

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 743**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2016 PCT/EP2016/056383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2016 E 16712805 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3273981**

54 Título: **Método y composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

24.03.2015 EP 15305422

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

15.02.2021

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VALET, PHILIPPE;
LAURELL, ISABELLE;
CAZALS, LAURENT y
GOURDY, PIERRE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 805 743 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

Método y composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la diabetes

Campo de la descripción:

5 La presente invención se relaciona con la (Pyr1) apelina-13 para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes en humanos, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración que varía de 10 nmol/kg a 200 nmol/kg al día.

Antecedentes::

10 La diabetes es una enfermedad caracterizada por fallo en la retroalimentación y la secreción de insulina en las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos, y es una de las enfermedades endocrinas más comunes en todos los grupos de edad y poblaciones. El efecto metabólico más obvio en la diabetes es la elevación errática crónica del nivel de glucosa en sangre, que se asocia a daño progresivo a los vasos sanguíneos. Esto puede llevar a ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, ceguera, disfunción de nervios periféricos y fallo renal. Actualmente, hay 18,2 millones de personas sólo en los Estados Unidos que tienen diabetes. Además de la morbilidad clínica y de la mortalidad, el coste económico de la diabetes es enorme, superando los 90.000 millones de dólares al año sólo en los Estados Unidos, y se espera que la prevalencia de la diabetes aumente.

15 Existen dos formas principales de diabetes mellitus: la diabetes mellitus dependiente de insulina (Tipo I), que representa de un 5 a un 10% de todos los casos, y la diabetes mellitus no dependiente de insulina (Tipo II), que comprende aproximadamente de un 90 a un 95% de los casos.

20 La diabetes mellitus de Tipo I es una enfermedad autoinmune caracterizada por destrucción progresiva de las células beta pancreáticas y que se produce lo más frecuentemente en niños y adultos jóvenes. La enfermedad se asocia a un elevado índice de complicaciones irreversibles severas que se producen a pesar de la disponibilidad de reemplazo de insulina, normalmente mediante inyecciones administradas 1-4 veces al día.

25 La mayoría de las estrategias terapéuticas para el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus de tipo I se dirigen a la supresión de la respuesta autoinmune con objeto de prevenir la destrucción de las células beta. Por consiguiente, se han considerado diversos agentes inmunosupresores para prevenir la destrucción de las células beta pancreáticas, tales como glucocorticoides, ciclofosfamida, ciclosporina A, rapamicina, FK506 y prodigiosina. Sin embargo, el uso de dichos agentes inmunosupresores puede causar severos efectos colaterales, tales como toxicidad relacionada con fármacos sobre el hígado o el riñón, y aumentar la incidencia de complicaciones infecciosas, particularmente en pacientes con diabetes mellitus que ya son susceptibles a infecciones como parte de su enfermedad.

30 La diabetes de tipo II se produce como resultado de una pérdida de producción de insulina combinada con la incapacidad del organismo para usar apropiadamente la insulina (resistencia a la insulina), y se asocia con frecuencia a la obesidad y el envejecimiento. En la diabetes de Tipo II, los pacientes típicamente comienzan la terapia siguiendo un régimen de una dieta óptima, reducción de peso y ejercicio. Se inicia la terapia con fármacos cuando estas medidas ya no proporcionan un control metabólico adecuado. La terapia inicial con fármacos incluye: sulfonilureas (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida y glibenclamida), biguanidas (por ejemplo, metformina y buformina) e inhibidores de la a-glucosidasa (por ejemplo, acarbosa y voglibosa). Sin embargo, más de un 50% de todos los diabéticos tratados mediante los fármacos actualmente disponibles demuestran un escaso control glucémico en seis años, y requieren terapia de reemplazo de insulina como último recurso.

40 Aunque se pueden controlar muchos de los síntomas de la diabetes mellitus mediante terapia con insulina, las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus tanto de tipo I como de tipo II son severas y pueden reducir la esperanza de vida hasta en un tercio. A lo largo del tiempo, niveles elevados de glucosa en sangre dañan los vasos sanguíneos, el corazón, los ojos, los riñones, los nervios, el sistema nervioso autónomo, la piel, el tejido conectivo y la función de las células blancas de la sangre.

45 Además, la terapia con insulina puede dar lugar a alergia a la insulina, resistencia a la insulina, atrofia de la grasa subcutánea en el punto de inyección de la insulina (es decir, lipoatrofia), aumento del depósito de grasa subcutánea (es decir, lipohipertrofia) debido a la acción lipogénica de una alta concentración local de insulina, y edema por insulina.

Existe, por lo tanto, una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, terapias nuevas, seguras y efectivas para la diabetes mellitus.

50 **Compendio:**

Los inventores muestran, gracias a un proyecto de investigación clínica traslacional, que el uso de apelina en humanos tiene un efecto positivo sobre la sensibilidad a la insulina, con una buena tolerancia y una buena seguridad.

La invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes.

La invención se relaciona con la (Pyr1) apelina-13 para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes en humanos, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración que va de 10 nmol/kg a 200 nmol/kg al día.

Descripción detallada:

5 Agonista del receptor de APJ y sus usos

La invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes.

10 Tal como se usa aquí, "diabetes" se refiere a la amplia clase de trastornos metabólicos caracterizados por una producción de insulina y una tolerancia a la glucosa alteradas. La diabetes incluye la diabetes de tipo 1 y de tipo 2, la diabetes gestacional, la prediabetes, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, la glucemia alterada en ayunas y la tolerancia a la glucosa alterada. La diabetes de tipo 1 también se conoce como Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina (DMDI). Se usan aquí los términos indistintamente. El tipo 2 también se conoce como Diabetes Mellitus No Dependiente de Insulina (DMNDI).

Por lo tanto, en una realización particular, la invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus.

15 En otra realización particular, la invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo 1.

En otra realización particular, la invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo 2.

20 En otra realización particular, la invención describe un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina.

El término "receptor de APJ" significa el receptor para apelina originalmente identificado por O'Dowd *et al.* (O'Dowd *et al.*, 1993, Gene 136: 355360).

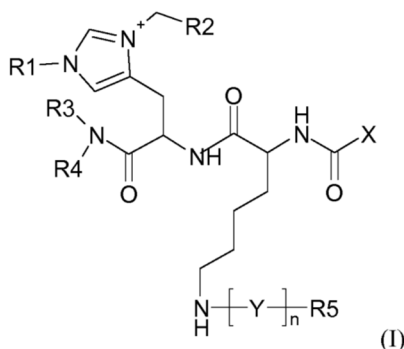
25 Tal como se usa aquí, el término "agonista del receptor de APJ" se refiere a cualquier compuesto, natural o no, capaz de promover la función del receptor de APJ. Como ejemplos de los agonistas del receptor de APJ de la presente descripción, se incluyen, aunque sin limitación, polipéptidos, apelinomiméticos, anticuerpos, aptámeros y pequeñas moléculas orgánicas (Apelin receptors: from signaling to antidiabetic strategy; C. Chaves-Almagro, I. Castan-Laurell, C. Dray, C. Knauf, *et al.*; Eur J Pharmacol 22 Sep. 2015;763(Pt B): 149-59. Epub Mayo 2015).

30 Se pueden determinar las actividades agonistas de un compuesto de ensayo hacia el receptor de APJ por cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, dado que el agonista de la presente descripción puede promover la función del receptor de APJ, se puede hacer un cribado del agonista usando el agonista natural del receptor de APJ (es decir, apelina) y su receptor. Típicamente, se puede obtener el agonista de la presente descripción usando el método que criba la sustancia que promueve la función del receptor de APJ, que comprende comparar (i) el caso en donde se pone la apelina en contacto con el receptor de APJ y (ii) el caso en donde se pone en contacto un compuesto de ensayo con el receptor de APJ. En el método de cribado de la presente descripción, por ejemplo, (a) se miden las cantidades de unión de apelina al receptor de APJ (i) cuando se pone en contacto la apelina con el receptor de APJ y (ii) se ponen en contacto la apelina y un compuesto de ensayo con el receptor de APJ; y se comparan los resultados; o (b) se miden las actividades estimulantes celulares (por ej., las actividades que promueven la liberación de ácido araquidónico, la liberación de acetilcolina, la liberación de Ca²⁺ intracelular, la producción de AMPc intracelular, la producción de GMPc intracelular, la producción de fosfato de inositol, cambios en el potencial de la membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambios de pH, etc.) mediadas por el receptor de APJ (i) cuando se pone en contacto la apelina con el receptor de APJ y (ii) se pone en contacto un compuesto de ensayo con el receptor de APJ; y se comparan los resultados. Típicamente, se seleccionan entonces los compuestos de ensayo que proporcionan una mayor promoción o al menos la misma promoción del receptor de APJ que la apelina como agonistas del receptor de APJ. Como ejemplos específicos del método de cribado de la presente descripción, se incluyen: (1) un método de cribado de la sustancia que promueve la función del receptor de APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada al receptor de APJ cuando se pone en contacto la apelina marcada con el receptor de APJ y cuando se ponen en contacto la apelina marcada y un compuesto de ensayo con el receptor de APJ; y comparar las cantidades; (2) un método de cribado de la sustancia que promueve la función del receptor de APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada a una célula que contiene el receptor de APJ o una fracción de membrana de la célula, cuando se pone en contacto la apelina marcada con la célula o fracción de membrana y cuando se ponen en contacto la apelina marcada y un compuesto de ensayo con la célula o fracción de membrana, y comparar las cantidades de unión; y (3) un método de cribado de la sustancia que promueve la función del receptor de APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada al receptor de APJ expresado sobre la membrana de una célula cultivando un transformante que tiene un ADN codificante del receptor de APJ, cuando se pone en contacto la apelina marcada con el receptor de APJ y cuando se ponen en contacto la apelina marcada y un compuesto de ensayo con el receptor de APJ, y comparar las cantidades de unión. En esos ejemplos, se seleccionan entonces los compuestos de ensayo que proporcionan una mayor unión o al menos la misma unión

