



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 113**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04701379 .2**

96 Fecha de presentación : **12.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1581248**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Modificación del comportamiento alimentario y control del peso por oxintomodulina.**

30 Prioridad: **10.01.2003 GB 0300571**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.10.2011**

73 Titular/es: **IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED**  
**52 Prince's Gate Exhibition Road**  
**London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es: **Bloom, Stephen;**  
**Ghatei, M.A.;**  
**Small, C.J. y**  
**Dakin, C.L.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 113 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

Modificación del comportamiento alimentario y control del peso por oxintomodulina

**Introducción**

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para su uso en la pérdida de peso en animales mamíferos.

**Antecedentes de la invención**

Una de las enfermedades con la mayor incidencia pero que carece de tratamiento eficaz es la obesidad. Es una afección debilitante que reduce la calidad de vida y aumenta sustancialmente el riesgo de otras enfermedades.

10 En Estados Unidos se considera en la actualidad que el 25 % de la población adulta es clínicamente obesa. Se ha estimado que 45.000 millones de dólares de los costes de cuidados sanitarios de Estados Unidos u 8 % por año del gasto de cuidados sanitarios total, es un resultado directo de la obesidad. En Europa el problema está creciendo. Se ha predicho que sin nuevos enfoques más del 20 % de la población del Reino Unido será clínicamente obesa en 2005. El hecho de que la obesidad sea una enfermedad metabólica está reconociéndose de forma creciente por la profesión médica y las autoridades sanitarias. Existe, sin embargo, una escasez de fármacos eficaces y seguros que  
15 puedan usarse junto con dieta y ejercicio para el control a largo plazo de la obesidad.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar tales fármacos y también proporcionar medios para identificar y desarrollar adicionalmente tales fármacos.

20 El preproglucagón es un polipéptido de 160 aminoácidos que se escinde de una manera específica de tejido por prohormona convertasa 1 y 2 dando lugar a varios productos con una diversidad de funciones tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en tejidos periféricos. En el intestino y en el SNC, los principales productos post-traduccionales de escisión de preproglucagón son el péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), péptido de tipo glucagón 2 (GLP-2), glicentina y oxintomodulina (OXM), como se muestra en la Figura A. Aunque se ha mostrado que GLP-1 y GLP-2 inhiben el consumo de alimentos, no se ha demostrado tal papel en seres humanos para el péptido definido OXM. La importancia de OXM como un péptido biológicamente activo en seres humanos no se ha demostrado.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención se basa en las observaciones sorprendentes de los inventores de que el péptido OXM puede inhibir el consumo de alimentos, reducir el peso y aumentar el gasto de energía en seres humanos y también que la infusión de OXM suprime grelina en plasma en ayunas.

30 La presente invención proporciona una composición para su uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento del exceso de peso en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar una composición que comprende OXM a un mamífero. El mamífero probablemente necesite prevención o tratamiento de exceso de peso. La pérdida de peso puede ser cosmética. La composición que comprende OXM se administrará en una concentración eficaz.

35 La presente invención también proporciona una composición para su uso en los siguientes procedimientos de tratamiento de un sujeto: un procedimiento para reducir el consumo de calorías en un sujeto, un procedimiento para reducir el apetito en un sujeto, un procedimiento para reducir el consumo de alimentos en un sujeto, un procedimiento para control de peso o tratamiento en un sujeto, un procedimiento para reducción o prevención de  
40 obesidad y un procedimiento para aumentar el gasto de energía; en particular uno cualquiera o más de los siguientes: prevenir y reducir el aumento de peso; inducir y promover la pérdida de peso; y reducir la obesidad según se mide por el índice de masa corporal. Los procedimientos incluyen control de uno cualquiera o más de apetito, saciedad, hambre y gasto de energía, en particular uno cualquiera o más de los siguientes: reducir, suprimir e inhibir el apetito; inducir, aumentar, potenciar y promover la saciedad y las sensaciones de saciedad; y reducir, inhibir y suprimir el hambre y las sensaciones de hambre; y aumentar el gasto de energía. Los procedimientos incluyen  
45 adicionalmente mantener uno cualquiera o más de un peso corporal deseado, un índice de masa corporal deseado, una apariencia deseada y buena salud. En todos los procedimientos anteriores OXM se administra a un sujeto, generalmente por una vía periférica de administración.

50 La presente invención también proporciona una composición para su uso en un procedimiento para mejorar el perfil lipídico en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de OXM. Una mejora en el perfil lipídico incluye, pero sin limitación, al menos un procedimiento para reducir los niveles de colesterol, reducir los niveles de triglicéridos y aumentar los niveles de colesterol HDL. La OXM puede administrarse periféricamente, tal como en una dosis sencilla o dividida.

En otra realización, se desvela en el presente documento una composición para su uso en un procedimiento para aliviar una afección o trastorno que puede aliviarse reduciendo la disponibilidad de nutrientes y/o aumentando el gasto de energía. El procedimiento incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de OXM.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende OXM y un vehículo farmacéuticamente adecuado, en una forma adecuada para administración oral, rectal, parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa, por ejemplo bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación. Si está en forma farmacéutica unitaria, la dosis por unidad puede ser, por ejemplo, como se describe posteriormente o según se calcula basándose en las dosis por kilogramo dadas posteriormente.

La presente invención también incluye OXM o un agonista del mismo para su uso en la fabricación de un medicamento para administración por una vía periférica al cerebro para cualquiera de los procedimientos de tratamiento descritos anteriormente. Los ejemplos de vías periféricas incluyen administración oral, rectal, parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa, por ejemplo bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación. Se proporcionan posteriormente cantidades de dosis preferidas de OXM para los medicamentos.

La presente invención proporciona un procedimiento para pérdida de peso cosmética en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar una composición que comprende OXM a un mamífero. En esta circunstancia, la pérdida de peso es puramente para los fines de apariencia cosmética.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso, en combinación, de OXM y otro agente que tiene una influencia de cualquier modo sobre el peso y/o el consumo de alimentos, por ejemplo, un agente que tiene uno cualquiera o más de los siguientes efectos: reduce el consumo de alimentos y/o reduce el hambre, reduce el peso, reduce o previene la obesidad, aumenta el gasto de energía o reduce la disponibilidad de nutrientes en un mamífero, especialmente un ser humano. El otro agente, es por ejemplo, GLP-1 o un agonista del mismo receptor o PYY o un agonista del mismo u otra sustancia que es o deriva de una sustancia que influye en el alimento de forma natural, por ejemplo, amilina, leptina, exendina-4, o agonistas de las mismas. Si se desea, puede usarse más de un agente adicional en combinación con OXM, por ejemplo, puede usarse GLP-1 o un agonista del mismo y PYY o un agonista del mismo. (Se entenderá que una referencia a una sustancia "o un agonista de la misma" incluye mezclas de las sustancias y uno o más agonistas de las mismas y también mezclas de dos o más agonistas).

En los procedimientos de la invención, OXM debe administrarse en una cantidad eficaz para conseguir el resultado deseado, así como cualquier otro agente usado en combinación con OXM. En cada caso, el sujeto, generalmente un ser humano, puede tener sobrepeso y/o puede ser diabético.

### **Breve descripción de las figuras**

La Figura A es una representación gráfica de preproglucagón y sus partes componentes.

La Figura 1 es una comparación de los efectos de productos relacionados y derivados de proglucagón iPVN e ICV en el consumo de alimentos en ratas en ayunas. La Figura 1A ilustra el consumo de alimento acumulativo (g) hasta 8 horas después de inyección ICV de GLP-1, OXM, glucagón o glicentina (todos 3 nmoles) en animales en ayunas. \*,  $P < 0,05$  frente a control de solución salina. La Figura 1B ilustra el consumo de alimentos acumulativo (g) hasta 24 horas después de una inyección iPVN aguda de GLP-1, OXM, (ambas 1 nmol) o exendina-4 (0,03 nmoles) en animales en ayunas. \*,  $P < 0,01$  frente a control de solución salina para todos los grupos a 1, 2 y 4 horas. \*,  $P < 0,05$  frente a control de solución salina para exendina-4 sólo a las 8 horas.

