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micropartículas son sistemas portadores de partículas en el intervalo de tamaño del micrómetro, normalmente preparadas con polímeros, que se pueden usar como sistemas de administración de fármacos o vacunas que generalmente están atrapadas dentro de las partículas. Las microesferas, similarmente, se pueden incorporar en las presentes formulaciones y sistemas de administración de fármacos. Al igual que los liposomas y las micelas, las microesferas encapsulan esencialmente un fármaco o una formulación que contiene un fármaco. Las microesferas se forman generalmente, aunque no necesariamente, a partir de polímeros biocompatibles sintéticos o naturales, pero pueden estar compuestas también por lípidos cargados, tales como fosfolípidos.

Las preparaciones de formulaciones adecuadas para administración tópica son muy conocidas en la técnica y están descritas en los textos y la bibliografía pertinentes.

- 40 En general, las composiciones farmacéuticas comprenderán al menos uno de los polipéptidos de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable que será muy conocido por los expertos en la técnica. Las composiciones pueden comprender, además, por ejemplo, uno o más excipientes, diluyentes, cargas, solubilizantes, conservantes, vehículos, sales, agentes tamponantes y otros materiales adecuados muy conocidos en la técnica, dependiendo de la forma de dosificación utilizada. Los métodos de composición son muy conocidos en la técnica.

- 45 En el presente contexto, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende indicar cualquier material, que sea inerte en el sentido de que sustancialmente no tiene ningún efecto terapéutico y/o profiláctico *per se* y que no sea tóxico. Se puede añadir un vehículo farmacéuticamente aceptable a los polipéptidos de la invención con el fin de hacer posible obtener una composición farmacéutica, que tenga propiedades técnicas aceptables. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como seroalbúmina humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa y PEG.

Los vehículos para formas tópicas o basadas en gel de polipéptidos incluyen polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa sódicas, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, PEG y alcoholes de madera y cera.

- 55 Los polipéptidos utilizados para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se puede lograr por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. Los polipéptidos se

almacenarán normalmente en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de polipéptidos terapéuticos generalmente se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial para solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Los fragmentos de UAG de la invención se pueden usar en un artículo de fabricación o en un paquete o kit comercial, que comprende: un envase, una etiqueta en el envase y una composición que comprende polipéptidos de la invención como agentes activos dentro del envase cuando se utilizan en el nivel indicado, en el que la composición es eficaz para, entre otras cosas, modular la AG; inhibir la AG; disminuir los niveles de AG circulante; disminuir los niveles elevados de AG circulante; disminuir la relación AG/UAG circulante; disminuir la relación AG/UAG elevada circulante; mejorar los síntomas inducidos por los niveles de AG y/o los niveles de AG/UAG; facilitar, prevenir y/o tratar afecciones asociadas a la AG circulante y/o a la relación AG/UAG circulante y/o facilitar, prevenir y/o tratar afecciones asociadas con la AG circulante y/o la relación AG/UAG circulante elevada.

Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos indicados en la presente memoria puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como para modular la AG; inhibir la AG; disminuir los niveles de AG circulante; disminuir los niveles elevados de AG circulante; disminuir la relación AG/UAG circulante; disminuir la relación elevada AG/UAG circulante; mejorar los síntomas inducidos por los niveles de AG y/o los niveles de AG/UAG; facilitar, prevenir y/o tratar estados asociados a la AG circulante y/o relación AG/UAG circulante y/o facilitar, prevenir y/o tratar estados asociados a la AG circulante elevada y/o la relación AG/UAG circulante elevada. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede determinar como se describe anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz. Para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de los péptidos de la invención (también denominados en la presente memoria "compuestos activos") es una cantidad suficiente para modular AG; inhibir AG; disminuir los niveles de AG circulante; disminuir los niveles elevados de AG circulante; disminuir la relación AG/UAG circulante; disminuir la relación AG/UAG elevada circulante; mejorar los síntomas inducidos por los niveles de AG y/o los niveles de AG/UAG; facilitar, prevenir y/o tratar estados asociados a la AG circulante y/o a la relación AG/UAG circulante y/o facilitar, prevenir y/o tratar estados asociados a la AG circulante elevada y/o a la relación AG/UAG circulante elevada. Los métodos y/o ensayos para medir tales parámetros son conocidos por los expertos en la técnica.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la invención variará generalmente desde aproximadamente 0,001 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, más particularmente desde aproximadamente 0,01 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, e incluso más particularmente desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg. Las cantidades terapéuticamente eficaces o las dosis eficaces que están fuera de este intervalo, pero que tienen el efecto terapéutico deseado también están incluidas en la presente invención.

En una realización, el sujeto citado anteriormente es un mamífero, en un aspecto adicional, un ser humano.

En una realización adicional, los presentes polipéptidos se pueden administrar en combinación con sustancias farmacológicamente activas adicionales o se pueden administrar en combinación con otro método terapéutico. La combinación puede estar en forma de un sistema de kit en partes, en el que las sustancias activas combinadas se pueden usar para administración simultánea, secuencial o separada.

iii) Niveles de AG y relación AG/UAG como biomarcadores.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso de niveles de AG circulante y al uso de la relación AG/UAG circulante como biomarcadores para la identificación de sujetos que padecen el síndrome de Prader- Willi que probablemente respondan y/o se beneficien de un tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de UAG, uno de sus fragmentos y/o uno de sus análogos.

En una implementación de esta realización se miden los niveles de AG circulante y/o la relación AG/UAG circulante en una muestra de sangre obtenida de un sujeto de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. El nivel de AG circulante y/o la relación AG/UAG circulante se procesan luego en parte en función de los niveles de AG circulante de referencia y las relaciones AG/UAG circulante de referencia (derivados, por ejemplo, del propio sujeto o de una población de sujetos de control) de modo que se obtenga información que transmita si el sujeto tiene un nivel anormal de AG circulante (es decir, por debajo o por encima de un nivel normal o saludable) y/o una relación

anormal de AG/UAG circulante (es decir, por debajo o por encima de una relación normal o saludable). Una información que transmite que el sujeto tiene un nivel de AG circulante elevado y/o una relación AG/UAG circulante elevada indica que es probable que el sujeto responda a la administración de UAG, uno de sus fragmentos o uno de sus análogos. Por lo tanto, es probable que la administración de UAG, uno de sus fragmentos o uno de sus análogos a dicho sujeto disminuya los niveles de AG circulante y/o la relación AG/UAG circulante, así como que disminuya los efectos asociados a niveles de AG circulante elevados y la relación AG/UAG circulante elevada.

En otra implementación de esta realización, los biomarcadores se pueden usar para identificar sujetos en una población de sujetos que respondan y/o se beneficien probablemente de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento de UAG. En esta implementación, los sujetos de la población padecen el síndrome de Prader-Willi (PWS).

Experimentos y análisis de los datos

Los datos facilitados en la presente memoria informan de un fuerte efecto supresor de la UAG en los niveles de AG en suero y en la relación AG/UAG en suero en sujetos con T2DM.

Se realizó una infusión continua durante una noche (15 horas) de dos dosis de UAG (3 µg de UAG/kg/h y 10 µg de UAG/kg/h) frente a placebo en un modelo cruzado sobre las concentraciones de AG en ocho sujetos con sobrepeso con diabetes de tipo 2. La Figura 1 muestra una representación esquemática del protocolo de estudio. Se evaluaron las respuestas de glucosa e insulina en una comida de desayuno estándar (SBM) en los sujetos y un control metabólico razonable. Durante las infusiones de UAG, los sujetos no informaron de más efectos secundarios que con el placebo. Las evaluaciones de laboratorio no mostraron cambios significativos en la química ni en los parámetros y los efectos secundarios no fueron dependientes de la dosis.

La infusión de UAG disminuye los niveles de AG en plasma.