que la apelina como agonistas del receptor de APJ. Específicamente, se describe un método para determinar si un compuesto es un agonista del receptor de APJ en Iturrioz X. *et al.* (Iturrioz X, Alvear-Pérez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. FASEB J. Mayo de 2010;24(5):1506-17. Epub 29 de Dic. de 2009). La Publicación de la Solicitud de Patente Estadounidense N° US 2005/0112701 también describía un sistema de ensayo para la identificación de un ligando para el receptor de angiotensina de tipo 1 (receptor de APJ) que comprende un receptor de APJ. También se describe otro método en la Publicación de Patente Estadounidense US 6.492.324.

En una realización, el agonista del receptor de APJ es una pequeña molécula orgánica. El término "pequeña molécula orgánica" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las pequeñas moléculas orgánicas preferidas varían en cuanto a tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferiblemente hasta 2.000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

Como ejemplos de pequeñas moléculas orgánicas que son agonistas del receptor de APJ, se incluyen las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP19030052 y en Iturrioz X. *et al.* (Iturrioz X, Alvear-Pérez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. FASEB J. Mayo de 2010;24(5):1506-17. Epub 29 de Dic. de 2009). Típicamente, una pequeña molécula orgánica que es un agonista del receptor de APJ tiene la fórmula general (I):



en donde:

R1 es un grupo arilo, alquilarilo, heteroarilo o alquilheteroarilo

R2 es un átomo de hidrógeno o un grupo arilo

R3 y R4 representan un átomo de hidrógeno o un grupo heterocicloalquilo, con la condición de que R3 y R4 no pueden representar simultáneamente un hidrógeno y de que R3 y R4 pueden ambos ser parte de un grupo heterocicloalquilo

R5 representa un grupo seleccionado del grupo consistente en boc, fmoc, rojo texas, azul patente V, lisamina y rodamina 101

n es un número entero de 0 a 1

Y representa un grupo $-\text{CO}-(\text{NH})_{n'}-\text{A}-\text{NH}-$, en donde:

n' es un número entero de 0 a 1

A es un grupo seleccionado del grupo consistente en:

$-(\text{CH}_2)_{n''}-$

$-[(\text{CH}_2)_2-\text{O}]_{n'''}-(\text{CH}_2)_2-$

$-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m'}-$

$-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m'}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m''}-$

$-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{m'}-$

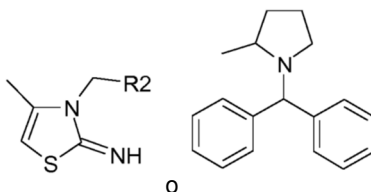
$-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{m'}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{m''}-$

representando n" un número entero de 1 a 20

representando n'" un número entero de 1 a 10

representando m, m' y m" independientemente unos de otros un número entero de 1 a 15

X representa un grupo seleccionado de la lista siguiente:



5

De manera alternativa, el agonista del receptor de APJ puede consistir en un anticuerpo (incluyendo el término "porción de anticuerpo").

En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una porción del mismo que se une al receptor de APJ. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o una porción del mismo que se une al receptor de APJ. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o una porción del mismo que se une al receptor de APJ. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o una porción del mismo que se une al receptor de APJ. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende al menos una cadena pesada del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende al menos una porción Fc del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende una porción Fv del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos aquí descritos, la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios CDR del anticuerpo.

Tal como se usa aquí, "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto naturales como no naturales. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos de una sola cadena y sus fragmentos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede ser humanizado por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

Se preparan anticuerpos según metodología convencional. Se pueden generar anticuerpos monoclonales usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la descripción, se inmuniza a un ratón u otro animal hospedador apropiado a intervalos adecuados (por ej., dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de APJ. Se puede administrar al animal un "refuerzo" final de antígeno en una semana antes del sacrificio. Es frecuentemente deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Como adyuvantes inmunológicos adecuados, se incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunostimulantes que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en este campo. Se puede inmunizar a los animales por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras. Se puede inmunizar a un animal dado con múltiples formas del antígeno por múltiples vías.

Para explicarlo brevemente, se puede proporcionar el antígeno como péptidos sintéticos correspondientes a regiones antigénicas de interés en APJ. Después del régimen de inmunización, se aíslan los linfocitos del bazo, del ganglio linfático o de otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Después de la fusión, se ponen las células en medios permisivos para el crecimiento de hibridomas, pero no los compañeros de fusión, usando métodos estándar, como se ha descrito (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, New York, 1996). Tras el cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes celulares en cuanto a la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Como técnicas analíticas adecuadas, se incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia Western. Otras técnicas de cribado son bien conocidas en este campo. Son técnicas preferidas las que confirman la unión de anticuerpos a antígeno nativamente plegado conformacionalmente intacto, tales como ELISA no desnaturizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Significativamente, como es bien conocido en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el parátipo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véanse, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', designado como un fragmento F(ab')₂, conserva los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De forma similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, designado como un fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Procediendo más, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo covalentemente unida y una porción de la cadena pesada del anticuerpo llamada Fd. Los fragmentos Fd son el determinante mayor de especificidad del anticuerpo (un solo fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión a epítopos en aislamiento.

En la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la técnica, hay regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del parátipo (véanse, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones de marco (de FR1 a FR4) separadas, respectivamente, por tres regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más en particular la CDR3 de cadena pesada, son en gran medida responsables de la especificidad del anticuerpo.

Está ahora bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero pueden sustituirse por regiones similares de anticuerpos conoespecíficos o heteroespecíficos conservando la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta lo más claramente en el desarrollo y el uso de anticuerpos "humanizados", en los que CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta descripción proporciona en ciertas realizaciones composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Tal como se usa aquí, "humanizados" describe anticuerpos en donde algunos, la mayoría o todos de los aminoácidos fuera de las regiones CDR están sustituidos con aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulinas humanas. Como métodos de humanización, se incluyen, aunque sin limitación, los descritos en las Patentes Estadounidenses N^{os} 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Las anteriores Patentes Estadounidenses N^{os} 5.585.089 y 5.693.761 y WO 90/07861 también proponen cuatro posibles criterios que se pueden usar al diseñar los anticuerpos humanizados. La primera propuesta era, para un aceptor, usar un marco de una inmunoglobulina humana particular que es inusualmente homóloga a la inmunoglobulina donante que se ha de humanizar, o usar un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta era que, si un aminoácido en el marco de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donante en esa posición es típico para secuencias humanas, entonces se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta era que, en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta era usar el aminoácido donante que reside en las posiciones de marco en las que se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral en 3A de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que es capaz de interactuar con las CDR. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para producir anticuerpos humanizados. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, se han reemplazado algunos, la mayoría o todos de los aminoácidos fuera de las regiones CDR con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulinas humanas, pero en donde algunos, la mayoría o todos de los aminoácidos en una o más regiones CDR están inalterados. Son permisibles pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Como moléculas de inmunoglobulinas humanas adecuadas, se incluirían moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando ciertos métodos de humanización, se pueden aumentar la afinidad y/o la especificidad de unión del anticuerpo usando métodos de "evolución dirigida", como describen Wu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 294:151, 1999.