La Figura 2 muestra dos gráficas de los efectos de OXM ICV e iPVN en el consumo de alimentos en ratas en ayunas. Figura 2A, consumo de alimentos acumulativo (g) hasta 8 horas después de una inyección ICV aguda de OXM (0,3, 1, 3 o 10 nmoles). Figura 2B, consumo de alimentos acumulativo (g) hasta 8 horas después de una inyección iPVN aguda de OXM (0,1, 0,3 o 1,0 nmoles) en animales en ayunas. \*,  $P < 0,05$  frente a control de solución salina.

La Figura 3 muestra dos gráficas de barras del efecto de OXM ICV en el comienzo de la fase oscura. Ratas saciadas recibieron una inyección ICV de OXM, GLP-1 (3 nmoles) o solución salina en el comienzo de la fase oscura. Se determinaron el consumo de alimentos (gramos; A) y los comportamientos (B) 1 hora después de la inyección. \*,  $P < 0,05$  frente a control de solución salina.

La Figura 4 muestra dos gráficas de barras de la inhibición de los efectos de OXM y GLP-1 en consumo de alimentos por exendina-(9-39). Figura 4A, consumo de alimentos 1 hora después de una inyección ICV aguda de GLP-1 (3 nmoles), GLP-1 más exendina-(9-39) (30 nmoles), OXM (3 nmoles), OXM y exendina-(9-39) (30 nmoles) o exendina-(9-39) solamente (30 nmoles). Figura 4B, consumo de alimentos después de una inyección iPVN aguda de GLP-1 (1 nmol), GLP-1 y exendina-(9-39) (10 nmoles), OXM (1 nmoles), OXM y exendina-(9-39) (10 nmoles) o exendina-(9-39) solamente (10 nmoles) en animales en ayunas. \*\*,  $P < 0,005$  frente a control de solución salina.

La Figura 5 es un gráfico de la competición de unión de [<sup>125</sup>I] GLP-1 en membranas hipotalámicas de rata por GLP-1 y OXM.

La Figura 6 ilustra el efecto de a) OXM IP (30, 100 y 300 nmoles/kg en 500 µl de solución salina) o solución salina en el consumo de alimentos acumulativo (g) en ratas en ayunas durante 24 horas inyectadas durante la fase oscura

- temprana (cuadrados cerrados = solución salina, círculos abiertos = OXM 30 nmoles/kg, triángulos cerrados = OXM 100 nmoles/kg, triángulos abiertos = OXM 300 nmoles/kg); y b) OXM IP (30 y 100 nmoles/kg en 500  $\mu$ l de solución salina) o solución salina en consumo de alimentos acumulativo sin ayuno inyectadas antes del comienzo de la fase oscura (cuadrados cerrados = solución salina, círculos abiertos = OXM 30 nmoles/kg, triángulos cerrados = OXM 100 nmoles/kg). \*, P<0,05 frente a solución salina.
- 5 La Figura 7 ilustra el efecto de inyecciones IP dos veces diarias de OXM (50 nmoles/kg) o solución salina durante siete días en a) consumo de alimentos acumulativo (g); y b) aumento del peso corporal (g). \*, P<0,05, \*\*, P<0,01, \*\*\*, P<0,005 frente a solución salina.
- 10 La Figura 8 ilustra el efecto de OXM IP (50 nmoles/kg), solución salina o un control positivo (1 hora = GLP-1 (50 nmoles/kg); 2 horas = CCK (15 nmoles/kg)) en el vaciado gástrico en ratas en ayunas durante 36 horas. Los contenidos (peso seco) del estómago, se expresaron como un porcentaje del consumo de alimentos durante el periodo de alimentación de 30 minutos. \*\*P<0,01 frente a solución salina.
- 15 La Figura 9 ilustra el efecto de dosis crecientes de OXM (0,01-1,0 nmoles) en el consumo de alimentos de una hora cuando se administran en el núcleo arqueado de ratas en ayunas durante 24 horas. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,05 frente a solución salina.
- La Figura 10 ilustra el efecto de la administración iARC de exendina 9-39 (5 nmoles) o solución salina inyectada 15 minutos antes de la administración IP de OXM (30 nmoles/kg), GLP-1 (30 nmoles/kg) o solución salina en el consumo de alimentos de 1 hora (g). (S = solución salina, G = GLP-1 (30 nmoles/kg), Ox = OXM (30 nmoles/kg), Ex = exendina 9-39 (5 nmoles)).
- 20 La Figura 11a ilustra la expresión de inmunorreactividad de tipo fos en respuesta a A) solución salina IP o B) OXM (50 nmoles/kg) IP en el núcleo arqueado del hipotálamo (ampliación x40). \*\*\*P<0,005 frente a solución salina; y
- La Figura 11b ilustra la expresión de inmunorreactividad de tipo fos en respuesta a A) solución salina IP, B) OXM (50 nmoles/kg) IP o C) CCK (15 nmoles/kg) IP en NTS y AP del tronco encefálico.
- 25 La Figura 12 muestra el protocolo del estudio del efecto de la infusión intravenosa de OXM en el consumo de alimentos en un sujeto humano. La escala representa el tiempo (minutos). La infusión de OXM (3,0 pmoles/kg/minuto) y solución salina fue de 0-90 minutos. La comida de tipo bufet se presentó a los 75 minutos.
- 30 La Figura 13 muestra las calorías consumidas por el sujeto humano en la comida de tipo bufet. Cada línea representa las calorías consumidas por un sujeto individual con infusión de solución salina y OXM. La línea oscura muestra el consumo de calorías medio para todos los voluntarios. La caída media en calorías con infusión de OXM es  $17,6 \pm 5,7$  %.
- La Figura 14 es una escala análoga visual que muestra la respuesta de los sujetos humanos a la pregunta “¿cuánta hambre tienes ahora?”. Hubo una caída significativa en el hambre subjetiva durante la infusión con OXM. Las puntuaciones de hambre disminuyeron considerablemente después de la comida de tipo bufet.
- 35 La Figura 15 muestra el efecto de la administración IP de OXM (30 nmoles/kg y 100 nmoles/kg) en grelina-IR en plasma en ayunas 30 y 90 minutos después de la inyección en ratas. Los bloques sólidos muestran los resultados con el control de solución salina, el bloque rayado, los resultados con OXM.
- La Figura 16 muestra el consumo de energía en kJ consumidos por sujetos humanos en una comida de tipo bufet. Cada línea representa el consumo de energía de un sujeto individual con solución salina y con infusión de OXM. La línea oscura muestra el consumo de calorías medio para todos los voluntarios.
- 40 La Figura 17 muestra el consumo de energía en la comida de tipo bufet y el consumo de energía acumulativo de 12 y 24 horas de los sujetos humanos. Los bloques sólidos muestran los resultados con el control de solución salina, el bloque rayado los resultados con OXM.
- La Figura 18 muestra las puntuaciones de hambre relativas de los sujetos humanos durante un periodo de ayuno y después de una comida, con infusión de OXM o un control de solución salina durante el periodo mostrado.
- 45 La Figura 19 muestra la inmunorreactividad de tipo OXM (OLI) en pmoles/l determinada por un RIA durante un periodo de ayuno y después de una comida, con infusión de OXM o un control de solución salina durante el periodo mostrado. La Figura 20 muestra análisis de exclusión molecular de muestras de plasma durante infusión de OXM. El pico inmunorreactivo sencillo eluye en la misma posición que OXM sintética.
- 50 La Figura 21 muestra el cambio en los niveles de grelina en plasma durante un periodo de ayunas y después de una comida, con infusión de OXM o un control de solución salina durante el periodo mostrado.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en la observación sorprendente que ha descubierto que, al contrario de lo que se esperaba, el péptido OXM puede inhibir el consumo de alimentos y reducir el peso.