Los datos presentes en las Figuras 2A y 2B muestran los cambios en los niveles de AG en suero (Figura 2A) y los niveles de UAG (Figura 2B) antes y después de la SBM. Antes del comienzo de la SBM, los niveles de AG disminuyeron significativamente desde $21,01 \pm 8,9$ pg/mL (media \pm SD) durante la infusión del placebo hasta $3,0 \pm 6,7$ pg/mL en presencia de 3 mcg de infusión de UAG/kg.h y hasta $1,4 \pm 3,2$ pg/mL en presencia de 10 mcg de infusión de UAG/kg.h. Los niveles de AG disminuyeron también después de la SBM desde $14,03 \pm 9,4$ pg/mL con placebo hasta $0,8 \pm 1,8$ pg/mL en presencia de 3 mcg de infusión de UAG/kg.h y hasta $0,8 \pm 1,8$ pg/mL en presencia de 10 mcg de infusión de UAG/kg.h (Figura 2A). En paralelo, una infusión durante una noche de UAG dio como resultado un aumento de los niveles de UAG (Figura 2B). Los niveles de UAG aumentaron desde $105,9 \pm 31,4$ (media \pm SD) pg/mL con infusión del placebo y antes del comienzo de la SBM hasta 10998 ± 2623 pg/mL en presencia de 3 mcg de infusión de UAG/kg.h y hasta 12085 ± 1616 pg/mL en presencia de 10 mcg de infusión de UAG/kg.h. Estos resultados indican que la administración de UAG reduce los niveles de AG en suero en sujetos con T2DM.

La infusión de un fragmento de UAG contrarresta la ingesta de alimentos inducida por AG

Un fragmento ciclizado de UAG, concretamente UAG cíclico (6-13) como se muestra en la SEQ ID NO: 25, fue capaz de contrarrestar los efectos orexigénicos inducidos por AG en ratas (Figura 8). Estos resultados demuestran que los fragmentos de UAG, tal como se definen en la presente memoria, que retienen la secuencia del núcleo responsable de las acciones/actividades relacionadas con UAG también retienen sus efectos sobre los niveles de AG. Como se explicó anteriormente, existe un beneficio de inhibir el efecto de AG o sus niveles (por ejemplo, disminución del consumo de alimentos) en ciertos sujetos. Estos resultados demuestran un papel beneficioso para la UAG en el tratamiento de pacientes con síndrome de Prader-Willi, en quienes los niveles elevados de AG están asociados a hiperfagia. Por lo tanto, la inhibición de los niveles de AG y/o los efectos biológicos debe dar como resultado una disminución del apetito y/o el consumo de alimentos.

La infusión de UAG disminuye los niveles de glucosa en plasma posprandial

Una infusión durante una noche de UAG deprimió significativamente los niveles de glucosa posprandial según lo evaluado por la monitorización continua de glucosa por iPro (Figuras 3A y 3B). El área bajo las curvas disminuyó desde 1618 mmol/3 horas para la infusión de placebo hasta 1601 mmol/3 horas y 1540 mmol/3 horas para las infusiones de 3 y 10 mcg de UAG, respectivamente. Las Figuras 4A y 4B representan los resultados obtenidos como cambios a partir de la línea base de glucosa pre-SBM. El área bajo las curvas disminuyó para las dosis de las infusiones de 3 y 10 mcg de UAG en comparación con el placebo. Las Figuras 5A y 5B indican una disminución en el pico de glucosa en plasma después de la SBM cuando se administra UAG. Se puede observar una disminución global de los picos de glucosa en plasma posprandial en los sujetos (Figura 5B). En general, estos datos indican que la administración de UAG disminuye los niveles de glucosa en plasma posprandial en sujetos con T2DM.

La reducción inducida por UAG de los niveles de AG y la relación AG/UAG en plasma se correlaciona con la reducción de los niveles de glucosa.

Los inventores pudieron demostrar la existencia de una correlación entre los niveles de AG y/o los niveles de UAG en ayunas y la respuesta glicémica después de la administración de UAG utilizando un ensayo estándar de glucoquinasa. Además de demostrar dicha correlación, la Figura 6A muestra que cuanto más elevados son los niveles de AG en ayunas, mejor es el efecto hipoglucémico de la administración de UAG. La Figura 6B también muestra la misma correlación y efecto utilizando las mediciones continuas de glucosa por iPro. La relación AG/UAG en ayunas también se correlaciona con la respuesta glicémica después de la administración de UAG (Figura 6C). Las relaciones AG/AUG más altas se correlacionan con el mejor efecto hipoglucémico de la infusión de UAG utilizando mediciones continuas de glucosa por iPro.

La infusión de UAG mejora la sensibilidad a la insulina.

La sensibilidad a la insulina en sujetos con T2DM se evaluó usando el protocolo de la pinza hiperinsulinémica-euglicémica como se muestra en la Figura 7A. En los pacientes que recibieron una pinza de insulina euglicémica eficaz al comienzo de una infusión de placebo/UAG de 2,5 horas, el cambio del índice M desde la línea base aumentó en 36% en el grupo de UAG frente al grupo de placebo ($p = 0,02$) (Figura 7B). Estos resultados demuestran que la infusión de UAG mejora la resistencia (sic) a la insulina en sujetos con T2DM.

Una infusión de UAG más corta es suficiente para disminuir los niveles de AG en plasma

Los niveles de AG se midieron en sujetos con T2DM antes de la infusión de UAG y después de una infusión de UAG de 2,5 horas de duración. Los datos presentados en la Figura 7C muestran que el período de infusión de UAG acortado fue suficiente para disminuir los niveles de AG en plasma. La Figura 7D indica los cambios en los niveles de AG desde la línea base demostrando que un período de infusión de UAG corto es suficiente para disminuir los niveles de AG en plasma.

Estos datos demuestran, entre otras cosas, que la administración de UAG mejora los niveles de glucosa durante una SBM por una reducción de AG. También se observó una disminución significativa en los niveles máximos de glucosa después de las comidas. No se observaron cambios significativos en los niveles de insulina sérica durante la infusión de dosis bajas y altas de infusiones de UAG (datos no mostrados), lo que indica que el control glicémico mejorado se correlaciona con una sensibilidad mejorada a la insulina. Los datos también muestran que la administración de UAG mejora la hiperglicemia de una manera dependiente de la concentración de ghrelina, lo que hace que los efectos de la hipoglicemia de la UAG sean más fuertes a mayores niveles de AG o a una mayor relación AG/UAG.

Estos resultados son la primera indicación de que la UAG es un potente inhibidor de los niveles de ghrelina, lo que hace de UAG un fuerte candidato para el desarrollo de un inhibidor de ghrelina en el tratamiento de trastornos metabólicos.

Materiales y protocolos técnicos

Diseño del estudio - Estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, iniciado por el investigador, en un solo centro. Durante la primera visita se comprobó el historial médico, el uso de medicación y los signos vitales de los sujetos. También se tomaron muestras de sangre para análisis químico y hematológico. El estudio consistió en tres rondas de hospitalización (visitas 2, 3 y 4) de dos días cada una.

El primer día comenzó aproximadamente a las 15:00 y continuó hasta las 14:00 del día siguiente. Los ocho sujetos fueron divididos para el estudio en 3 grupos. Las dosificaciones utilizadas durante estas rondas fueron 3 mcg de UAG/kg.h, 10 mcg de UAG/kg.h o solución de placebo/solución salina preparadas por la farmacia del hospital y entregada en 3 bolsas para cada sujeto. Ni los sujetos ni los investigadores conocían el medicamento administrado en estas rondas. Se realizó entre los períodos de tratamiento un período de lavado de una semana.

Antes, durante y después del estudio se tomaron muestras de sangre para determinar AG, UAG, química, hematología y células CAC. Se tomaron también muestras de sangre vía catéter i.v. para determinar la glucosa. Para la monitorización continua de la glucosa, se colocó en el abdomen de los sujetos un monitor de glucosa continuo (iPro2, Medtronic Trading, Países Bajos). Durante cada visita se midieron el peso y la presión arterial. Se realizó entre los períodos de tratamiento un período de lavado de al menos 1 semana.