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales totalmente humanos inmunizando a ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas. Véanse, por ej., las Patentes Estadounidenses N^{os} 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias en ellas citadas. Estos animales han sido genéticamente modificados de forma que haya una deleción funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ej., murinos). Se modifica además a los animales para contener todo o una porción del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, de tal forma que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos totalmente humanos para el antígeno de interés. Tras la inmunización de estos ratones (por ej., XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales según tecnología de hibridomas estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas humanas y, por lo tanto, no provocarán respuestas de

anticuerpos humanos antirratón (KAMA) cuando se administren a humanos.

También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Éstos incluyen tecnología de presentación en fagos (Patentes Estadounidenses N^{os} 5.565.332 y 5.573.905) y estimulación *in vitro* de células B humanas (Patentes Estadounidenses N^{os} 5.229.275 y 5.567.610). Por lo tanto, como será evidente para alguien con conocimientos ordinarios en la técnica, la presente descripción también proporciona fragmentos F(ab')₂ Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que se han reemplazado las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos quiméricos de fragmentos F(ab')₂ en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos quiméricos de fragmentos Fab en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos quiméricos de fragmentos Fd en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 por secuencias humanas o no humanas homólogas. La presente invención también describe los así llamados anticuerpos de una sola cadena.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden derivar de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas comúnmente conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Las subclases de IgG son también bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

En otra realización, el anticuerpo según la invención describe un anticuerpo de un solo dominio. El término "anticuerpo de un solo dominio" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada único de anticuerpos del tipo que puede encontrarse en mamíferos Camélidos, que están de manera natural desprovistos de cadenas ligeras. Dichos VHH también se denominan "nanobody®". Los sdAb pueden ser en particular sdAb de llama.

En otra realización, el agonista del receptor de APJ es un aptámero.

Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con elevada afinidad y especificidad. Se pueden aislar dichos ligandos mediante Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatoria, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. Se puede obtener la biblioteca de secuencias aleatoria por síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente químicamente modificado, de una secuencia única. Se han revisado posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida exhibida por una proteína de plataforma, tal como Tiorredoxina A de *E. coli*, que se selecciona de bibliotecas combinatorias por métodos de dos híbridos (Colas *et al.*, 1996). Luego, tras producir aptámeros dirigidos contra APJ como se ha descrito anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los que promueven la función del receptor de APJ.

En otra realización, el agonista del receptor de APJ puede consistir en un polipéptido. Preferiblemente, dicho polipéptido es la propia apelina. Más preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido de apelina.

El término "apelina" tiene su significado general en la técnica e incluye apelina natural y variantes conservadoras de función y formas modificadas de la misma. La apelina puede proceder de cualquier fuente, pero típicamente es una apelina de mamífero (por ej., primate humano y no humano), y más en particular una apelina humana. La secuencia de la proteína apelina y los ácidos nucleicos para codificar dichas proteínas son bien conocidos para los expertos en la técnica. La apelina se sintetiza como un precursor de 77 aminoácidos y se encuentra como un dímero, estabilizado por puentes disulfuro (Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology*. Enero 146(1):231-6. 2005). La preapelina se convierte por escisión proteolítica para producir diferentes fragmentos C-terminales, incluyendo apelina-36, apelina-17, apelina-13 y la modificada tras la traducción (Pyr¹)apelina-13; todas son agonistas para el receptor de apelina: APJ. La falta de residuos de cisteína en estos fragmentos C-terminales sugiere que los péptidos maduros son monoméricos. Habría que entender que, como los expertos en la técnica conocen la secuencia de estas moléculas, se puede usar cualquier proteína apelina o variante de secuencia génica siempre que tenga las propiedades de una apelina.

Son "variantes conservadoras de función" aquéllas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y función globales del polipéptido, incluyendo, aunque sin limitación, el reemplazo de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de uniones de hidrógeno, ácidas, básicas, hidrofóbicas, aromáticas y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de tal forma que el porcentaje de similitud de secuencia de proteína o aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99%, según se determina de acuerdo con un esquema de alineación, tal como mediante el Método Cluster, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos, según se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75%, lo más preferiblemente al menos un 85%, e incluso más preferiblemente al menos un 90%, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa

o parental con la que se compara.

El término polipéptido de "apelina" se refiere a cualquier polipéptido que comprenda el fragmento C-terminal de la apelina-13. Por consiguiente, el término incluye la propia apelina o sus fragmentos que comprenden los fragmentos de apelina-17 o apelina-36.

5 En una realización particular, la apelina usada según la invención describe la (Pyr¹)apelina-13.

10 En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos de apelina usados en los métodos terapéuticos de la presente descripción puedan ser modificados para mejorar su eficacia terapéutica. Se puede usar dicha modificación de compuestos terapéuticos para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, se puede reducir la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes significativamente por combinación con una variedad de vehículos de soporte de fármacos que modifican la biodistribución.

15 Una estrategia para mejorar la viabilidad de fármacos es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha visto que diversos polímeros hidrosolubles modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de las barreras fisiológicas y modifican la velocidad de aclaramiento del organismo. Para conseguir un efecto de abordaje o de liberación mantenida, se han sintetizado polímeros hidrosolubles que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte del esqueleto o como grupos pendientes sobre la cadena polimérica.

20 Se ha usado ampliamente el polietilenglicol (PEG) como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. La unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas ha mostrado mejorar el tiempo de permanencia y reducir la toxicidad. El PEG puede copularse a principios activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y por otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita a a lo sumo dos principios activos por molécula. En un enfoque diferente, se exploraron copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que conservarían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando mayor carga de fármaco), y que podrían diseñarse sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

25 Los expertos en la técnica son conocedores de las técnicas de PEGilación para la modificación efectiva de fármacos. Por ejemplo, se han usado polímeros de administración de fármacos que consisten en polímeros alternantes de PEG y monómeros trifuncionales, tales como lisina, por parte de VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (típicamente 2.000 daltons o menos) se unen a los grupos α- y ε-amino de la lisina a través de uniones de uretano estables. Dichos copolímeros conservan las propiedades deseables del PEG, proporcionando al mismo tiempo grupos pendientes reactivos (los grupos ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena polimérica. Se pueden usar los grupos pendientes reactivos para derivatización, entrecruzamiento o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de prolongada circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y la unión escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciamiento del complejo fármaco/grupo de unión y a la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos de PEG más pequeños proporcionan mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular global del conjugado de copolímero de bloque aumentará la semivida circulatoria del conjugado. No obstante, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral que limita la filtración glomerular (por ej., menos de 45 kDa).

40 Además de que el esqueleto polimérico es importante para mantener la semivida circulatoria y la biodistribución, se pueden usar conectores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta que se libere del esqueleto polimérico por un desencadenante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido abordado. Por ejemplo, este tipo de administración de fármacos activada por tejido es particularmente útil cuando se requiere la administración a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de patología. Las bibliotecas de grupos conectores para uso en la administración de fármacos activada son conocidas para los expertos en la técnica y pueden basarse en la cinética enzimática, la prevalencia de enzima activa y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionada (véanse, por ej., las tecnologías establecidas por VectraMed, Plainsboro, N.J.). Se pueden usar dichos conectores en la modificación de los polipéptidos de apelina aquí descritos para administración terapéutica.

45 Se pueden producir polipéptidos de apelina por métodos de síntesis peptídica automatizados convencionales o por expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y producir proteínas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

50 Se pueden sintetizar los polipéptidos de apelina de la descripción en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Se dispone comercialmente de diversos sintetizadores automáticos y se pueden usar según protocolos conocidos. También se pueden sintetizar los polipéptidos de apelina de la descripción por tecnología de fase sólida empleando un sintetizador de péptidos ejemplar, tal como un Modelo 433A de Applied Biosystems Inc. Se puede determinar la pureza de cualquier proteína dada, generada a través de síntesis peptídica automatizada o a través de métodos recombinantes, usando análisis de HPLC de fase invertida. Se puede establecer la autenticidad

química de cada péptido por cualquier método bien conocido para los expertos en la técnica.

Como alternativa a la síntesis peptídica automatizada, se puede emplear tecnología del ADN recombinante, en donde se inserta una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de elección en un vector de expresión, transformado o transfectado en una célula huésped apropiada, y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión como se describe aquí más adelante. Se prefieren especialmente los métodos recombinantes para producir polipéptidos más largos.