5 En el presente texto, el término "oxintomodulina" es el mismo que "OXM" y se refiere a cualquier composición que incluye una secuencia peptídica de OXM o un análogo de la misma como sigue:

Las secuencias de OXM se conocen bien y están documentadas en la técnica. La presente invención se refiere a todas las secuencias indicadas en el presente documento incluyendo, en particular, la secuencia de OXM humana SEC ID N°: 1 (que es la misma que la secuencia de OXM de rata, hámster y bovina), como sigue:

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr

10 Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln

Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys

Arg Asn Lys Asn Asn Ile Ala SEC ID N°: 1

La secuencia de OXM de lophiiformes SEC ID N°: 2 como sigue:

His Ser Glu Gly Thr Phe Ser Asn Asp Tyr

15 Ser Lys Tyr Leu Glu Asp Arg Lys Ala Gln

Glu Phe Val Arg Trp Leu Met Asn Asn Lys

Arg Ser Gly Val Ala Glu SEC ID N°: 2

y la secuencia de OXM de anguila SEC ID N°: 3 como sigue:

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Asn Asp Tyr

20 Ser Lys Tyr Leu Glu Thr Arg Arg Ala Gln

Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Ser Lys

Arg Ser Gly Gly Pro Thr SEC ID N°: 3

25 El término OXM usado en el presente texto también abarca cualquier análogo de la secuencia OXM anterior en el que el resto de histidina en la posición 1 se mantiene o se reemplaza por un resto aromático que porta una carga positiva o un derivado del mismo, preferentemente en el que el resto es un aminoácido, más preferentemente en el que es un derivado de histidina, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 de los otros aminoácidos en la secuencia de OXM anterior pueden reemplazarse independientemente por cualquier otro aminoácido seleccionado independientemente, con la excepción de histidina en la posición 1.

30 Uno cualquiera o más (hasta 22) restos aminoacídicos alfa adicionales en la secuencia pueden reemplazarse independientemente por cualquier otro resto aminoacídico alfa. Preferentemente, cualquier resto aminoacídico distinto de histidina se reemplaza con un reemplazo conservativo como se conoce bien en la técnica, es decir reemplazando un aminoácido con uno de un tipo químico similar tal como reemplazando un aminoácido hidrófobo con otro.

35 Como se analizado anteriormente, pueden reemplazarse de 1 a 22 de los aminoácidos. Además de la opción de reemplazo anterior, está puede ser una forma no esencial, modificada o isomérica de un aminoácido. Por ejemplo, pueden reemplazarse de 1 a 22 aminoácidos por una forma isomérica (por ejemplo un aminoácido D) o un aminoácido modificado, por ejemplo un nor-aminoácido (tal como norleucina o norvalina) o un aminoácido no esencial (tal como taurina). Además, pueden reemplazarse de 1 a 22 aminoácidos por un aminoácido correspondiente o diferente ligado mediante su cadena lateral (por ejemplo ácido glutámico ligado a gamma). Para  
40 cada uno de los reemplazos analizados anteriormente, el resto de histidina en la posición 1 no está alterado o se ha definido anteriormente.

Además, pueden retirarse 1, 2, 3, 4 o 5 de los restos de aminoácidos de la secuencia de OXM con la excepción de la histidina en la posición 1 (o como se ha definido anteriormente). Los restos delecionados pueden ser 2, 3, 4 o 5 restos contiguos cualesquiera o restos completamente separados.

45 El extremo C terminal de la secuencia de OXM puede modificarse para añadir restos aminoacídicos adicionales u otros restos. La OXM anterior puede proporcionarse como la sal correspondiente de la misma. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de OXM y sus análogos incluyen las derivadas de ácidos orgánicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, ácidos minerales tales como ácido

clorhídrico y sulfúrico y similares, dando metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, clorhidrato y sulfato y similares, respectivamente o las derivadas de bases tales como bases orgánicas e inorgánicas. Los ejemplos de bases inorgánicas adecuadas para la formación de sales de compuestos para la presente invención incluyen los hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de amoníaco, litio, sodio, calcio, potasio, aluminio, hierro, magnesio, zinc y similares. También pueden formarse sales con bases orgánicas adecuadas. Tales bases adecuadas para la formación de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con compuestos de la presente invención incluyen bases orgánicas que son no tóxicas y suficientemente fuertes para formar sales. Tales bases orgánicas se conocen ya bien en la técnica y pueden incluir aminoácidos tales como arginina y lisina, mono, di o trihidroxialquilaminas tales como mono, di y trietanolamina, colina, mono, di y trialquilaminas, tales como metilamina, dimetilamina y trimetilamina, guanidina; N-metilglucosamina; N-metilpiperazina; morfolina; etilendiamina; N-benzilfentilamina; tris(hidroxiometil) aminometano; y similares.

Pueden prepararse sales de una manera convencional usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Pueden prepararse sales de adición de ácido de dichos compuestos básicos disolviendo los compuestos de base libre en solución acuosa o alcohólica acuosa u otros disolventes adecuados que contienen el ácido requerido. Cuando OXM contiene una función ácida puede prepararse una sal básica de dicho compuesto haciendo reaccionar dicho compuesto con una base adecuada. La sal ácida básica puede separarse directamente u obtenerse por concentración de la solución por ejemplo por evaporación. OXM también puede existir en formas solvatadas o hidratadas.

La OXM de la presente invención puede conjugarse con uno o más grupos tales como un lípido, azúcar, proteína o polipéptido. La OXM puede conjugarse uniéndose al grupo (por ejemplo mediante un enlace covalente o iónico) o puede asociarse con el mismo. El enlace conjugado preferentemente no es a través del aminoácido C o N terminal, cuando la OXM está unida al grupo. La OXM puede conjugarse con un polímero tal como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, polisacáridos tales como celulosa, derivados de celulosa, quitosán, goma arábiga, goma karaya, goma guar, goma de xantano, goma de tragacanto, ácido alginico, carragenina, agarosa y furcellaranos, dextrano, almidón, derivados de almidón, ácido hialurónico, poliésteres, poliamidas, polianhídridos y poliortoésteres.

La OXM puede modificarse químicamente. En particular, pueden modificarse las cadenas laterales de aminoácidos, el extremo N terminal y/o el extremo ácido C terminal de OXM. Por ejemplo, la OXM puede experimentar uno o más de alquilación, formación de disulfuro, formación de complejo metálico, acilación, esterificación, amidación, nitración, tratamiento con ácido, tratamiento con base, oxidación o reducción. Los procedimientos para llevar a cabo estos procesos se conocen bien en la técnica. En particular, la OXM se proporciona como un éster de alquilo inferior, una amida de alquilo inferior, una amida de dialquilo inferior, una sal de adición de ácidos, una sal de carboxilato o una sal de adición alcalina de la misma. En particular, los extremos amino o carboxi terminal de la OXM pueden derivatizarse por ejemplo, por esterificación, amidación, acilación, oxidación o reducción. En particular, el extremo carboxílico de la OXM puede derivatizarse para formar un resto de amida.

La OXM puede tratarse con metales, en particular con metales divalentes. Para los fines de la presente invención la OXM puede por lo tanto proporcionarse en presencia de uno o más de los siguientes metales, cinc, calcio, magnesio, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno o hierro.

La OXM puede proporcionarse en forma de una composición farmacéutica en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y/o diluyentes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen almidón, manitol, lactosa, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa (u otro azúcar), carbonato de magnesio, gelatina, aceite, alcohol, detergentes, emulsionantes o agua (preferentemente estéril) de uso farmacéutico. La composición puede ser una preparación mixta de una composición o puede ser una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial (incluyendo administración). La OXM puede proporcionarse como un sólido cristalino, un polvo, una solución acuosa, una suspensión o en aceite.

Las composiciones de acuerdo con la invención para su uso en las indicaciones anteriormente mencionadas pueden administrarse por cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo por administración oral, rectal, parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa por ejemplo bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación y las composiciones pueden adaptarse en consecuencia.

Para la administración oral, la composición puede formularse como líquidos o sólidos, por ejemplo soluciones, jarabes, suspensiones o emulsiones, comprimidos, cápsulas y pastillas.