Sujetos - Se incluyeron ocho sujetos (2 mujeres y 6 hombres; edad media 53 años (con intervalo de 31 a 65 años)) con un índice de masa corporal (BMI) medio de $31,5 \text{ kg/m}^2$, intervalo $26\text{-}36 \text{ kg/m}^2$. Siete de los ocho sujetos utilizaron metformina diariamente. Todos los sujetos fueron diagnosticados con diabetes de tipo 2 durante al menos 3 meses antes de la inclusión. Se permitió la monoterapia con metformina durante al menos 3 meses antes de la selección, pero el tratamiento con metformina se suspendió 1 día antes del comienzo de cada período de tratamiento. En la población, el nivel medio de hemoglobina glicosilada (HbA1c) fue 52 mmol/mol , variando desde 48 mmol/mol hasta 57 mmol/mol (6,9%; intervalo de 6,5 a 7,4%) y el índice de masa corporal fue superior a 25 kg/m^2 . Los criterios de exclusión consistieron en antecedentes o presencia de complicaciones a largo plazo de la diabetes de tipo 2; anomalías clínicamente significativas en la evaluación de laboratorio en la selección y el uso de corticosteroides sistémicos en los 60 días anteriores a la selección. Antes de la infusión, los sujetos recibieron dos catéteres permanentes: el primer catéter se insertó antes del tratamiento; y el segundo catéter se insertó antes de la

SBM para la toma de muestras de sangre. El segundo catéter se mantuvo para la infusión lenta de solución salina isotónica.

Fármaco del estudio – La UAG utilizada en este estudio fue producida por Bachem AG, Hauptstrasse 144, Bubendorf CH-4416, Suiza. La UAG se entregó como polvo liofilizado (viales que contenían 5 mg del fármaco) y se conservó en la farmacia local de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Métodos de estudio - Las infusiones se realizaron en la unidad de investigación clínica local durante 15 horas, desde al 9 pm a 12 am. Cada volumen de solución de UAG se filtró y se diluyó en solución salina al 0,9% para obtener la dosis apropiada para la administración. El placebo consistió en solución salina al 0,9%. La dosis se calculó en función del peso del sujeto. Cada vial se reconstituyó con 5 mL de agua para inyección y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Luego, la dosis se inyectó en una bolsa de 500 mL de NaCl al 0,9%. Se prepararon tres bolsas para asegurar una infusión continua de 15 horas a 100 mL/hora.

La comida de desayuno estándar (SBM) consistía en:

- 3 rebanadas de pan de trigo;
- 3 porciones de margarina;
- 2 lonchas de queso (48% de grasa);
- 1 porción de mermelada
- 1 taza de leche entera y
- 1 huevo duro;

para un total de 714 kcal (17% de proteínas, 46% de grasa y 37% de carbohidratos). La SBM tenía que ser consumida en 15 minutos, desde las 8:00 a.m. hasta las 8:15 a.m. En cada una de las 3 visitas, se evaluaron los siguientes parámetros de seguridad: hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos y diferencial y se determinaron utilizando Sysmex XE 2100, Firma Sysmex, Ecustra 11, 4879 NP Etten-Leur. Se determinaron acetato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, bilirrubina total, creatina-fosfoquinasa (CPK), lactato-deshidrogenasa (LDH), creatinina, urea, amilasa, lipasa, ácido úrico, glucosa, colesterol, LDL, HDL, triglicéridos, sodio, potasio, calcio, cloruro, proteína y albúmina utilizando un aparato Hitachi Modular P800, Roche Transistorstraat 41, 1332 CK Almere. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando un dispositivo de monitorización continuo de glucosa (Medtronic CGMS iPro™ Continuous Glucose Recorder, Medtronic Trading; Países Bajos) que estuvo insertado por vía subcutánea durante todo el período de tratamiento. Los niveles de glucosa en suero (utilizando el análisis de glucoquinasa interna) también se evaluaron cada 30 minutos y comenzando antes, y continuando durante 4 horas después de la SBM. Durante el análisis por CGMS, a todos los sujetos se le tuvieron que realizar al menos cuatro análisis de glicemia capilar al día. Los datos recopilados se ingresaron en el monitor de CG-MS para obtener los coeficientes de correlación entre los valores de SMBG y CGMS. Todos los análisis de SMBG se realizaron con un glucómetro digital (Contour, Bayer). Los niveles de AG y UAG se evaluaron antes del comienzo de la infusión de la noche, 10 minutos antes del comienzo y 30 minutos después de la SBM. Para preservar la acilación de la ghrelina, se recogieron muestras de sangre directamente en tubos con EDTA, luego, en 2 minutos, se añadió 1 mL de EDTA-sangre a 1 mL de solución conservante en hielo (HCl 0,0295 N que contenía NaCl 72 mM, NaF 58 mM, hidrocloreto de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo 4 mM) (un inhibidor de serina-proteasa irreversible, soluble en agua; AEBSF), pH 3,0, se preparó 295 mOsm/Kg de plasma por centrifugación a 4°C, luego se acidificó 1 mL con 100 µL de HCl 1N y se conservó a – 80°C hasta que se realizaron los ensayos.

El ensayo de ghrelina utilizó placas MSD ELISA de 96 pocillos (Meso Scale Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, EE.UU.) revestidas por incubación con 30 µL/pocillo de anticuerpo de captura (D4 diluido hasta 1 µg/mL en PBS; anti- ghrelina C-terminal (Gutierrez et al., 2008 PNAS 105: 6320-6325)), durante la noche a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo de captura y se bloquearon los pocillos con 150 µL de tampón de caseína (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Los patrones para AG y UAG se prepararon utilizando ocho diluciones en serie 4x en un tampón de caseína a partir de 8 ng/mL y 30 ng/mL, respectivamente. El plasma conservado se diluyó 1:1 en tampón de caseína. Se utilizaron placas separadas para la detección de AG y UAG. Los patrones y las muestras (25 µL/pocillo) se cargaron en placas ELISA revestidas, y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas, se lavaron 3x con PBS-T (150 µL/pocillo). Los anticuerpos de detección C2-4a1 y E8 (AG N-terminal y UAG N-terminal, respectivamente) fueron sulfomarcados utilizando el protocolo estándar de MSD. Luego se diluyeron 1:10000 en caseína 0,2X/Tween 20 al 0,05% y se añadieron a placas con AG o UAG, respectivamente, a 25 µL/pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (150 µL/pocillo). Finalmente, se añadieron a cada pocillo 150 µL de tampón de lectura 1X (MSD) y las placas se leyeron inmediatamente en un MSD Sector Imager 6000. Los valores de AG y UAG para las muestras se calcularon por interpolación de sus curvas patrones respectivas utilizando el programa informático Sector Imager.

Estudio con pinza - Estudio aleatorizado doble ciego de 2 tratamientos en 2 períodos de UAG frente a infusión de vehículo, evaluando una dosis (10 µg/kg/h) de UAG administrada por infusión intravenosa continua durante 2,5

horas. En pacientes que recibieron una pinza de insulina euglicémica eficaz al comienzo de una infusión de placebo/UAG de 2,5 horas.

Análisis estadístico - Los análisis de los datos se realizaron con el Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037. EE.UU.). Los resultados se dan en valores medios (\pm SE). Las comparaciones se calcularon utilizando comparaciones múltiples de Bonferroni, pruebas de rango con signo de pares emparejados de Wilcoxon y análisis por ANOVA.

Con respecto a los datos experimentales presentados en la Figura 8, se alimentaron ratas Sprague-Dawley de 7 semanas, que pesaban entre 275 g y 300 g, con una dieta de pelets *ad libitum* y estaban alojadas individualmente en jaulas de plástico. El experimento se realizó 2,5 horas después del comienzo del ciclo de luz en ratas alimentadas libremente. A las ratas se le inyectaron i.p. simultáneamente vehículo más vehículo, vehículo + AG (13 μ g/kg) o UAG ciclado (6-13) (SEQ ID NO: 25) (42 μ g/kg) + AG (13 μ g/kg). Inmediatamente después de la finalización de la inyección i.p. a las ratas, se retiró alimentación *ad libitum* por la noche I y se reemplazó por 2 pelets para cada animal, previamente pesados, colocados en la parte superior de la jaula. La ingesta de alimentos se calculó como la diferencia entre el peso de los alimentos antes y después del período de alimentación en cada intervalo de tiempo (30 minutos, 1 hora y 2 horas). La ingesta de alimentos acumulada se calculó sumando los valores de los diferentes períodos de tiempo.