Se pueden utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión/hospedadores para contener y expresar la secuencia codificante del péptido o la proteína. Éstos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión de virus (por ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ej., Ti o plásmido pBR322); o sistemas de células animales. Los expertos en la técnica son conocedores de diversas técnicas para optimizar la expresión en mamíferos de proteínas. Como células de mamífero que son útiles en producciones de proteínas recombinantes, se incluyen, aunque sin limitación, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los protocolos ejemplares para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados son conocidos para los expertos en la técnica y se describen brevemente aquí a continuación. Los sistemas de hospedadores mamíferos para la expresión de proteínas recombinantes son también bien conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden seleccionar las cepas de células huésped para una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccion que serán útiles para proporcionar actividad de la proteína. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, aunque sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccion que escinde una forma "prepro" de la proteína puede también ser importante para la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Diferentes células huésped, tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138 y similares, tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccion y se pueden seleccionar para asegurar la modificación y el procesado correctos de la proteína extraña introducida.

En la producción recombinante de los polipéptidos de apelina de la descripción, sería necesario emplear vectores que comprendan moléculas polinucleotídicas para codificar las proteínas derivadas de apelina. Los métodos de preparación de dichos vectores, así como de producción de células huésped transformadas con dichos vectores, son bien conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden unir las moléculas polinucleotídicas usadas en dicho intento a un vector, que, en general, incluye un marcador seleccionable y un origen de replicación, para propagación en un hospedador. Estos elementos de las construcciones de expresión son bien conocidos para los expertos en la técnica. En general, los vectores de expresión incluyen ADN codificante de la proteína dada operativamente unido a secuencias reguladoras de la transcripción o la traducción adecuadas, tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Como ejemplos de secuencias reguladoras, se incluyen promotores de la transcripción, operadores o potenciadores, sitios de unión ribosomal del ARNm y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción.

Los términos "vector de expresión", "construcción de expresión" o "casete de expresión" se usan indistintamente en toda esta memoria descriptiva y pretenden incluir cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico codificante de un producto génico en el que parte o todo de la secuencia codificante de ácido nucleico es capaz de transcribirse.

La elección de un vector de expresión adecuado para expresión de los péptidos o polipéptidos de la descripción por supuesto dependerá de la célula huésped específica que se haya de usar, y se encuentra dentro de los conocimientos del experto ordinario. Se describen métodos para la construcción de vectores de expresión de mamíferos, por ejemplo, en EP-A-0367566 y WO 91/18982.

En general, los vectores útiles en la descripción incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNh_c o secuencias de ácido nucleico de ribozimas. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus de tipo SV40; virus del polioma; virus Epstein-Barr; virus del papiloma; virus herpes; virus de la vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN, tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que se han reemplazado genes no esenciales por el gen de interés. Como virus no citopáticos, se incluyen retrovirus (por ej., lentivirus), cuyo ciclo vital conlleva la transcripción inversa del ARN vírico genómico en ADN con posterior integración provírica en el ADN celular del huésped. Se han aprobado los retrovirus para pruebas de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero

incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea de células de empaquetamiento, recogida de partículas víricas del medio de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas víricas) son bien conocidos en la técnica.

Son virus preferidos para ciertas aplicaciones los adenovirus y los virus adeno-asociados (VAA), que son virus de ADN de doble hélice que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. Actualmente, se conocen 12 serotipos diferentes de VAA (VAA1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares. Los VAA recombinantes derivan del parvovirus dependiente VAA2. Se pueden someter los virus adeno-asociados de tipo 1 a 12 a ingeniería para que sean deficientes en replicación y sean capaces de infectar a un amplio espectro de tipos celulares y especies. Tiene además ventajas, tales como estabilidad frente al calor y a los solventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas, y falta de inhibición de la superinfección, lo que permite, por lo tanto, múltiples series de transducciones. Según consta, el virus adeno-asociado puede integrarse en ADN celular humano de un modo específico de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado característica de la infección retrovírica. Además, se han seguido infecciones de virus adeno-asociados de tipo salvaje en cultivo de tejidos en más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un suceso relativamente estable. El virus adeno-asociado puede también funcionar de un modo extracromosómico.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Se han descrito ampliamente los vectores plasmídicos en la técnica y son bien conocidos para los expertos en la técnica. En los últimos años, se han usado vectores plasmídicos como vacunas de ADN para suministrar genes codificantes de antígeno a las células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto, ya que no tienen los mismos problemas de seguridad como los que se producen con muchos de los vectores víricos. Estos plásmidos, sin embargo, al tener un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado en el plásmido. Algunos plásmidos comúnmente usados incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica. Además, se pueden diseñar los plásmidos a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Se pueden suministrar los plásmidos mediante una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, se puede inyectar el plásmido de ADN por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También se puede administrar mediante sprays o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También se puede administrar en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Se pueden dar los plásmidos en una solución acuosa, secalos sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN, incluyendo, aunque sin limitación, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

La expresión requiere aportar señales apropiadas en los vectores, tales como potenciadores/promotores de fuentes tanto víricas como de mamíferos, que se pueden usar para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de interés en células huésped. Normalmente, el ácido nucleico que se está expresando está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias nucleotídicas se unen operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con el ADN que codifica la proteína de interés (es decir, apelina, una variante y similares). Por lo tanto, una secuencia nucleotídica promotora se une operativamente a una secuencia de ADN dada si la secuencia nucleotídica promotora dirige la transcripción de la secuencia.

De forma similar, la frase "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación al ácido nucleico para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la expresión del gen. Se puede usar cualquier promotor que dirija la expresión del ácido nucleico. No se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés sea importante, siempre que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula de interés. Por lo tanto, cuando se aborda una célula humana, es preferible situar la región codificante del ácido nucleico adyacente a, y bajo el control de, un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. Hablando en general, dicho promotor podría incluir un promotor humano o uno vírico. Como promotores comunes, se incluyen, por ej., el promotor del gen precoz inmediato del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor precoz de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, la [beta]-actina, el promotor de la insulina de rata, el promotor de la fosfoglicerol quinasa y el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, todos los cuales son promotores bien conocidos y de fácil adquisición para los expertos en la técnica, y se pueden usar para obtener la expresión de alto nivel de la secuencia codificante de interés. Se contempla también el uso de otros promotores fágicos víricos o de mamíferos, celulares o bacterianos que son bien conocidos en la técnica para conseguir la expresión de una secuencia codificante de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Empleando un promotor con propiedades bien conocidas, se pueden optimizar el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés tras la transfección o transformación. También se pueden usar promotores inducibles.

Otro elemento regulador que se usa en la expresión de proteínas es un potenciador. Éstos son elementos genéticos que aumentan la transcripción a partir de un promotor localizado en una posición distante sobre la misma molécula de

ADN. Cuando una construcción de expresión emplea una inserción de ADNc, se desearía típicamente incluir una secuencia de señal de poliadenilación para efectuar una apropiada poliadenilación del transcrito génico. Cualquier secuencia de señal de poliadenilación reconocida por células de la especie del animal transgénico seleccionada es adecuada para la práctica de la descripción, tal como señales de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana o bovina y de SV40.

Otros polipéptidos que se pueden usar como agonistas del receptor de APJ incluyen los descritos en US 6.492.324, en US 7.635.751, en US 2010221255 o en US 2008182779.

En algunas realizaciones, el agonista del receptor de APJ según la invención describe un apelinomimético.

Tal como se usa aquí, el término "apelinomiméticos" indica moléculas que son funcionalmente equivalentes a la apelina, es decir, moléculas que tienen al menos una de las actividades biológicas de la apelina, tales como, por ejemplo, el efecto hipotensor de la apelina o la reducción de la glucosa plasmática de la apelina. En otras palabras, "apelinomiméticos" indica moléculas capaces de imitar/reproducir los efectos de la apelina.

Se pueden determinar las actividades de los apelinomiméticos por cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la capacidad de una molécula para ser un apelinomimético por la capacidad para mejorar la sensibilidad a la insulina y/o disminuir la glucosa en sangre como la apelina. Por ejemplo, se puede usar una prueba de tolerancia a la glucosa (véase, por ejemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_tolerance_test).

En otro ejemplo, se puede valorar la capacidad de una sustancia para actuar como un apelinomimético por su capacidad para aumentar la Velocidad de Infusión de Glucosa *in vivo*, durante un procedimiento de clamp hiperglucémico en el ensayo descrito en los ejemplos que aquí se dan y por lo demás descrito por DeFronzo RA *et al.*, 1979.

La invención describe composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor de APJ para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes.