Una formulación líquida generalmente consistirá en una suspensión o solución del compuesto o sal fisiológicamente aceptable en un vehículo o vehículos acuosos o no acuosos líquidos adecuados por ejemplo agua, etanol, glicerina, polietilenglicol o un aceite. La formulación también puede contener un agente de suspensión, conservante, saporífero o colorante.

Una composición en forma de un comprimido puede prepararse usando cualquier vehículo o vehículos farmacéuticos adecuados usados habitualmente para preparar formulaciones sólidas. Los ejemplos de tales vehículos incluyen estearato de magnesio, almidón, lactosa, sacarosa y celulosa microcristalina.

Una composición en forma de una cápsula puede prepararse usando procedimientos de encapsulación rutinarios. Por ejemplo, pueden prepararse polvos, gránulos o pellas que contienen el principio activo usando vehículos convencionales y llenando después con ellos una cápsula de gelatina dura; como alternativa, puede prepararse una dispersión o suspensión usando cualquier vehículo o vehículos farmacéuticos adecuados, por ejemplo gomas acuosas, celulosas, silicatos o aceites y rellenar después una cápsula de gelatina blanda con la suspensión o dispersión.

5

Las composiciones para administración oral pueden diseñarse para proteger el principio activo frente a degradación a medida que pasa a través del tracto alimentario, por ejemplo por un revestimiento exterior de la formulación en un comprimido o cápsula.

10 Las composiciones parenterales típicas, incluyendo composiciones para administración subcutánea, comprenden una solución o suspensión del compuesto o sal fisiológicamente aceptable en un vehículo acuoso o no acuoso estéril o aceite parenteralmente aceptable, por ejemplo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete o aceite de sésamo. Como alternativa, la solución puede liofilizarse y después reconstituirse con un disolvente adecuado justo antes de la administración.

15 Las composiciones para administración nasal u oral pueden formularse de forma conveniente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones de aerosol típicamente comprenden una solución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso fisiológicamente aceptable y se presentan habitualmente en cantidades sencillas o multidosis en forma estéril en un recipiente sellado, que puede tomar la forma de un cartucho o recarga para su uso con un dispositivo de atomización. Como alternativa el recipiente sellado puede ser un dispositivo de dosificación unitario tal como un inhalador nasal de dosis única o un dosificador de aerosol equipado con una válvula de medida que se pretende desechar una vez que los contenidos del recipiente se hayan agotado. Cuando la forma farmacéutica comprende un dosificador de aerosol, contendrá un propulsor farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas de aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bomba.

20

25 Las composiciones adecuadas para administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas y grageas, en las que el principio activo se formula con un vehículo tal como azúcar y goma arábiga, tragacanto o gelatina y glicerina.

Las composiciones para administración rectal o vaginal están convenientemente en forma de supositorios (que contienen una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao), pesarios, comprimidos vaginales, espumas o enemas.

30 Las composiciones adecuadas para administración transdérmica incluyen pomadas, geles, parches e inyecciones que incluyen inyecciones de polvo.

Convenientemente la composición está en forma farmacéutica unitaria tal como un comprimido, cápsula o ampolla.

35 La OXM puede administrarse periféricamente a una dosis de, por ejemplo, 0,1 nmoles o más por kg de peso corporal de un sujeto, por ejemplo, 0,2 nmoles o más, por ejemplo, 0,5 nmoles o más, por ejemplo, 1 nmol o más, por ejemplo, 1,5 nmoles o más, por ejemplo, 2 nmoles o más, por ejemplo, 2,5 nmoles o más, por ejemplo, 3 nmoles o más, por ejemplo, 4 nmoles o más, por ejemplo, 5 nmoles o más, por ejemplo, 6 nmoles o más, por ejemplo, 7 nmoles o más, por ejemplo, 8 nmoles o más, por ejemplo, 9 nmoles o más, por ejemplo, 10 nmoles, por ejemplo, 11 nmoles o más, por ejemplo, hasta 12 nmoles por kg de peso corporal. La cantidad usada puede ser de hasta 11 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, hasta 10 nmoles, por ejemplo, hasta 9 nmoles, por ejemplo, hasta 8 nmoles, por ejemplo, hasta 7 nmoles, por ejemplo, hasta 6 nmoles, por ejemplo, hasta 5 nmoles, por ejemplo, hasta 4 nmoles, por ejemplo, hasta 3 nmoles, por ejemplo, hasta 2 nmoles, por ejemplo, hasta 1 nmol, por ejemplo, hasta 0,5 nmoles, por ejemplo, hasta 0,4 nmoles, por ejemplo, hasta 0,2 nmoles por kg de peso corporal. La dosis está generalmente en el intervalo de 0,1 a 12 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, dentro de cualquier combinación de intervalos superiores e inferiores proporcionados anteriormente. Puede calcularse una dosis de manera individual o basándose en un sujeto típico, con frecuencia un sujeto de 70 ó 75 kg. La dosis puede administrarse antes de cada comida.

40

45

Para administración subcutánea, puede administrarse una dosis de OXM dentro del intervalo de 100 nmoles a 500 nmoles, es decir, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2 mg, cuya dosis se calcula basándose en un sujeto de 75 kg, generalmente antes de las comidas.

50 Una preparación farmacéutica en forma farmacéutica unitaria para administración periférica preferentemente comprende una cantidad de OXM calculada basándose en las dosis por kg proporcionadas anteriormente. Típicamente, la dosis puede calcularse basándose en un sujeto de 70 ó 75 kg. Una composición para administración subcutánea, por ejemplo, puede comprender una dosis unitaria de OXM dentro del intervalo de 100 nmoles a 500 nmoles, es decir, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2 mg, calculado basándose en un sujeto de 75 kg.

55

La OXM puede usarse como una profilaxis para prevenir la ganancia de peso excesiva o puede usarse como un agente terapéutico para perder el exceso de peso.

El exceso de peso es típicamente obesidad, aunque el mamífero no se certificará como clínicamente obeso para padecer exceso de peso. La OXM puede estar en forma líquida, sólida o semisólida.

5 La sociedad actual, la prevención o tratamiento del exceso de peso en un mamífero es una necesidad real. Preferentemente el mamífero es un ser humano, aunque también puede incluir otros animales mamíferos, tales como caballos, animales caninos (en particular animales caninos domésticos), animales felinos (en particular animales felinos domésticos) así como mamíferos que se producen para carne, tales como animales porcinos, bovinos y ovinos. La presente invención puede usarse para prevenir el exceso de peso en tales animales para maximizar la producción de carne magra.

10 A lo largo de este texto, el término "prevención" significa cualquier efecto que mitigue cualquier exceso de peso, en cualquier grado. A lo largo de este texto, el término "tratamiento" significa alivio del exceso de peso, en cualquier grado.

15 Las dosis adecuadas de OXM incluyen las que aumentan la concentración de OXM significativamente por encima de la concentración basal de OXM, tales como, pero sin limitación, una dosis que puede imitar las concentraciones en suero postprandial de OXM. Por lo tanto, en una realización, se administra OXM para una reducción en el consumo de calorías, el consumo de alimentos o equivalente de apetito a la reducción en el consumo de calorías, consumo de alimentos o apetito o para aumentar el gasto de energía, causado por el nivel postprandial de OXM.

Para todos los procedimientos desvelados en el presente documento, la dosis de OXM puede basarse en los niveles fisiológicos observados de forma postprandial. Puede administrarse una dosis sencilla por día o pueden usarse dosis divididas (véase anteriormente).

20 Es preferible administrar OXM mediante una vía periférica de administración, es decir, mediante una vía distinta de directamente al cerebro. Los ejemplos de tales vías incluyen administración oral, rectal, parenteral por ejemplo administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa por ejemplo bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación.

25 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende OXM y un vehículo farmacéuticamente adecuado en forma adecuada para administración oral, rectal, parenteral por ejemplo intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa por ejemplo bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación. Si está en forma farmacéutica unitaria, la dosis por unidad puede calcularse basándose en las dosis por kg proporcionadas anteriormente.