Si bien la invención se ha descrito en relación con sus realizaciones específicas, se entenderá que son posibles modificaciones adicionales y esta solicitud pretende abarcar cualesquiera variaciones, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo desviaciones tales de la presente descripción como es práctica conocida o habitual en la técnica a la que se refiere la invención y como se puede aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de referencias

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H y Kangawa K; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402:656-660 (1999).
- 5 2. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB y Korbonits M; The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:2988-2991 (2002).
- 10 3. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PL, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee K-K, Pong S-S, Chaung L-Y, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji D, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JA, Smith RG, Van der Ploeg LHT; A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977 (1996).
- 15 4. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.; Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;86(10):4753-8 (2001)
- 20 5. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123(4):1120-1128, 2002.
6. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660, 1999.
7. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-913, 2000.
8. Broglio F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V, Lanfranco F, Gottero C, Gauna C, Hofland L, Van Der Lely AJ, Ghigo E. The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(5):592-599, 2004.
- 25 9. Tong J, Pigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschöp MH, D'Alessio D. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* Sep;59(9):2145-51 (2010).
10. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8(7):643-644 (2002).
- 30 11. Haqq AMF, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Lafranchi SH, Purnell JQ. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88(1):174-178 (2003).
- 35 12. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Masuyama T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic Torii rats. *Metabolism*. 2011 Oct 14. [Epub ahead of print]
13. Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(2):E347-E356 (2005).
- 40 14. Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin: a potential therapeutic target for cancer. *Regul Pept* 163(1-3):7-17 (2010).
15. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E; Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457 (2004).
16. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. Jan;54(1):18-24 (2005).
- 45 17. Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. Sep;149(9):4710-6. (2008)
18. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun;89(6):3062-5 (2004).

19. Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;89(10):5035-42 (2004).
- 5 20. St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Brochu M, Bastard JP, Cianflone K, Doucet E, Imbeault P, Rabasa-Lhoret R. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan;92(1):264-9 (2007).
21. Pacifico L, Poggiogalle E, Costantino F, Anania C, Ferraro F, Chiarelli F, Chiesa. Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* Dec;161(6):861-70 (2009).
- 10 22. Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Cioocchi B, Cattin L, Guarnieri G. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;92(10):3935-40 (2007).
- 15 23. Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Gil MJ, Becerril S, Sáinz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Frühbeck G. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond).* May;33(5):541-52 (2009).
24. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: Hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 58(1):2-19 (2010).
25. Gualillo O, Lago F, Dieguez C. Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends Pharmacol Sci* 29(8):398-401 (2008).
- 20 26. Hillman JB, Tong J, Tschop M. Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discov Med.* Jun;11(61):521-8 (2011).
27. Kumar R, Salehi A, Rehfeld JF, Höglund P, Lindström E, Håkanson R. Proghrelin peptides: Desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regul Pept.* Sep 24;164(2-3):65-70 (2010)
- 25 28. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* May 23;346(21):1623-30 (2002).
29. Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, Proietto J. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *N Engl J Med.* Oct 27;365(17):1597-604 (2011).
- 30 30. Kiewiet RM, van Aken MO, van der Weerd K, Uitterlinden P, Themmen AP, Hofland LJ, de Rijke YB, Delhanty PJ, Ghigo E, Abribat T, van der Lely AJ. Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes. *Eur J Endocrinol* 161:567-573 (2009).
31. Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen J, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:1055-1060 (2005).
- 35 32. Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJ, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen AP, van der Lely AJ. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E697-704 (2007).
- 40 33. Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghe C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E. Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* 57:967-979 (2008).
34. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, DiStefano PS, Geddes BJ. Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul Pept* 150:55-61 (2008).
- 45 35. Nonogaki K, Nozue K, Oka Y. Hyperphagia alters expression of hypothalamic 5-HT2C and 5-HT1B receptor genes and plasma des-acyl ghrelin levels in Ay mice. *Endocrinology* 147:5893-5900 (2006).
36. Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, Kangawa K, Kuroda Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5473-7.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ALIZE PHARMA SAS Aart Jan van der Lely Thierry Abribat

5 <120> MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE GHRELINA Y DE LA RELACIÓN GHRELINA/GHRELINA NO ACILADA USANDO GHRELINA NO ACILADA

<130> D31874

<150> 61/576,217

10 <151> 15-12-2011

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 2

25 <211> 14

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 2

30 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln
1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser

40 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 4

Gly Ser Ser Phe Leu
1 5

<210> 5

<211> 12

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10

```

5    <210> 6
    <211> 8
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 6
    Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
    1                5

10   <210> 7
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

15   <400> 7
    Glu His Gln Arg Val Gln
    1                5

    <210> 8
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 8
    Glu His Gln Arg Val
    1                5

25   <210> 9
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

30   <400> 9
    Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
    1                5                10

    <210> 10
    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 10
    Glu His Gln Arg
    1

40   <210> 11
    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 11
    His Gln Arg Val
    1

50   <210> 12
    <211> 8
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

55   <400> 12
    Ser Pro Asp His Gln Arg Val Gln
    1                5

    <210> 13

```

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 13
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln
 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Gly Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 1 5
 15 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 15
 Ala Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 1 5
 25 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 16
 Ser Ala Glu His Gln Arg Val Gln
 1 5
 35 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Ser Pro Ala His Gln Arg Val Gln
 40 1 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Ser Pro Glu Ala Gln Arg Val Gln
 1 5
 50 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 19
 Ser Pro Glu His Ala Arg Val Gln
 1 5
 <210> 20
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 20
 Ser Pro Glu His Gln Ala Val Gln
 5 1 5

 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 21
 Ser Pro Glu His Gln Arg Ala Gln
 1 5

 15 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 22
 Ser Pro Glu His Gln Arg Val Ala
 1 5

 <210> 23
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACION

 <400> 23
 Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 1 5
 35
 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACION
 45
 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (2)..(2)
 <223> D-amino acido
 50
 <400> 24
 Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 1 5

 <210> 25
 55 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 60 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA

<222> (1)..(8)
 <223> Cíclico

 <400> 25
 Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 5 1 5

 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (3)..(6)
 15 <223> Cíclico

 <400> 26
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln
 1 5

 20 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACION

 30 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (3)..(6)
 <223> Cíclico

 35 <400> 27
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln
 1 5

 <210> 28
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACION

 <400> 28
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln
 1 5
 50
 <210> 29
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 29
 His Gln Arg
 1

 <210> 30
 60 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

	Gln	Gln	Val	Arg	Gln	His	Glu	Pro	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser	Gly
5	1				5					10				

10

REIVINDICACIONES

1. Fragmentos de ghrelina no acilada que consisten en el péptido que se expone en la SEQ ID NO: 6 o en la SEQ ID NO: 25, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del síndrome de Prader-Willi en un sujeto que tiene niveles elevados de ghrelina.
- 5 2. Los fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso de la reivindicación 1, en donde comprende administrar una cantidad eficaz de dicho fragmento de ghrelina no acilada y su sal desde aproximadamente 0,001 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg.
3. Los fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso de una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde comprende administrar una cantidad eficaz de dicho fragmento de ghrelina no acilada y su sal desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg.
- 10 4. Los fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso de una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho fragmento de ghrelina no acilada y sus sales farmacéuticamente aceptables se administran por una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, subcutánea, transdérmica, oral, bucal, sublingual, nasal e inhalación.
- 15 5. Los fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso de una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los niveles elevados de ghrelina son niveles elevados de ghrelina circulante
6. Los fragmentos de ghrelina no acilada y sus sales para su uso de una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paciente fue identificado por:
- 20
 - determinación de un nivel de ghrelina circulante en el sujeto, y
 - procesamiento del nivel de ghrelina circulante, al menos en parte, sobre la base de un nivel de referencia de ghrelina circulante para obtener información que transmita si el nivel de ghrelina circulante es elevado.