Típicamente, se puede combinar el agonista del receptor de APJ con excipientes farmacéuticamente aceptables y eventualmente matrices de liberación mantenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, un diluyente, un material encapsulante o un auxiliar de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, se puede administrar el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas para vía oral, tales como tabletas, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstas pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, tras adición, dependiendo del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Se pueden preparar soluciones que comprendan compuestos de la descripción como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

55

5 Se puede formular el agonista del receptor de APJ en una composición en forma neutra o de sal. Como sales farmacéuticamente aceptables, se incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

10 El vehículo puede ser también un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. Se puede conseguir la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede conseguir la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes antes enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de desecación a vacío y liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

20 Tras la formulación, se administrarán las soluciones de un modo compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente efectivo. Se administran fácilmente las formulaciones en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables antes descritas, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación del fármaco y similares.

25 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, se debería tamponar adecuadamente la solución si es necesario y hacer primeramente que el diluyente líquido sea isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto en tratamiento. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

30 Además de los compuestos de la descripción formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ej., tabletas u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo, y cualquier otra forma actualmente utilizada.

35 La invención describe un método para cribar fármacos para la prevención y el tratamiento de la diabetes, que comprende las etapas consistentes en estudiar una pluralidad de compuestos en cuanto a su capacidad para ser un agonista del receptor de APJ, y seleccionar positivamente los compuestos que sean agonistas del receptor de APJ.

Se han descrito anteriormente métodos para determinar las actividades agonistas de un compuesto para los receptores de APJ.

40 La invención describe un método para tratar la diabetes que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de APJ como se ha descrito anteriormente.

En aún un objeto particular, el agonista del receptor de APJ es la apelina.

En otro objeto, la apelina es la (Pyr¹)apelina-13.

45 Tal como se usa aquí, el término "tratar" o "tratamiento" indica revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección a los que se aplica dicho término, o revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir uno o más síntomas del trastorno o afección a los que se aplica dicho término.

Por consiguiente, la presente invención se relaciona con la (Pyr¹) apelina-13 para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes en humanos, en donde se administra la (Pyr¹)apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración que varía de 10 nmol/kg a 200 nmol/kg al día.

50 La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Para cualquier preparación usada en los métodos de la descripción, se puede estimar inicialmente la cantidad o dosis

terapéuticamente efectiva en un modelo animal, tal como un modelo de diabetes en ratón, para conseguir una concentración deseada. Preferiblemente, la cantidad efectiva de un agonista del receptor de APJ que se esté administrando a un sujeto humano varía entre 10 nmol/kg y 150 nmol/kg al día.

5 En una realización particular, la dosis administrada al sujeto al día puede ser de 10 nmol/kg, 11 nmol/kg, 12 nmol/kg, 13 nmol/kg, 14 nmol/kg, 15 nmol/kg, 16 nmol/kg, 17 nmol/kg, 18 nmol/kg, 19 nmol/kg, 20 nmol/kg, 21 nmol/kg, 22 nmol/kg, 23 nmol/kg, 24 nmol/kg, 25 nmol/kg, 26 nmol/kg, 27 nmol/kg, 28 nmol/kg, 29 nmol/kg, 30 nmol/kg, 31 nmol/kg, 32 nmol/kg, 34 nmol/kg, 35 nmol/kg, 36 nmol/kg, 37 nmol/kg, 38 nmol/kg, 39 nmol/kg, 40 nmol/kg, 41 nmol/kg, 42 nmol/kg, 43 nmol/kg, 44 nmol/kg, 45 nmol/kg, 46 nmol/kg, 47 nmol/kg, 48 nmol/kg, 49 nmol/kg, 50 nmol/kg, 51 nmol/kg, 52 nmol/kg, 53 nmol/kg, 54 nmol/kg, 55 nmol/kg, 56 nmol/kg, 57 nmol/kg, 58 nmol/kg, 59 nmol/kg o 60 nmol/kg, 61 nmol/kg, 62 nmol/kg, 63 nmol/kg, 64 nmol/kg, 65 nmol/kg, 66 nmol/kg, 67 nmol/kg, 68 nmol/kg, 69 nmol/kg, 70 nmol/kg, 71 nmol/kg, 72 nmol/kg, 73 nmol/kg, 74 nmol/kg, 75 nmol/kg, 76 nmol/kg, 77 nmol/kg, 78 nmol/kg, 79 nmol/kg, 80 nmol/kg, 81 nmol/kg, 82 nmol/kg, 83 nmol/kg, 84 nmol/kg, 85 nmol/kg, 86 nmol/kg, 87 nmol/kg, 88 nmol/kg, 89 nmol/kg, 90 nmol/kg, 91 nmol/kg, 92 nmol/kg, 93 nmol/kg, 94 nmol/kg, 95 nmol/kg, 96 nmol/kg, 97 nmol/kg, 98 nmol/kg, 99 nmol/kg, 100 nmol/kg, 101 nmol/kg, 102 nmol/kg, 103 nmol/kg, 104 nmol/kg, 105 nmol/kg, 106 nmol/kg, 107 nmol/kg, 15 108 nmol/kg, 109 nmol/kg, 110 nmol/kg, 111 nmol/kg, 112 nmol/kg, 113 nmol/kg, 114 nmol/kg, 115 nmol/kg, 116 nmol/kg, 117 nmol/kg, 118 nmol/kg, 119 nmol/kg, 120 nmol/kg, 121 nmol/kg, 122 nmol/kg, 123 nmol/kg, 124 nmol/kg, 125 nmol/kg, 126 nmol/kg, 127 nmol/kg, 128 nmol/kg, 129 nmol/kg, 130 nmol/kg, 131 nmol/kg, 132 nmol/kg, 133 nmol/kg, 134 nmol/kg, 135 nmol/kg, 136 nmol/kg, 137 nmol/kg, 138 nmol/kg, 139 nmol/kg, 140 nmol/kg, 141 nmol/kg, 142 nmol/kg, 143 nmol/kg, 144 nmol/kg, 145 nmol/kg, 146 nmol/kg, 147 nmol/kg, 148 nmol/kg, 149 nmol/kg, 150 nmol/kg, 151 nmol/kg, 152 nmol/kg, 153 nmol/kg, 154 nmol/kg, 155 nmol/kg, 156 nmol/kg, 157 nmol/kg, 158 nmol/kg, 20 159 nmol/kg, 160 nmol/kg, 161 nmol/kg, 162 nmol/kg, 163 nmol/kg, 164 nmol/kg, 165 nmol/kg, 166 nmol/kg, 167 nmol/kg, 168 nmol/kg, 169 nmol/kg, 170 nmol/kg, 171 nmol/kg, 172 nmol/kg, 173 nmol/kg, 174 nmol/kg, 175 nmol/kg, 176 nmol/kg, 177 nmol/kg, 178 nmol/kg, 179 nmol/kg, 180 nmol/kg, 181 nmol/kg, 182 nmol/kg, 183 nmol/kg, 184 nmol/kg, 185 nmol/kg, 186 nmol/kg, 187 nmol/kg, 188 nmol/kg, 189 nmol/kg, 190 nmol/kg, 191 nmol/kg, 192 nmol/kg, 25 193 nmol/kg, 194 nmol/kg, 195 nmol/kg, 196 nmol/kg, 197 nmol/kg, 198 nmol/kg, 199 nmol/kg y 200 nmol/kg.

En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada al sujeto varía de 10 nmol/kg a 150 nmol/kg y puede ser cualquier dosis que vaya de 10 nmol/kg a 200 nmol/kg que esté en la lista anterior.

En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada al sujeto varía de 10 nmol/kg a 150 nmol/kg y puede ser cualquier dosis que vaya de 10 nmol/kg a 150 nmol/kg que esté en la lista anterior.

30 En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada al sujeto varía de 10 nmol/kg a 60 nmol/kg y puede ser cualquier dosis que vaya de 10 nmol/kg a 60 nmol/kg que esté en la lista anterior.

En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada al sujeto varía de 20 nmol/kg a 40 nmol/kg y puede ser cualquier dosis que vaya de 20 nmol/kg a 40 nmol/kg que esté en la lista anterior.

35 En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada al sujeto es de aproximadamente 30 nmol/kg; por ejemplo, es de 30 nmol/kg.

En algunas realizaciones, se administra dicho agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, por vía parenteral, por ej., la vía intravenosa.

40 En algunas realizaciones en donde se administra dicho agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, por vía parenteral, se puede administrar la dosis diaria perfundiendo a dicho sujeto durante un período de tiempo que va de 30 minutos a 6 horas.

En algunas realizaciones en donde se administra dicho agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, por vía parenteral, se puede administrar la dosis diaria perfundiendo a dicho sujeto durante un período de tiempo que va de 60 minutos a 4 horas.

45 En algunas realizaciones en donde se administra dicho agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, por vía parenteral, se puede administrar la dosis diaria perfundiendo a dicho sujeto durante un período de tiempo que va de 1,5 horas a 2,5 horas.