30 La presente invención también incluye OXM o un agonista de la misma para su uso en la fabricación de un medicamento para administración por una vía periférica para cualquiera de los procedimientos de tratamiento descritos anteriormente. Los ejemplos de vías periféricas incluyen administración oral, rectal, parenteral por ejemplo intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosa por ejemplo bucal, sublingual, nasal subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación. Se han proporcionado anteriormente cantidades de dosis preferidas de OXM para los medicamentos.

35 La presente invención proporciona un procedimiento para pérdida de peso cosmética en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar una composición que comprende OXM a un mamífero. En esta circunstancia, la pérdida de peso es puramente para los fines de apariencia cosmética.

Todas las características preferidas proporcionadas anteriormente se aplican a este aspecto de la invención.

40 Sin desear quedar vinculado a esta teoría, se entiende que la presente invención proporciona la prevención o tratamiento de exceso de peso por la administración de OXM que actúa como un inhibidor del consumo de alimentos al cuerpo del mamífero y/o aumenta el gasto de energía. Tal reducción del consumo de alimentos y/o aumento de gasto de energía da como resultado la prevención o tratamiento del exceso de peso en un mamífero. En este texto, el término "alimento" incluye una sustancia que se ingiere y que tiene valor calorífico. Además, los inventores han descubierto que la infusión de OXM suprime la grelina en plasma en ayunas. Esto es un hallazgo importante debido a que la grelina es un estimulador potente del apetito en el hombre y se ha sugerido que aumentos preprandiales de la grelina en plasma son un desencadenante para el inicio de la comida. Sin quedar vinculado por la hipótesis, los inventores consideran que la inhibición de la elevación preprandial normal en grelina por OXM probablemente es un mecanismo por el que la infusión de OXM reduce el apetito.

50 La presente invención proporciona adicionalmente el uso, en combinación, de OXM y otro agente que tiene una influencia de cualquier modo sobre el peso y/o el consumo de alimentos, por ejemplo, un agente que tiene uno o más cualesquiera de los siguientes efectos: reduce el consumo de alimentos y/o reduce el hambre, reduce el peso, reduce o evita la obesidad, aumenta el gasto de energía o reduce la disponibilidad de nutrientes en un mamífero, especialmente un ser humano. El otro agente es, por ejemplo, GLP-1 o un receptor agonista del mismo o PYY o un agonista del mismo u otra sustancia que es o deriva de una sustancia de influencia alimentaria natural, por ejemplo, amilina, leptina, exendina-4 o agonistas de los mismos. Si se desea, pueden usarse más de un agente adicional en combinación con OXM, por ejemplo, puede usarse GLP-1 o un agonista del mismo y PYY o un agonista del mismo. (Se entenderá que una referencia a una sustancia "o un agonista de la misma" incluye mezclas de las sustancias y

uno o más agonistas de las mismas y también mezclas de dos o más agonistas).

En una realización OXM puede usarse con GLP-1 o un agonista del mismo. OXM parece tener un sitio arqueado de acción, mientras que GLP-1 actúa a través del tronco encefálico. El uso de los dos agentes en combinación puede proporcionar un efecto sinérgico.

- 5 El GLP-1, como la OXM, es un producto post-traducciona de preproglucagón, véase Figura A. El producto post-traducciona inicial es el GLP-1 (1-37). El GLP-1 humano (1-37) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, SEC ID N°: 4:

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys  
Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly SEC ID N°4

- 10 Modificaciones adicionales dan GLP-1 (1-36) SEC ID N°: 5 y la amida del mismo GLP-1 (1-36) NH<sub>2</sub>; GLP-1 (7-37) SEC ID N°: 6; y GLP-1 (7-36) SEC ID N°: 7 y la amina del mismo, GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub>, que es el más biológicamente activo de los péptidos de GLP-1. El término "GLP-1" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de los péptidos de GLP-1 definidos anteriormente, especialmente GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub>, también conocido como amida de GLP-1 (7-36). El término abarca péptidos de GLP-1 de cualquier origen animal, especialmente los péptidos
- 15 humanos.

- Un agonista de GLP-1 es un péptido, molécula pequeña o compuesto químico que se une preferentemente al receptor de GLP-1 y estimula la misma actividad biológica que GLP-1. En una realización, un agonista para el receptor de GLP-1 se une al receptor con una afinidad mayor o igual que GLP-1. En otra realización, un agonista se une selectivamente al receptor de GLP-1, en comparación con unión a otro receptor. Exendina-4, que es un péptido de 39 aminoácidos aislado de las glándulas salivares del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) (Eng J y col. J Biol Chem 267:7402-7405, 1992) es un ejemplo de un agonista en el receptor de GLP-1. Las moléculas derivadas de exendina-4 y que también tienen actividad agonista de GLP-1 son ejemplos adicionales de agonistas de GLP-1. Los agonistas de GLP-1 incluyen péptidos relacionados con GLP-1 y péptidos que resultan de procesamiento enzimático o químico sintético o natural de preproglucagón o de un péptido de GLP-1 o un péptido relacionado.
- 20

- 25 Cualquier compuesto que se describe como un agonista de GLP-1 puede usarse en la presente invención, así como cualquier compuesto que se ensaya con respecto a actividad agonista de GLP-1, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, y se descubre que actúa como un agonista de GLP-1. Un receptor de GLP-1 recombinante adecuado para su uso en exploración se desvela en el documento WO93/19175. Se conocen muchos agonistas de GLP-1 y se han descrito en la técnica. Son ejemplos de memorias descriptivas de patentes publicadas que desvelan agonistas de GLP-1 las siguientes: WO2002/67918, WO2002/66479, WO2002/03978, WO2001/89554, WO2001/14386, WO2001/66135, WO2001/35988, WO2001/14368, WO2001/04156, WO2000/78333, WO2000/59887, WO2000/42026 EP 0955314 y WO99/43707. Son ejemplos de agonistas de GLP-1 Arg34, Lys26 (N-épsilon-(gamma-Glu(N-alfa-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37), IP7-GLP-1 (7-37) OH.
- 30

- Puede ser ventajoso usar PYY o un agonista del mismo con OXM. El PYY tiene una duración prolongada de acción, por ejemplo, cuando se administra periféricamente, continúa actuando después de que se ha eliminado de la sangre en circulación, por ejemplo, durante hasta 24 horas después de la administración. En consecuencia, PYY es eficaz cuando se administran dos o incluso una dosis por día. Sin estar limitado por lo siguiente, OXM parece tener un efecto inmediato, que puede no mantenerse durante un periodo prolongado. OXM puede administrarse varias veces al día, por ejemplo, antes de una comida. El uso de PYY de larga actuación con OXM de corta actuación permite el "ajuste preciso" de regímenes de administración a las necesidades del usuario.
- 35
- 40

El PYY es una amida peptídica de 36 restos aislada originalmente de intestino porcino (Tatemoto y col Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2514, 1982). El término como se usa en el presente documento incluye PYY obtenido o derivado de cualquier especie. De este modo, PYY incluye el polipéptido de longitud completa humano, que tiene la siguiente secuencia, SEC ID N°: 8:

- 45 Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His  
Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr SEC ID N°: 8

y variaciones de especie de PYY, incluyendo por ejemplo murino, de hámster, de pollo, bovino, de rata y de perro. En una realización, los agonistas de PYY no incluyen NPY. El término PYY como se usa en el presente documento también incluye PYY<sub>3-36</sub>. Puede ser ventajoso usar PYY<sub>3-36</sub>. Un agonista de PYY es cualquier compuesto que se une a un receptor que se une específicamente a PYY e induzca un efecto de PYY. En una realización, un agonista de PYY es un compuesto que afecta al consumo de alimentos, consumo calórico o apetito y/o que se une específicamente en un ensayo de receptor Y o compite por la unión con PYY, tal como en un ensayo de unión competitiva con PYY marcado. Los agonistas de PYY incluyen, pero sin limitación, compuestos que se unen al receptor de Y2.