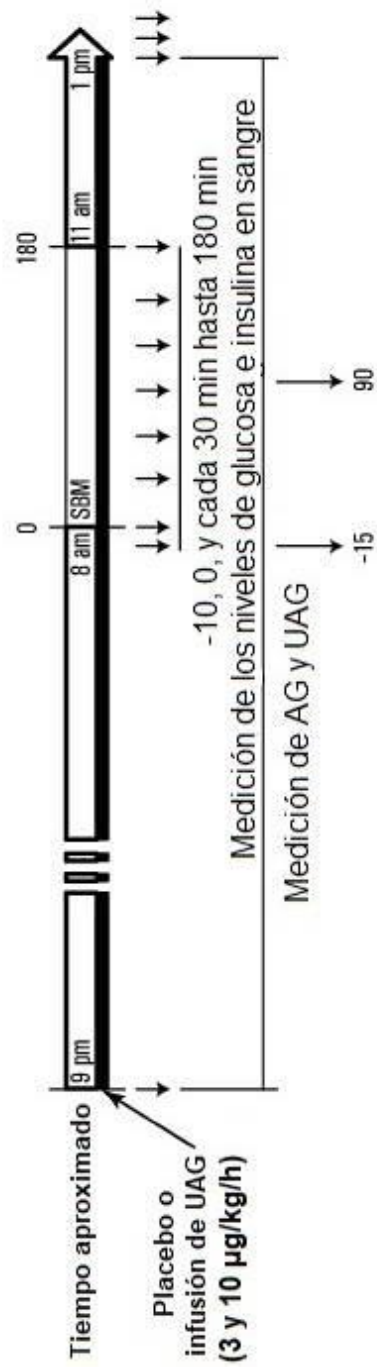


FIG. 1

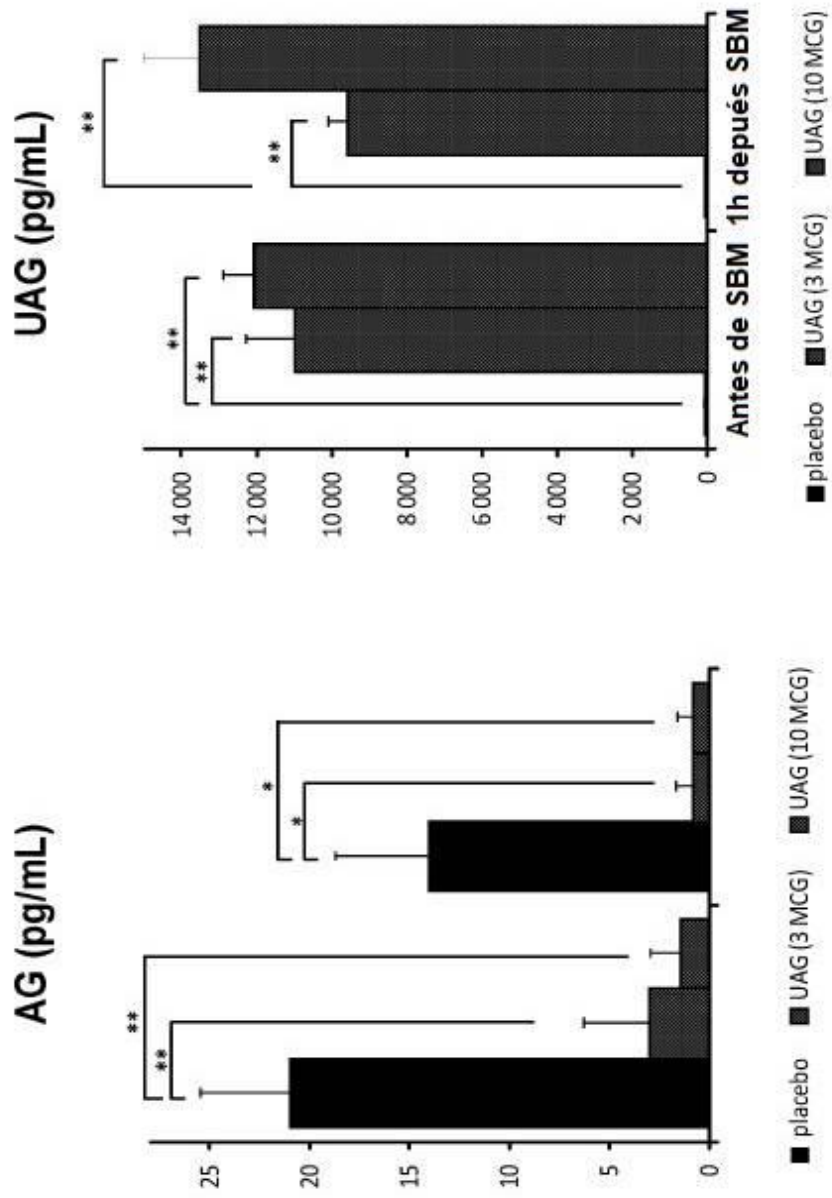


FIG. 2A

FIG. 2B

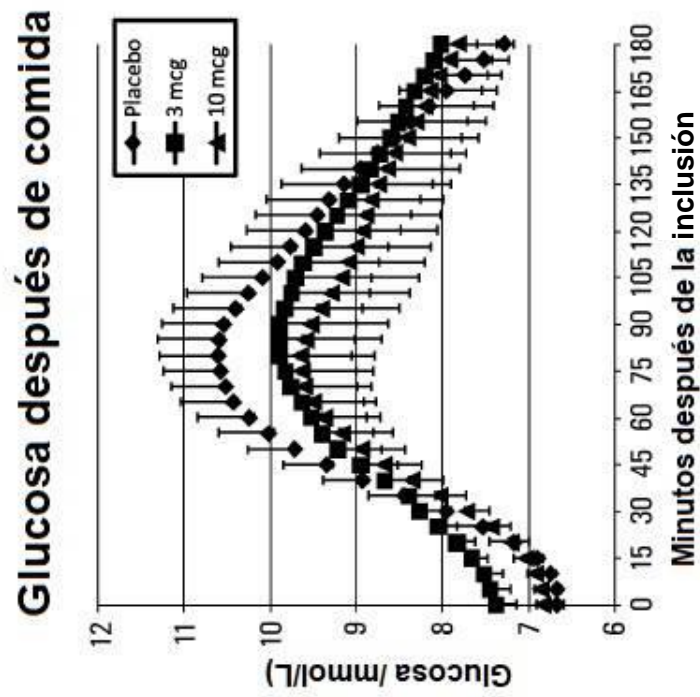


FIG. 3A

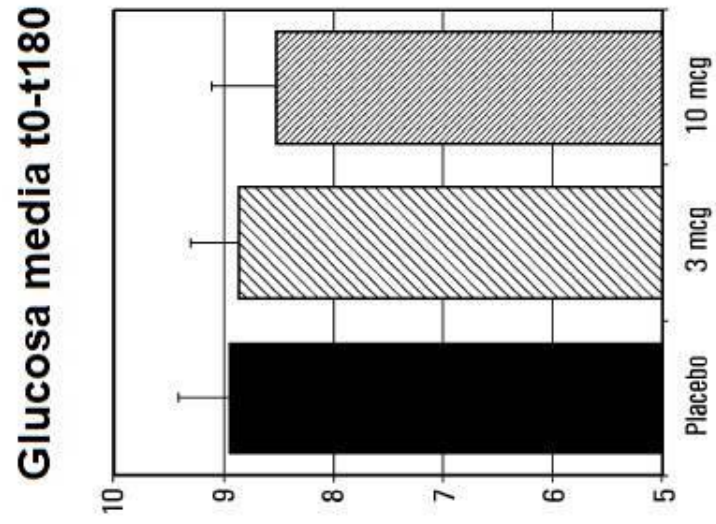


FIG. 3B

Glucosa después de comida