En algunas realizaciones en donde se administra dicho agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, por vía parenteral, se puede administrar la dosis diaria perfundiendo a dicho sujeto durante un período de 2 horas.

50 En otra realización particular, la dosis administrada al sujeto puede ser una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada siete días, cada ocho días, cada nueve días o cada diez días.

En una realización, se administra el agonista del receptor de APJ, por ej., apelina o (Pyr¹)apelina-13, de forma crónica.

Por consiguiente, la invención describe un kit de partes que es adecuado para uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende un agonista del receptor de APJ y un fármaco antidiabético.

Por lo tanto, en una realización, la invención describe (i) un agonista del receptor de APJ, como se ha definido anteriormente, y (ii) al menos un fármaco antidiabético, cada uno de (i) y (ii) como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la diabetes.

5 Tal como se usa aquí, el término "fármaco antidiabético" se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que puede reducir los niveles de glucosa en la sangre y que, por lo tanto, es útil para prevenir o tratar la diabetes. Típicamente, los fármacos antidiabéticos incluyen (1) insulina, así como análogos de insulina (por ejemplo, insulina lispro comercializada por Eli Lilly como "Humalog", insulina aspart comercializada por Novo Nordisk o insulina glulisina comercializada por Sanofi-Aventis) o variantes; (2) agentes que aumentan la cantidad de insulina segregada por el páncreas (por ej., agonistas del receptor del péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), inhibidores de DPP-4 y sulfonilureas);
 10 (3) agentes que aumentan la sensibilidad de los órganos diana a la insulina (por ej., biguanidas y tiazolidinodionas), y (4) agentes que disminuyen la velocidad a la cual se absorbe la glucosa desde el tracto gastrointestinal (por ej., inhibidores de la alfa-glucosidasa).

En una realización particular, el fármaco antidiabético es insulina. La insulina humana es una hormona peptídica de 51 aminoácidos producida en los islotes de Langerhans en el páncreas.

15 En otra realización particular, el fármaco antidiabético es un análogo o variante de insulina.

La insulina humana tiene tres grupos amino primarios: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ϵ -amino de LysB29. Se conocen varios análogos o variantes de insulina que están sustituidos en uno o más de estos grupos en la técnica anterior, como se describe en WO2007/074133. Como ejemplos de análogos de insulina que se contemplan mediante la descripción, se incluyen la insulina modificada en la posición de aminoácido 29 de la cadena B de la insulina humana nativa y opcionalmente en otras posiciones. Por ejemplo, un análogo de insulina preferido es la insulina lispro comercializada por Eli Lilly como "Humalog" y descrita en la patente estadounidense 5.514.646. Dicho análogo de insulina es uno en donde B28 es lisina y B29 es prolina, es decir, una inversión de la secuencia de aminoácidos de la insulina humana nativa en las posiciones 28 y 29 de la cadena B.

20 Se pueden preparar los análogos de insulina de esta descripción por cualquiera de una variedad de técnicas de síntesis peptídica reconocidas, incluyendo los métodos clásicos (solución), los métodos de fase sólida, los métodos semisintéticos y los métodos de disponibilidad más reciente de ADN recombinante.

En una realización particular, el fármaco antidiabético es un agonista del receptor del péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1).

30 Como ejemplos de agonistas del receptor de GLP-1 que se contemplan mediante la descripción, se incluyen, aunque sin limitación, exenatida o formulaciones específicas de la misma, como se describe, por ejemplo, en WO2008061355, WO2009080024, WO2009080032, liraglutida, taspoglutida (R-1583), albiglutida, lixisenatida o los que se han descrito en WO 98/08871, WO2005027978, WO2006037811, WO2006037810 por Novo Nordisk A/S, en WO 01/04156 por Zealand o en WO 00/34331 por Beaufour-Ipsen, acetato de pramlintida (Symlin; Amylin Pharmaceuticals), GLP-1 inhalable (MKC-253 de MannKind) AVE-0010, BIM-51077 (R-1583, ITM-077), PC-DAC:exendina-4 (un análogo de exendina-4 que se une covalentemente a albúmina humana recombinante), exendina biotinilada (WO2009107900), una formulación específica de exendina-4 como se describe en US2009238879, CVX-73, CVX-98 y CVx-96 (análogos de GLP-1 que se unen covalentemente a un anticuerpo monoclonal que tiene sitios de unión específica para el péptido GLP-1), CNTO-736 (un análogo de GLP-1 que se une a un dominio que incluye la porción Fc de un anticuerpo), PGC-GLP-1 (GLP-1 unido a un nanosoporte), agonistas o moduladores, como se describe, por ejemplo, en D. Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007) 943, los descritos en WO2006124529, WO2007124461, WO2008062457, WO2008082274, WO2008101017, WO2008081418, WO2008112939, WO2008112941, WO2008113601, WO2008116294, WO2008116648, WO2008119238, WO2008148839, US2008299096, WO2008152403, WO2009030738, WO2009030771, WO2009030774, WO2009035540, WO2009058734, WO2009111700, WO2009125424, WO2009129696, WO2009149148, péptidos, por ejemplo obinsepitida (TM-30338), análogos oralmente activos de GLP-1 (por ej., NN9924 de Novo Nordisk), agonistas del receptor de amilina, como se describe, por ejemplo, en WO2007104789, WO2009034119, análogos del GLP-1 humano, como se describe en WO2007120899, WO2008022015, WO2008056726, péptidos pegilados quiméricos que contienen residuos tanto de GLP-1 como de glucagón, como se describe, por ejemplo, en WO2008101017, WO2009155257, WO2009155258, derivados glicosilados de GLP-1, como se describe en WO2009153960, e ingredientes hipoglucémicos oralmente activos.

En una realización particular, el agonista del receptor de GLP-1 es exendina-4 o exenatida.

Se describe la exendina-4 en la Patente Estadounidense 5.424.286 y es una hormona que se encuentra en la saliva del monstruo de Gila que exhibe propiedades biológicas similares al péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1) humano, un regulador del metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina.

55 La exenatida es un péptido de 39 aminoácidos y una versión sintética de la exendina-4, que aumenta la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células β pancreáticas y suprime la secreción inapropiadamente elevada de glucagón.

En otra realización, el agonista del receptor de GLP-1 es liraglutida.

En otra realización particular, el fármaco antidiabético es un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-IV (DDP-4).

Como ejemplos de inhibidores de DDP-4 que se contemplan mediante la descripción, se incluyen, aunque sin limitación, vildagliptina (LAF-237), sitagliptina (MK-0431), fosfato de sitagliptina, saxagliptina (BMS-477118), GSK-823093, PSN-9301, SYR-322, SYR-619, TA-6666, TS-021, GRC-8200 (melogliptina), GW-825964X, KRP-104, DP-893, ABT-341, ABT-279 u otra sal de la misma, S-40010, S-40755, PF-00734200, BI-1356, PHX-1149, DSP-7238, benzoato de alogliptina, linagliptina, melogliptina, carmegliptina o los compuestos descritos en WO2003074500, WO2003106456, WO2004037169, WO200450658, WO2005037828, WO2005058901, WO2005012312, WO2005012308, WO2006039325, WO2006058064, WO2006015691, WO2006015701, WO2006015699, WO2006015700, WO2006018117, WO2006099943, WO2006099941, JP2006160733, WO2006071752, WO2006065826, WO2006078676, WO2006073167, WO2006068163, WO2006085685, WO2006090915, WO2006104356, WO2006127530, WO2006111261, US2006890898, US2006803357, US2006303661, WO2007015767 (LY-2463665), WO2007024993, WO2007029086, WO2007063928, WO2007070434, WO2007071738, WO2007071576, WO2007077508, WO2007087231, WO2007097931, WO2007099385, WO2007100374, WO2007112347, WO2007112669, WO2007113226, WO2007113634, WO2007115821, WO2007116092, US2007259900, EP1852108, US2007270492, WO2007126745, WO2007136603, WO2007142253, WO2007148185, WO2008017670, US2008051452, WO2008027273, WO2008028662, WO2008029217, JP2008031064, JP2008063256, WO2008033851, WO2008040974, WO2008040995, WO2008060488, WO2008064107, WO2008066070, WO2008077597, JP2008156318, WO2008087560, WO2008089636, WO2008093960, WO2008096841, WO2008101953, WO2008118848, WO2008119005, WO2008119208, WO2008120813, WO2008121506, WO2008130151, WO2008131149, WO2009003681, WO2009014676, WO2009025784, WO2009027276, WO2009037719, WO2009068531, WO2009070314, WO2009065298, WO2009082134, WO2009082881, WO2009084497, WO2009093269, WO2009099171, WO2009099172, WO2009111239, WO2009113423, WO2009116067, US2009247532, WO2010000469, WO2010015664.