50

- 55 Se desvelan en la técnica agonistas y compuestos de PYY que pueden usarse como agonistas de PYY. Por ejemplo, se contemplan como agonistas de PYY útiles agonistas peptídicos de NPY específicos de Y2 como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.026.685; patente de Estados Unidos N° 5.574.010; patente de

Estados Unidos N° 5.604.203; patente de Estados Unidos N° 5.696.093; patente de Estados Unidos 6.046.167. También pueden usarse variantes de PYY y del neuropéptido Y que son análogas a las variantes y modificaciones de OXM descritas anteriormente.

5 Si se desea, la OXM puede usarse tanto con GLP-1 o un agonista del mismo como con PYY o un agonista del mismo.

10 El uso de una combinación de cualquiera de OXM y GLP-1 o un agonista del mismo y PYY o un agonista del mismo puede servir para aumentar la eficacia de cualquiera de los agentes en comparación con su uso solo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa o además, el uso de los dos o tres agentes en combinación puede reducir cualquier tendencia al "escape" cuando se usa un agente solamente. El término "escape" se usa para  
15 indicar una reducción en efecto de un agente con el tiempo. Por ejemplo, si uno cualquiera de los agentes anteriores se ha usado solo, su efecto puede reducirse con el tiempo. El uso de uno o ambos de los otros agentes además puede reducir o prevenir la tendencia de esa reducción en la eficacia. Por ejemplo, PYY tiene un efecto mantenido y puede usarse durante períodos prolongados. Si el efecto de PYY pareciera reducir o reducir o prevenir cualquier reducción tal en el efecto, OXM puede administrarse además del PYY. También puede usarse GLP-1 para el mismo fin, con OXM o con OXM y PYY.

Si se desea, también pueden administrarse uno o más agentes adicionales, tales como, pero sin limitación, un supresor del apetito adicional. Los ejemplos no limitantes específicos de un supresor del apetito adicional incluyen anfepramona (dietil-propión), fentermina, mazindol y fenilpropanolamina, fenfluramina, dexfenfluramina y fluoxetina.

20 Cuando se usa en combinación con otro agente, la OXM puede administrarse simultáneamente o sustancialmente simultáneamente con el otro agente, o secuencialmente, en cualquier orden. La OXM y el otro agente pueden administrarse en una composición farmacéutica sencilla o en composiciones separadas y pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Generalmente es más conveniente administrar todos los agentes activos en una composición sencilla. Sin embargo, en algunos casos puede ser necesario o apropiado administrar los agentes  
25 activos por vías diferentes. Por ejemplo, los péptidos son generalmente no estables en administración oral a no ser que se modifiquen o formulen de una manera especial, de modo que deben generalmente administrarse mediante una vía no oral. Algunos agonistas, por ejemplo, agonistas de GLP-1, son compuestos químicos que son estables cuando se administran por vía oral. Puede ser apropiado administrar OXM por vía no oral y el otro componente por una vía no oral.

30 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de OXM o un agonista del mismo se administra con una cantidad terapéuticamente eficaz de GLP-1 o un agonista del mismo y/o PYY o un agonista del mismo. La expresión "GLP-1/PYY" se usa en el presente documento para indicar GLP-1 o un agonista del mismo y/o PYY o un agonista del mismo.

35 La OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY pueden administrarse simultáneamente o sustancialmente simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden. La OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY pueden administrarse en una composición farmacéutica sencilla o en composiciones separadas y pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes.

40 Si la OXM y el GLP-1/PYY van a administrarse en una composición farmacéutica sencilla, esa composición puede ser cualquiera de las descritas anteriormente para OXM o un agonista de la misma. La composición puede permitir la administración simultánea o sustancialmente simultánea de la OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY. Si se desea, la OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY pueden compartimentalizarse en la composición, por ejemplo, en diferentes capas de un comprimido o en diferentes gránulos en una cápsula. Si se desea, dicha compartimentalización puede diseñarse para proporcionar diferentes propiedades de liberación a los componentes para permitir el suministro de la OXM o componente agonista y el GLP-1/PYY en diferentes momentos, por ejemplo, secuencialmente.

45 Como alternativa, la OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY pueden formularse en composiciones farmacéuticas separadas, por ejemplo, cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para OXM y agonistas de la misma. Tales composiciones separadas pueden administrarse simultáneamente o sustancialmente simultáneamente o pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden. Por ejemplo, puede administrarse PYY dos veces o incluso una vez por día, administrándose OXM hasta varias veces al día, por  
50 ejemplo, antes de las comidas.

Si se administran de forma separada, secuencialmente o simultáneamente (o sustancialmente simultáneamente), la OXM o agonista de la misma y el GLP-1/PYY pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

55 Cuando se usa en terapia de combinación como se ha descrito anteriormente, la OXM puede usarse en una dosis como se ha desvelado anteriormente en relación con la administración periférica cuando se usa solo, es decir, la OXM puede administrarse periféricamente a una dosis de, por ejemplo, 0,1 nmoles o más por kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, 0,2 nmoles o más, por ejemplo, 0,5 nmoles o más, por ejemplo, 1 nmol o más, por ejemplo, 1,5 nmoles o más, por ejemplo, 2 nmoles o más, por ejemplo, 2,5 nmoles o más, por ejemplo, 3 nmoles o más, por