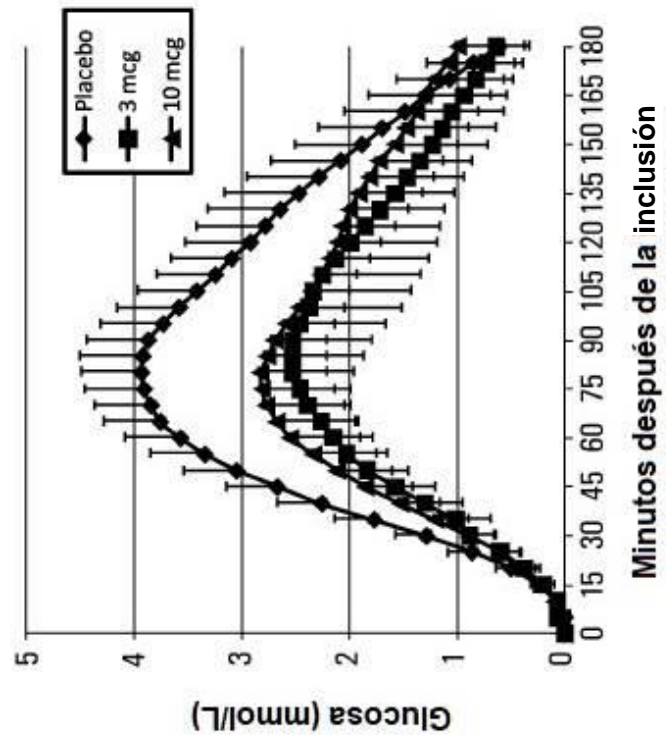


FIG. 4A

Glucosa media t0-t180

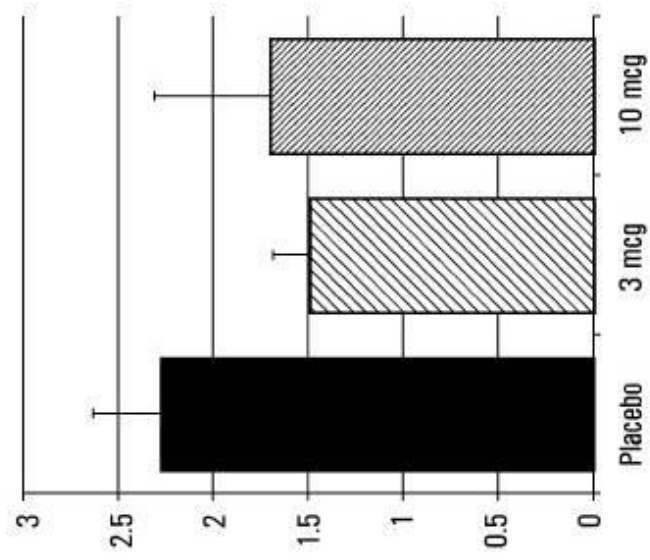


FIG. 4B

Pico de glucosa después de la SBM

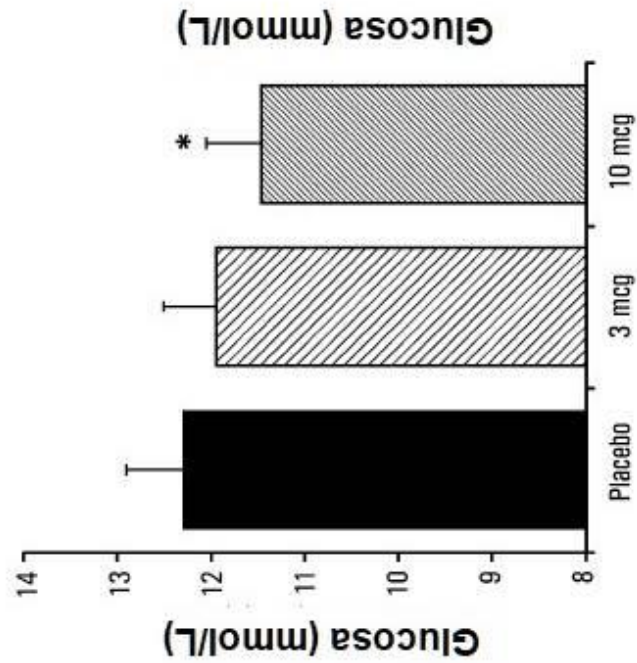


FIG. 5A

Pico de glucosa después de la SBM

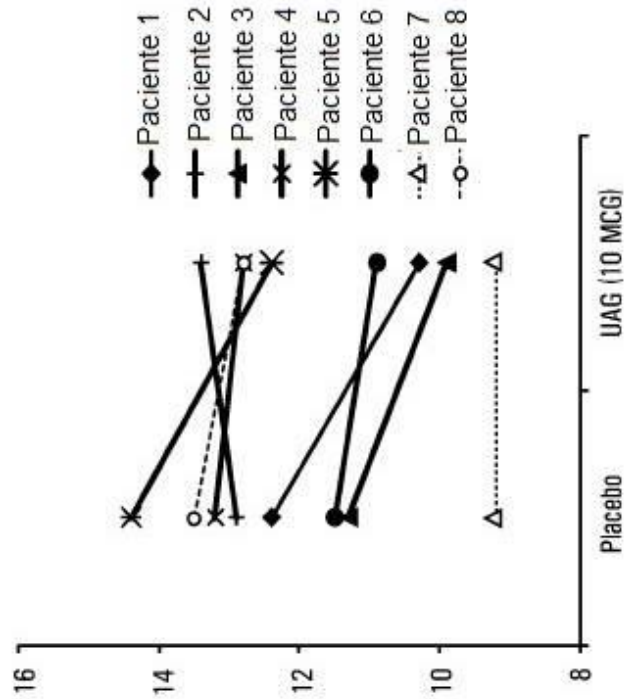