En una realización particular, el inhibidor de DDP-4 es sitagliptina.

Habría que observar además que el inhibidor de DDP-4 puede administrarse en combinación con clorhidrato de metformina (por ej., Janumet(R), una combinación sólida de fosfato de sitagliptina con clorhidrato de metformina, o Eucreas(R), una combinación sólida de vildagliptina con clorhidrato de metformina).

En aún otra realización particular, el fármaco antidiabético es un agonista del receptor de GPR40.

Como ejemplos de agonistas del receptor de GPR40 que se contemplan mediante la descripción, se incluyen, aunque sin limitación, los descritos, por ejemplo, en WO2007013689, WO2007033002, WO2007106469, US2007265332, WO2007123225, WO2007131619, WO2007131620, WO2007131621, US2007265332, WO2007131622, WO2007136572, WO2008001931, WO2008030520, WO2008030618, WO2008054674, WO2008054675, WO2008066097, US2008176912, WO2008130514, WO2009038204, WO2009039942, WO2009039943, WO2009048527, WO2009054479, WO2009058237, WO2009111056, WO2010012650, WO2011161030, WO2012004269, WO2012010413.

En una realización particular, el agonista del receptor de GPR40 es TAK-875 o AMG 837.

En otra realización particular, el fármaco antidiabético es una tiazolidinodiona, por ejemplo, troglitazona, ciglitazona, pioglitazona, rosiglitazona o los compuestos descritos en WO 97/41097 por la Dr. Reddy's Research Foundation, especialmente 5-[[4-[(3,4-dihidro-3-metil-4-oxo-2-quinazolinilmetoxi]fenil]metil]-2,4-tiazolidinodiona.

En otra realización particular, el fármaco antidiabético es una biguanida, por ejemplo, metformina o una de sus sales.

Otros fármacos antidiabéticos que se contemplan por la descripción incluyen, aunque sin limitación, los descritos, por ejemplo, en US 2012/0004166.

La presente invención también describe un método para prevenir o tratar la diabetes que comprende administrar a un paciente que lo necesite un kit de partes que comprende un agonista del receptor de APJ y un fármaco antidiabético.

La presente invención además describe el uso de un agonista del receptor de APJ para aumentar la eficacia clínica de un fármaco antidiabético. Tal como se usa aquí, el término "aumentar la eficacia clínica" se refiere a una mejora de la acción antiinflamatoria y/o a preservar la viabilidad y función de las células β pancreáticas.

La invención será además ilustrada por medio de las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Efecto de la apelina sobre la sensibilidad a la insulina: prueba de concepto en voluntarios sanos

Material y métodos

Se describirá a continuación el protocolo clínico concebido para valorar la efectividad terapéutica de una composición farmacéutica descrita en la presente memoria descriptiva.

Tipo de prueba

Esta prueba es un estudio cruzado, doble ciego, controlado con placebo, monocéntrico, exploratorio, de Fase 1.

5 Población de la prueba

Criterios de inclusión

Hombres con una edad de 18 a 40.

IMC de entre 25 y 30 kg/m² (límites excluidos).

10 Sin ninguna enfermedad crónica conocida y ninguna terapia con fármacos en curso (sin fármacos en los 30 días anteriores a la visita de inclusión).

Electrocardiograma no patológico.

Ritmo cardíaco en reposo de entre 50 y 80 latidos por minuto.

Recuento Completo de Sangre (CBC) sin anomalía significativa según el investigador.

Pruebas de función hepática sin anomalía clínicamente significativa según el investigador.

15 Pruebas de función renal sin anomalía clínicamente significativa según el investigador.

Electrolitos séricos sin anomalía clínicamente significativa según el investigador.

Glucosa en sangre en ayunas inferior a 110 mg/dl.

HbA1c en el intervalo normal (4-6%).

Buena red venosa periférica (antebrazo y dorso de la mano).

20 Voluntario que permite el almacenamiento de sus muestras de sangre en un banco de sueros.

Persona sedentaria o que practica una actividad física ocasional.

Capaz de firmar un consentimiento informado.

Afiliado a la Seguridad Social Nacional Francesa.

Criterios de no inclusión

25 Factores de riesgo, tratamiento o electrocardiograma según la recomendación de ICH E14 "Clinical Evaluation of QT / QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs"

- Medición repetida de QTc > 450 ms

- Factor de riesgo TdP: infarto de miocardio, hipocalcemia, historia familiar de síndrome de QT largo

Historia personal de cáncer.

30 Serología de VIH positiva.

Serología de Hepatitis B positiva.

Serología de Hepatitis C positiva.

Deterioro cognitivo o enfermedad mental (a decisión del investigador).

Consumo excesivo crónico de alcohol (consumo > 30 g / día o 210 g / semana).

35 Persona bajo protección judicial o guardia y custodia.

Sujeto con una presión sanguínea mayor de 140/90 mmHg.

Fumador de > 10 cig. / día y no puede interrumpirlo durante 24 horas.

Sujeto en período de exclusión de otro protocolo.

Diseño de la prueba

Valoramos la influencia de administraciones intravenosas de (pyr1)-Apelina-13 sobre la sensibilidad a la insulina usando la técnica de clamp euglucémico hiperinsulinémico desarrollada por DeFronzo *et al.*, 1979.

5 Se incluyeron dos grupos de 8 voluntarios sanos varones con sobrepeso (IMC 25-30 kg/m²) en este estudio. Se administró una sola infusión intravenosa continua de 2 horas de (pyr1)-Apelina-13 a cada voluntario.

Se incluyó a los primeros 8 voluntarios en el grupo de baja dosis. Se les perfundió con una dosis de 9 nmol/kg de (pyr1)-Apelina-13.

10 El comité monitorizador del estudio revisó entonces los riesgos con respecto a los datos de seguridad observados en los primeros 8 voluntarios y cualquier información publicada con probabilidad de causar un cambio en la estimación de los riesgos. Se permitió la inclusión de los siguientes 8 voluntarios tras autorización escrita del comité monitorizador del estudio.

Se incluyó a los siguientes 8 voluntarios en el grupo de dosis alta. Se les perfundió con una dosis de 30 nmol/kg de (pyr1)-Apelina-13.

15 Se sometió a cada voluntario a dos clamps espaciados en 7 a 21 días: un clamp de referencia durante el cual se perfundió una solución de placebo (solución de perfusión) y un clamp de "Apelina" durante el cual se perfundió una infusión de (pyr1)-Apelina-13. Se determinó aleatoriamente la secuencia de administración de los productos estudiados (placebo o apelina) y se hizo en doble ciego.

El estudio clínico incluía cuatro visitas: V1: visita de inclusión V2: primer clamp V3: segundo clamp V4 visita de final del estudio.

20 Gráfico de flujo

	Información	Inclusión V1 (3 a 30 días tras información)	Clamp 1 V2 (V1 + 3 a 15 días)	Clamp 2 V3 (V2 + 7 a 21 días)	Fin del estudio V4 (V3 + 7 a 15 días)
Tipo de visita	Llamada telefónica	Consulta médica	Un día de hospitalización	Un día de hospitalización	Consulta médica
Información por escrito	Enviada	✓			
Consentimiento informado		✓			
Examen clínico		✓	✓	✓	✓
Análisis de sangre		✓	✓	✓	✓
Examen físico		✓	✓	✓	✓
Clamp			✓	✓	
Infusión de placebo			Según aleatorización		
Infusión de apelina			Según aleatorización		
Sucesos adversos			✓	✓	✓

Técnica del clamp hiperinsulinémico euglucémico

25 - Se perfundió insulina (Actrapid®, NovoNordisk, Copenhague, Dinamarca) durante 4 horas a una velocidad suprafisiológica constante (1 mU.kg⁻¹.min⁻¹), para obtener como resultado la completa inhibición de la producción hepática de glucosa.

- Se midió el nivel de glucosa en sangre cada 5 min. y se mantuvo durante 4 horas a un valor fisiológico constante (5 mmol/l) adaptando la velocidad de infusión de una solución de glucosa al 20%. La velocidad de infusión de la glucosa (VIG) era el principal criterio de evaluación, y se reportó en el impreso del informe del caso cada 5 min.

5 - Se alcanzó un primer estado estacionario desde el 90^o al 120^o min., lo que refleja la sensibilidad a la insulina "basal" de los tejidos periféricos del voluntario.

- Desde el 120^o min. al 240^o min., se añadió una perfusión continua del producto de investigación (Apelina o placebo).

- Se alcanzó un segundo estado estacionario desde el 210^o al 240^o min., lo que refleja la sensibilidad a la insulina del "producto de Investigación" de los tejidos periféricos del voluntario.