- ejemplo, 4 nmoles o más, por ejemplo, 5 nmoles o más, por ejemplo, 6 nmoles o más, por ejemplo, 7 nmoles o más, por ejemplo, 8 nmoles o más, por ejemplo 9 nmoles o más, por ejemplo, 10 nmoles, por ejemplo, 11 nmoles o más, por ejemplo, hasta 12 nmoles por kg de peso corporal. La cantidad usada puede ser de hasta 11 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, hasta 10 nmoles, por ejemplo, hasta 9 nmoles, por ejemplo, hasta 8 nmoles, por ejemplo, hasta 7 nmoles, por ejemplo, hasta 6 nmoles, por ejemplo, hasta 5 nmoles, por ejemplo, hasta 4 nmoles, por ejemplo, hasta 3 nmoles, por ejemplo, hasta 2 nmoles, por ejemplo, hasta 1 nmol, por ejemplo, hasta 0,5 nmoles, por ejemplo, hasta 0,4 nmoles, por ejemplo, hasta 0,2 nmoles por kg de peso corporal. La dosis generalmente está en el intervalo de 0,1 a 12 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, dentro de cualquier combinación de intervalos superiores e inferiores proporcionados anteriormente.
- 5 El GLP-1 o un agonista del mismo puede administrarse periféricamente a una dosis de, por ejemplo, 0,1 nmoles o más por kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, 0,2 nmoles o más, por ejemplo, 0,4 nmoles o más, por ejemplo, 0,6 nmoles o más, por ejemplo, 0,8 nmoles o más, por ejemplo, 1,0 nmoles o más, por ejemplo, 1,2 nmoles o más, por ejemplo, 1,4 nmoles o más, por ejemplo, 1,6 nmoles o más, por ejemplo, 1,8 nmoles o más, por ejemplo, 2,0 nmoles o más, por ejemplo, 2,2 nmoles o más, por ejemplo, 2,4 nmoles o más, por ejemplo, 2,6 nmoles o más, por ejemplo, 2,8 nmoles, por ejemplo, 3,0 nmoles o más, por ejemplo, hasta 3,2 nmoles por kg de peso corporal. La cantidad usada puede ser de hasta 3,0 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, hasta 2,8 nmoles, por ejemplo, hasta 2,6 nmoles, por ejemplo, hasta 2,4 nmoles, por ejemplo, hasta 2,2 nmoles, por ejemplo, hasta 2,0 nmoles, por ejemplo, hasta 1,8 nmoles, por ejemplo, hasta 1,4 nmoles, por ejemplo, hasta 1,2 nmoles, por ejemplo, hasta 1,0 nmoles, por ejemplo, hasta 0,8 nmoles, por ejemplo, hasta 0,6 nmoles, por ejemplo, hasta 0,4 nmoles, por ejemplo, hasta 0,2 nmoles por kg de peso corporal. La dosis generalmente está en el intervalo de 0,1 a 3,2 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, dentro de cualquier combinación de intervalos superiores e inferiores proporcionados anteriormente.
- 10 El PYY o un agonista del mismo puede usarse a una dosis dentro de los intervalos desvelados anteriormente para GLP-1. Las dosis de los diversos agentes pueden ser independientes entre sí o, por ejemplo, pueden usarse dosis equimolares, por ejemplo, dosis equimolares de GLP-1 o un agonista del mismo y PYY o un agonista del mismo. Puede calcularse una dosis de forma individual o basándose en un sujeto típico, con frecuencia un sujeto de 70 ó 75 kg.
- 15 Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende oxintomodulina y uno o más agentes adicionales que tienen una influencia de cualquier modo sobre el peso y/o consumo de alimentos, por ejemplo, un agente que tiene uno o más de los siguientes efectos: reduce el consumo de alimentos y/o reduce el hambre, reduce el peso, reduce o evita la obesidad, aumenta el gasto de energía o reduce la disponibilidad de nutrientes en un mamífero, especialmente un ser humano, en mezcla o junto con un vehículo farmacéuticamente adecuado. Los agentes son como se ha definido anteriormente y son, por ejemplo, GLP-1 o un agonista y/o agonista de PYY del mismo. Las composiciones pueden ser, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para composiciones farmacéuticas de OXM. Las dosis de la OXM y otros agentes son, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.
- 20 Una preparación farmacéutica en forma farmacéutica unitaria para administración periférica preferentemente comprende una cantidad de OXM calculada basándose en las dosis por kg proporcionadas anteriormente. Típicamente, la dosis puede calcularse basándose en un sujeto de 75 kg. Una composición para administración subcutánea, por ejemplo, puede comprender una dosis unitaria de OXM dentro del intervalo de 100 nmoles a 500 nmoles, es decir, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2 mg, calculado basándose en un sujeto de 75 kg.
- 25 La presente invención también proporciona el uso de OXM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto de acuerdo con cualquiera de los procedimientos desvelados anteriormente.
- 30 Cuando OXM y otro agente que reduce el consumo de alimentos, por ejemplo, PYY o un agonista del mismo y/o GLP-1 o un agonista del mismo se usan en la fabricación de un medicamento para su uso en un tratamiento como se ha descrito en el presente documento, el medicamento puede ser una composición farmacéutica sencilla que comprende todos los componentes, como se ha descrito anteriormente o puede ser un medicamento de dos o más componentes, siendo un componente una composición farmacéutica que comprende OXM, siendo el otro componente o componentes cada uno una composición farmacéutica que comprende el otro agente o agentes que reduce el consumo de alimentos, véase anteriormente.
- 35 El medicamento, sea un medicamento de un componente o un medicamento de dos o más componentes como se ha descrito anteriormente, generalmente estará envasado con instrucciones relacionadas con su uso. Tales instrucciones indicarán la temporización, dosis y vía de administración del componente o componentes.
- 40 Las características preferidas anteriores relacionadas con procedimientos y composiciones relacionados con OXM cuando se usa en combinación con otro agente también se aplican a su uso en la fabricación de un medicamento como se ha descrito anteriormente.
- 45
- 50
- 55

En todas las realizaciones de la invención, la pauta de dosificación particular para las mismas se determinará en

última instancia por el médico a cargo del caso y tomará en consideración tales factores como la OXM que se usa, el tipo de animal, edad, peso, gravedad de los síntomas y/o gravedad de tratamiento a aplicar, procedimiento de administración del medicamento, reacción adversa y/o contra indicaciones. Pueden determinarse los intervalos de dosificación definidos específicos por ensayos clínicos diseñados convencionales controlándose completamente el progreso y recuperación del paciente.

Tales ensayos pueden usar un diseño de dosis creciente usando un bajo porcentaje de la dosis tolerada máxima en los animales como la dosis de partida en el hombre. Los ejemplos de dosis adecuadas se han proporcionado anteriormente.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos cambiando lo que deba cambiarse.

La presente invención se describe ahora como ejemplo solamente en los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

OXM provoca una reducción potente en la realimentación inducida por ayuno cuando se inyecta tanto ICV como iPVN

Péptidos y agentes químicos

GLP-1, glicentina, glucagón y SP-1 se obtuvieron de Peninsula Laboratories, Inc. (St. Helens, Reino Unido). OXM se obtuvo de IAF BioChem Pharma (Laval, Canadá). Exendina-4 y exendina-(9-39) se sintetizaron en el Consejo de Investigación Médica, Unidad de Hemostasis, Centro de Ciencias Clínicas, Hospital Hammersmith, Londres, Reino Unido usando química F-moc en un sintetizador peptídico 396 MPS (Advanced ChemTech, Inc.) y se purificó por HPLC de fase inversa en una columna C<sub>8</sub> (Phenomex, Macclesfield, Reino Unido). El peso molecular correcto se confirmó por espectrometría de masas. Todos los agentes químicos se obtuvieron de Merck & Co. (Lutterworth, Leicester, Reino Unidos) a menos que se indique otra cosa.

Animales

Se mantuvieron ratas Wistar macho adultas (ICSM, Hammersmith Hospital) en jaulas individuales en condiciones controladas de temperatura (21-23 °C) y luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) con acceso a voluntad al alimento (dieta RM1, Special Diet Services UK Ltd., Witham, Reino Unido) y agua del grifo. Los animales se trataron diariamente después de la recuperación de cirugía hasta la compleción de los estudios. Todos los procedimientos animales realizados se aprobaron por el British Home Office Animals (Scientific Procedures Act 1986 (Licencia Proyecto PIL 90/1077).

Canulación iPVN e ICV e infusiones de compuestos de ensayo

Los animales tenían cánulas guía de acero inoxidable permanentes (Plastics One, Roanoke, VA) implantadas de forma estereotáctica ICV (vía intracerebroventricular) o iPVN (en el núcleo paraventricular hipotalámico). Todos los estudios se llevaron a cabo en la fase de luz temprana, entre las 09:00 y 11:00 horas, después de un ayuno de 24 horas y se midió el consumo de alimentos 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección.

Protocolos de estudio de alimentación

Comparación del efecto de productos derivados de proglucagón y péptidos relacionados en el consumo de alimentos.

En el estudio 1a, se inyectaron a las ratas ICV 10 µl de solución salina, GLP-1 (13 nmoles), OXM (3 nmoles), glucagón (3 nmoles) o glicentina (3 nmoles; n = 8/grupo).

En todos los estudios, se usó la OXM humana con la siguiente secuencia, SEC ID N°: 1:

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu  
Met Asn Thr Lys Arg Asn Lys Asn Asn Ile Ala SEC ID N°: 1

Se usó GLP-1 humano con la siguiente secuencia, SEC ID N°: 7:

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu  
Val Lys Gly Arg SEC ID N°: 7

En el estudio 1b, se inyectó a las ratas iPVN 1 µl de solución salina, GLP-1 (1,0 nmoles), OXM (1,0 nmoles), glicentina (1,0 nmoles), glucagón (1,0 nmoles) o SP-1 (3,0 nmoles; n = 12-15/grupo). La exendina-4, cuando se inyecta ICV, inhibe el consumo de alimentos de forma más potente que GLP-1. Por lo tanto, se inyectó exendina-4

iPVN a una dosis de 0,03 nmoles.

Investigación del efecto de dosis crecientes de OXM en el consumo de alimentos

5 En el estudio 2a, se inyectó a las ratas ICV con solución salina, GLP-1 (3 nmoles) u OXM (0,3, 1, 3 ó 10 nmoles; n = 8/grupo). En el estudio 2b, se inyectó a las ratas iPVN solución salina, GLP-1 (1,0 nmoles) u OXM (0,1, 0,3 ó 1,0 nmoles; n=12-15/grupo). Para evaluar si OXM actúa mediante el receptor de GLP-1, se realizó un estudio usando el antagonista del receptor de GLP-1 exendina-(9-39).

Alimentación nocturna y análisis de comportamiento.