FIG. 5B

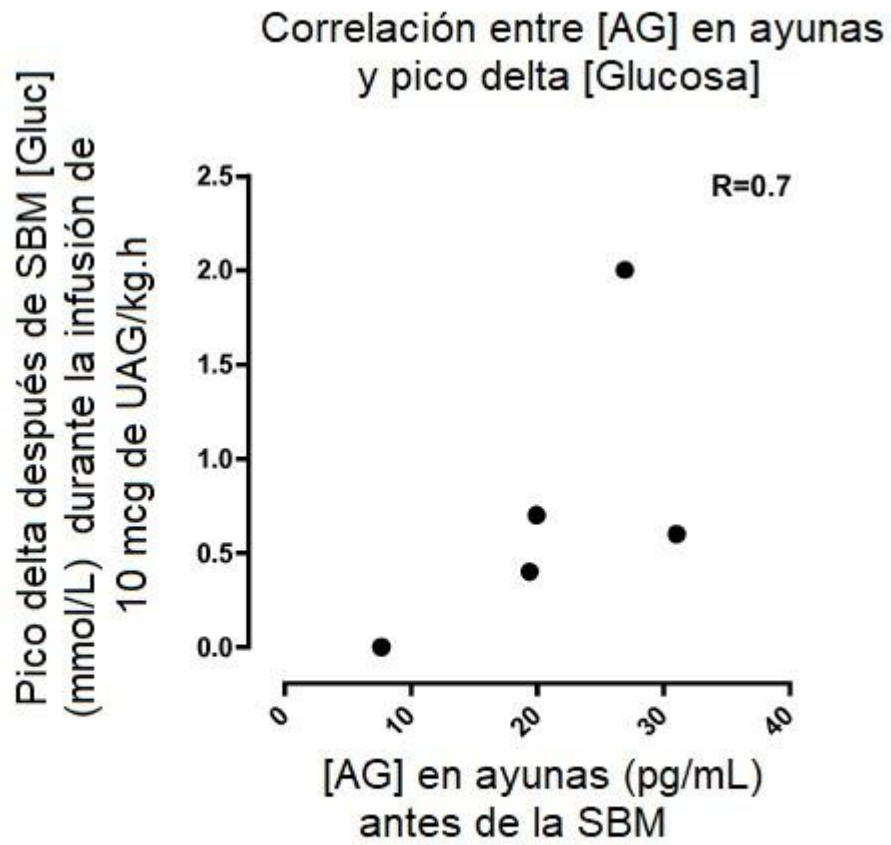


FIG. 6A

Correlación entre [AG] en ayunas y
delta AUC [Glucosa] utilizando iPro

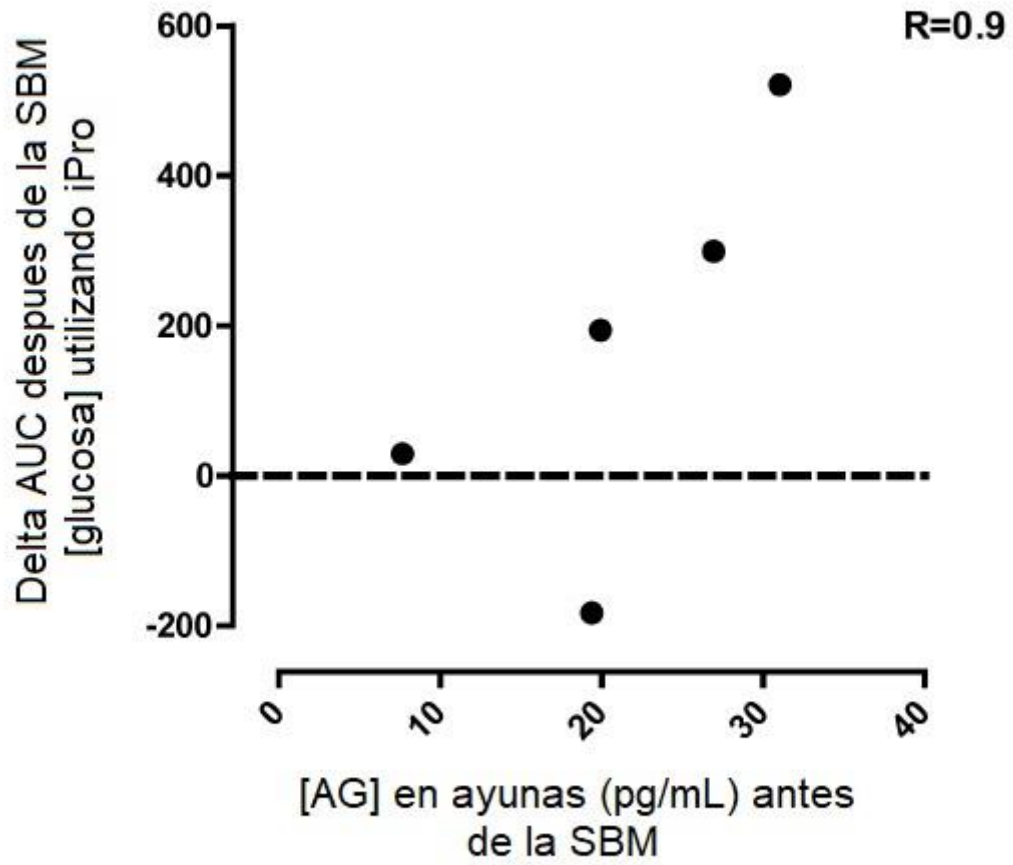


FIG. 6B

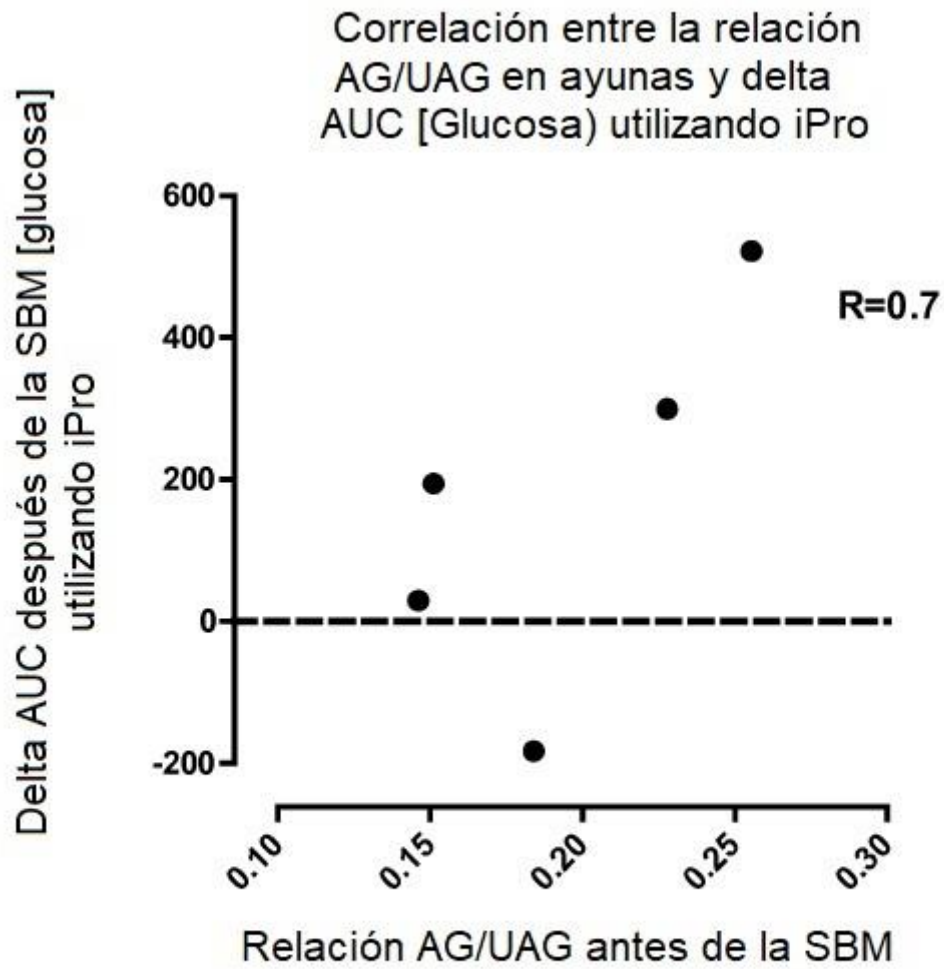


FIG. 6C