Criterio de valoración primario

10 El criterio de valoración primario (deltaVIG) era la diferencia entre la VIG medida durante el estado estacionario que acaba la fase de perfusión del "producto de investigación" (VIGperfusión) y la VIG medida durante el estado estacionario que acaba la fase "basal" (VIGbasal).

Delta VIG = VIGperfusión - VIGbasal

VIG perfusión = media de los valores de VIG medidos a 210, 215, 220, 225, 230, 235 y 240 min.

15 VIG basal = media de los valores de VIG medidos a 90, 95, 100, 105, 110, 115 y 120 min.

Criterios de valoración secundarios

- Cálculo del índice de sensibilidad a la insulina (Is) medido en el estado estacionario "basal" y el estado estacionario del "producto de investigación"

Is = M / (G x DeltaI).

20 Junto con

M = media de los siete valores de velocidad de infusión de glucosa medidos en cada estado estacionario (basal: 90-120 min. y producto: 210-240 min.)

G = media de 7 valores de glucosa en plasma medidos en cada estado estacionario (basal: 90-120 min. y producto: 210-240 min.)

25 DeltaI = diferencia entre la insulina en ayunas y la media de los cuatro valores de insulina plasmática medidos en cada estado estacionario (banco de suero de los tubos de ensayo recogido cada 10 min, durante las fases de estado estacionario basal: 90-120 min. y estado estacionario del producto: 210-240 min.)

- Variaciones de presión sanguínea sistólica

- Variaciones de presión sanguínea diastólica

30 - Variaciones de ritmo cardíaco

- Registro de cambios en el ECG

- Signos clínicos de intolerancia / alergia / toxicidad

- Insulina plasmática en todos los tiempos de toma de muestras

- Glucagón plasmático en todos los tiempos de toma de muestras

35 - Apelina plasmática en todos los tiempos de toma de muestras

- Leptina plasmática en todos los tiempos de toma de muestras

- Adiponectina plasmática en todos los tiempos de toma de muestras

Consideraciones estadísticas

Tamaño de muestra

40 Para valorar el criterio de valoración primario, el análisis estadístico de este estudio cruzado se basó en un modelo mixto lineal. En este estudio exploratorio, se disponía de pocos datos para cuantificar la variación del criterio de valoración primario en humanos. Hipotetizamos aproximadamente un 20% de aumento de la velocidad de infusión de glucosa a la dosis de Apelina que causa el máximo efecto sobre el metabolismo de carbohidratos, a saber, un efecto

del mismo orden de magnitud que el observado en roedores.

5 Según los datos publicados por Muniyappa *et al.* que muestran que el coeficiente de variación de la velocidad de infusión de glucosa durante un clamp hiperinsulinémico euglucémico era 0,1, y usando el programa PASS, para una potencia del 86% en una prueba cruzada con un aumento esperado del 20% de la velocidad de infusión de glucosa, se necesitaron 8 sujetos para cada dosis estudiada. Se incluyó, por lo tanto, a un total de 16 sujetos en este estudio. Este cálculo se basó en las siguientes referencias estadísticas:

- Julious, Steven A. 2004. 'Tutorial in Biostatistics. Sample sizes for clinical trials with Normal data.' *Statistics in Medicine*, 23:1921-1986.

- Senn, Stephen. 2002. *Cross-over Trials in Clinical Research*. Segunda Edición. John Wiley & Sons. New York.

10 En base a estudios previos que valoraban el efecto de diferentes moléculas, este tamaño de muestra de 8 voluntarios para cada dosis seleccionada parecía apropiado para destacar una diferencia significativa sobre el criterio de valoración primario.

Se reemplazó a los voluntarios que interrumpieron precozmente el estudio.

Análisis estadístico

15 Se realizó un análisis estadístico "según protocolo". Se hizo la descripción por grupo (Apelina o placebo) y grupo x período. El análisis de los efectos "grupo", "período" e "interacción grupo x período" se basó en un modelo mixto lineal que permitía analizar adecuadamente el diseño cruzado y simultáneamente estimar los tres efectos antes mencionados.

20 - Si se destaca una interacción entre grupos y períodos, lo que indica un potencial efecto de arrastre, se hicieron comparaciones entre grupos sólo en el primer período. Al ser la prueba de la interacción período x grupo menos potente, se fijó el nivel de significación en 0,10. En este caso, sólo se introdujo el efecto "grupo" en el modelo de regresión para valorar la diferencia en efecto entre los dos grupos. Aunque esta comparación limitada al primer período sólo limita la potencia de la prueba estadística, este análisis comparativo proporcionó indicaciones acerca del efecto de la apelina.

25 - Si no se destacó ninguna interacción entre el grupo y el período al nivel de significación de 0,10, se retuvieron los dos períodos en la comparación entre grupos. En este caso, el modelo de regresión tomó en cuenta los datos repetidos para el mismo voluntario (1º y 2º período) introduciendo un efecto aleatorio relacionado con el voluntario y se ajusta la estimación del efecto "grupo" en un posible efecto "período".

Se interpretaron los resultados por separado para cada dosis de (pyr1)-Apelina-13.

30 Se analizó el criterio de valoración primario según la estrategia descrita en el párrafo anterior.

Se analizaron los criterios de valoración secundarios cuantitativos según la misma estrategia que en el criterio de valoración primario.

35 Se describieron los criterios de valoración de protección y seguridad (signos clínicos de intolerancia, alergia y toxicidad) para cada grupo (placebo/apelina) y para cada dosis de (pyr1)-Apelina-13. Se reportó sistemáticamente la severidad de estos sucesos.

Resultados

40 Las características clínicas de los voluntarios sanos con sobrepeso incluidos en esta prueba eran las siguientes: edad $32,8 \pm 6,8$ años, Índice de masa corporal $27,60 \pm 1,42$ kg/m², circunferencia de la cintura $99,25 \pm 4,70$ cm, grasa corporal $23,94 \pm 3,11\%$, glucosa en sangre en ayunas $0,94 \pm 0,08$ g/l, HbA1c $5,44 \pm 0,25\%$, colesterol total $1,84 \pm 0,25$ mg/dl, HDL colesterol $0,46 \pm 0,06$ mg/dl, LDL colesterol $1,16 \pm 0,24$ mg/dl, triglicéridos $1,01 \pm 0,63$ mg/dl, presión sanguínea sistólica $119,6 \pm 8,5$ mm Hg, presión sanguínea diastólica $73,1 \pm 7,7$ mm Hg, ritmo cardíaco $62,4 \pm 6,8$ lpm, intervalo QTc 412 ± 12 ms.

45 A bajas dosis (9 nmol/kg), la administración de apelina dio como resultado un aumento no significativo en Δ VIG (diferencia en la Velocidad de Infusión de la Glucosa) versus el placebo ($+ 2,21 \pm 0,54$ vs $+1,57 \pm 0,53$ + mg/kg/min., $p = 0,06$). Sin embargo, se observó una mejora significativa en la sensibilidad a la insulina con una dosis de 30 nmol/kg (Δ VIG: $+ 1,72 \pm 0,47$ mg/kg/min, con apelina versus $+ 0,89 \pm 0,62$ mg/kg/min. para el placebo, $p = 0,03$). No se ha observado ningún efecto colateral en relación con la administración del fármaco, y especialmente ningún efecto colateral severo. Específicamente, la administración de apelina no influyó en el ritmo cardíaco, la presión sanguínea o el intervalo QTc.

50

Conclusión

Estos resultados demuestran el efecto sensibilizante a la insulina de (Pyr1)-Apelina-13 en humanos sanos y abren nuevas perspectivas para la investigación y el desarrollo de alternativas terapéuticas dirigidas a la resistencia a la insulina en sujetos diabéticos de tipo 2.

5 **Referencias:**

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que esta invención pertenece.

DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979, 237(3):E214-23.

10 Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 294(1):E15-26.

REIVINDICACIONES

1. La (Pyr1) apelina-13 para uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes en humanos, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración que varía de 10 nmol/kg a 200 nmol/kg al día.
2. La (Pyr1) apelina-13 para uso según la reivindicación 1, en donde la diabetes es la diabetes de tipo 2.
- 5 3. La (Pyr1) apelina-13 para uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración que varía de 20 nmol/kg a 40 nmol/kg al día.
4. La (Pyr1) apelina-13 para uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto que lo necesite a una concentración de 30 nmol/kg al día.
- 10 5. La (Pyr1) apelina-13 para uso según las reivindicaciones 1 a 4, en donde se administra la (Pyr1) apelina-13 a un sujeto por vía intravenosa.