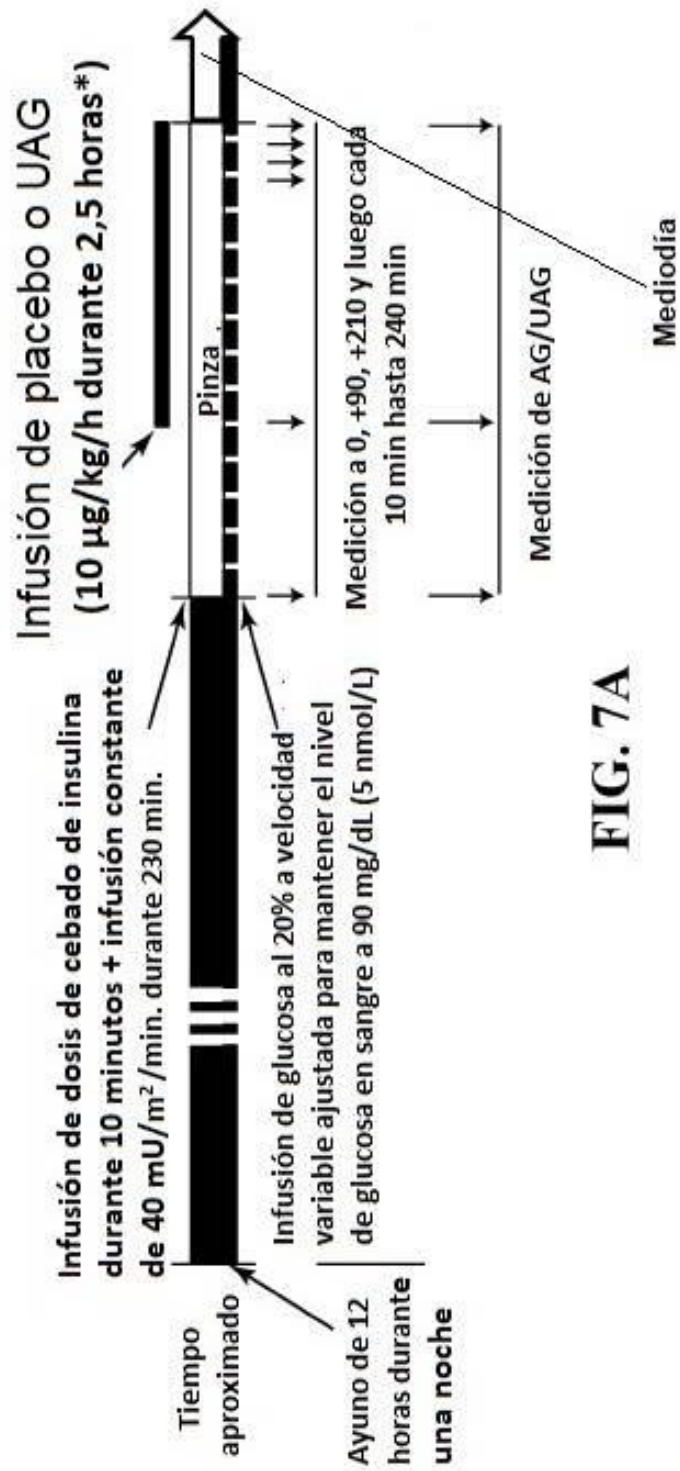


FIG. 7A

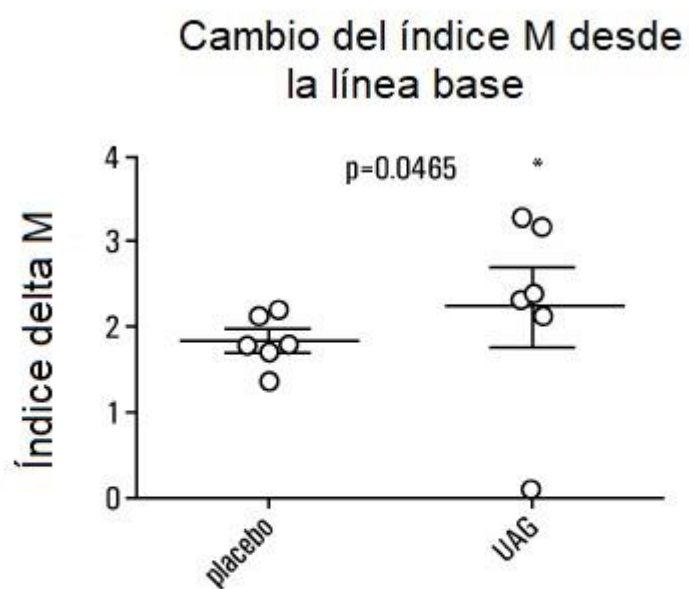


FIG. 7B

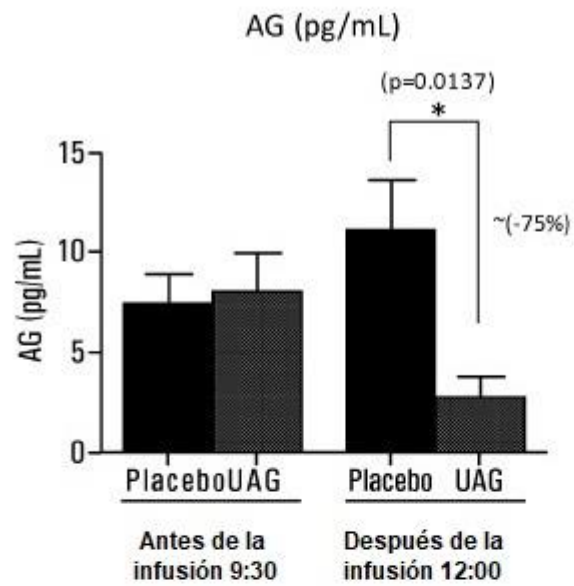


FIG. 7C

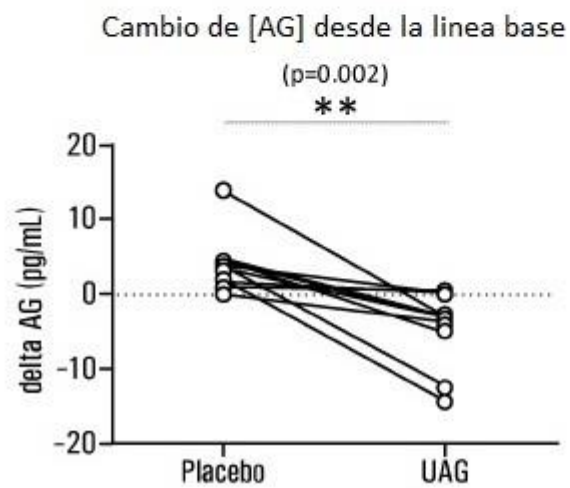


FIG. 7D

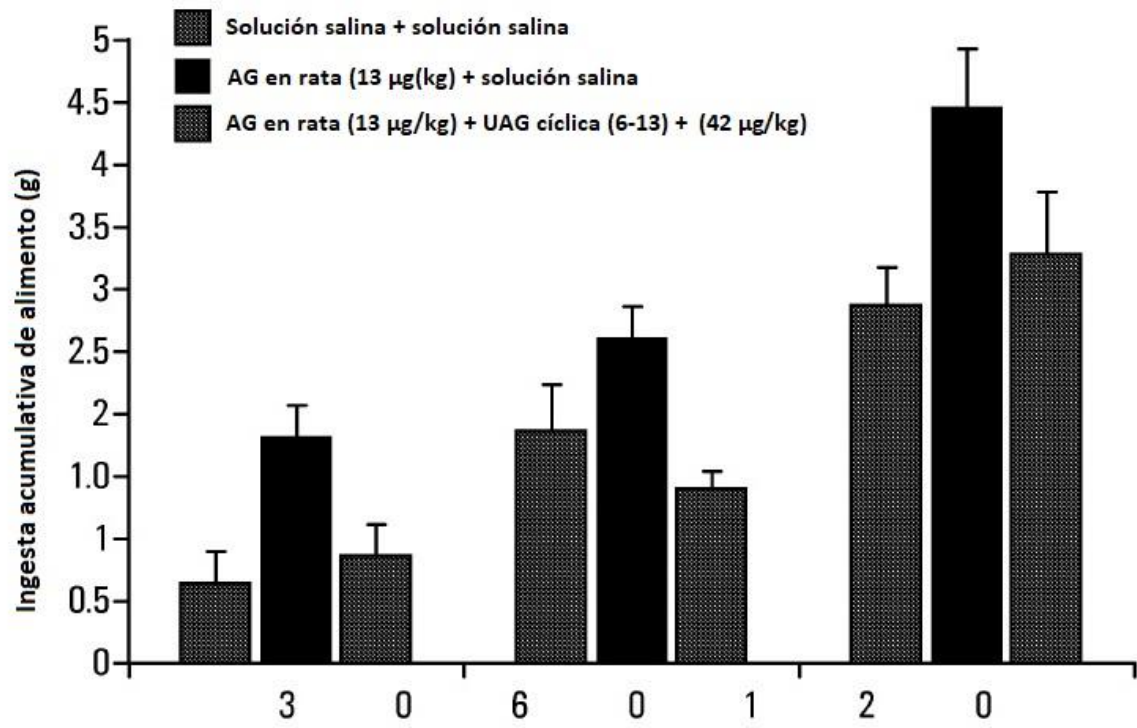


FIG. 8