10 Estudio 3. Es posible que la OXM inhiba el consumo de alimentos mediante aversión de sabor no específica y que no sea un verdadero factor de saciedad. Por lo tanto, se administró a las ratas con cánulas ICV GLP-1 (3 nmoles), OXM (3 nmoles) o solución salina (n = 6/grupo) al comienzo de la fase oscura. El consumo de alimentos se midió 1 hora después de la inyección (estudio 3a) y se evaluó el comportamiento (estudio 3b). Se observó a las ratas durante 1 hora después de la inyección usando una hoja de puntuación de comportamiento.

15 En el estudio 4a, se inyectó a las ratas ICV con solución salina, GLP-1 (3 nmoles), GLP-1 (3 nmoles) más exendina-(9-39) (30 nmoles), OXM (3 nmoles), OXM (3 nmoles) más exendina-(9-39) (30 nmoles) o exendina-(9-39) sola (30 nmoles). En el estudio 4b, se inyectó a las ratas iPVN solución salina, GLP-1 (1 nmol), GLP-1 (1 nmol) más exendina-(9-39) (10 nmoles), OXM (1 nmol), OXM (1 nmol) más exendina-(9-39) (10 nmoles) o exendina-(9-39) sola (10 nmoles; n=10-12/grupo).

Ensayos de unión al receptor. Estudio 5.

20 Se realizaron ensayos de unión al receptor en un volumen final de 0,5 ml de membranas hipotalámicas de rata (200 µg de proteína), 500 Bq (100 pM) [<sup>125</sup>I] GLP-1 y péptidos competidores no marcados (GLP-1 y OXM) según se especifica. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se separó la radiactividad unida y libre por centrifugación (2 minutos, 4 °C). Se lavaron las membranas sedimentadas con tampón de ensayo (0,5 ml, helado) y las membranas se centrifugaron como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante se retiró y se contó la radiactividad en el sedimento usando un contador γ. Se calculó la unión específica (saturable) como la diferencia entre la cantidad de [<sup>125</sup>I] GLP-1 unido en ausencia (unión total) y presencia de OXM o GLP-1 1 µM (unión no saturable). Todas las curvas se construyeron con puntos por triplicado. Se calcularon los valores CI<sub>50</sub> usando el programa Prism 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Estadísticas

30 Para los análisis de consumo de alimentos, se presentan los datos como la media ± ETM. Las diferencias estadísticas entre grupos experimentales se determinaron por ANOVA, seguido de un ensayo de diferencia menos significativa post-hoc (Systat 8.0, Evanston, IL). Para los análisis de comportamiento, se expresan los datos como la mediana del número de apariciones de cada comportamiento y el intervalo. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando el ensayo de U de Mann-Whitney (Systat 8.0). En todos los casos, P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

35 Resultados

Comparación de los efectos de productos derivados de proglucagón y péptidos relacionados en el consumo de alimentos

Administración ICV.

40 En el estudio 1a, la OXM y el GLP-1 (3 nmoles) redujeron significativamente la realimentación. Esta inhibición del consumo de alimentos duró hasta 4 horas después de la inyección (Figura 1A). El glucagón y la glicentina (3 nmoles) no afectaron al consumo de alimentos en ningún punto temporal (Figura 1A).

Administración de iPVN.

45 En el estudio 1b, la OXM, el GLP-1 (3 nmoles) y la exendina-4 (0,03 nmoles) también inhibieron la realimentación cuando se inyectaron iPVN. Esta inhibición duró al menos 8 horas después de la inyección, más que cuando se inyectó ICV (Figura 1B). La glicentina, el glucagón (1 nmol) y el SP-1 (3 nmoles) no afectaron al consumo de alimentos en ningún punto temporal cuando se inyectaron iPVN.

Efectos de aumentar las dosis de OXM en el consumo de alimentos

Administración ICV.

50 En el estudio 2a, cuando se inyectó ICV, la OXM redujo la realimentación de una manera dependiente de dosis, alcanzando un efecto máximo a una dosis de 3 nmoles, 1, 2 y 4 horas después de la inyección (Figura 2A).

## Administración iPVN.

En el estudio 2b, el consumo de alimentos se redujo significativamente por GLP-1 y OXM inyectados iPVN (ambos 1 nmol) hasta 8 horas después de la inyección (Figura 2B).

Efecto de OXM en ratas saciadas con cánula ICV al comienzo de la fase oscura.

- 5 La fase oscura es el momento de alimentación natural de las ratas. Por lo tanto, evaluar el efecto de un factor de saciedad potencial en animales no en ayunas en este momento representaría un efecto más fisiológico.

Efecto de OXM en el consumo de alimentos.

- 10 En el estudio 3a, cuando se inyectaron en la fase oscura temprana, tanto el GLP-1 como la OXM (3 nmoles) redujeron significativamente el consumo de alimentos en comparación con el de animales tratados con solución salina 1 hora después de la inyección [Figura 3A].

Observación del comportamiento después de inyección ICV de OXM.

La administración ICV de la OXM (3 nmoles) en la fase oscura temprana condujo a una reducción significativa en episodios de alimentación (estudio 3a) y un aumento en el comportamiento de crianza (estudio 3b) [Fig. 3B]. No hubo cambio en episodios de acicalamiento, reposo, cabeza baja, escarbar o locomoción.

- 15 Para evaluar si OXM actúa mediante el GLP-1R, se realizó un estudio usando el antagonista de GLP-1R, exendina-(9-39).

Administración ICV. Estudio 4.

- 20 La co-administración ICV del antagonista de receptor de GLP-1 exendina-(9-39) con GLP-1 a una relación de 10:1 (antagonista/agonista) bloqueó los efectos anorexígenos de GLP-1 [Fig. 4A]. Además, la co-administración de exendina-(9-39) con OXM dio como resultado la atenuación del efecto anorexigénico de OXM [Fig 4A].

Administración iPVN.

De forma similar, cuando se inyecta iPVN, los efectos anorexígenos de tanto GLP-1 como OXM se bloquearon cuando se co-inyectaron con exendina-(9-39) [Fig 4B].

Ensayos de unión al receptor. Estudio 5.

- 25 La afinidad ( $CI_{50}$ ) de GLP-1 por el receptor de GLP en preparaciones de membrana hipotalámica de rata fue de 0,16 nM (Figura 5). La afinidad de OXM por el receptor GLP-1 en las mismas preparaciones de membrana fue de 8,2 nM (Figura 5), que es aproximadamente 2 órdenes de magnitud más débil que la de GLP-1.

Discusión.

- 30 La OXM provoca una reducción potente en realimentación inducida por ayuno cuando se inyecta tanto ICV como iPVN. El efecto se mantuvo hasta las 8 horas (iPVN) o 4 horas (ICV) después de la inyección. El efecto de OXM es aproximadamente de la misma magnitud y ciclo temporal que el de GLP-1 cuando se administra ICV e iPVN a dosis equimolares. Además, OXM inhibe el consumo de alimentos en ratas no en ayunas al comienzo de la fase oscura y en ese momento no mostraron signos de comportamiento aversivo.

- 35 Se ha sugerido que existe un sitio de unión específico de OXM en la mucosa gástrica. Sin embargo, no se ha identificado un sitio de unión tal en el SNC. Por lo tanto, se ha propuesto que OXM medió sus efectos mediante el GLP-1R hipotalámico, puesto que GLP-1 y OXM tienen potencia similar en los estudios de alimentación. Se ha mostrado que OXM tiene una afinidad nanomolar por el GLP-1R ( $CI_{50} = 8,2$  nM). Esta afinidad es aproximadamente 2 órdenes de magnitud más débil que la de GLP-1 ( $CI_{50} = 0,16$  nM). A pesar de esta afinidad reducida por el GLP-1R, OXM reduce el consumo de alimentos en la misma magnitud. Una explicación para esto es que OXM podría actuar a través de tanto GLP-1R como su propio receptor en el hipotálamo. Por lo tanto, OXM podría inducir una respuesta comparable a la de GLP-1 a pesar de su menor afinidad por el GLP-1R.

- 40 La exendina-(9-39), un fragmento del agonista de GLP-1R exendina-4, es un antagonista potente y selectivo en el GLP-1R. Cuando se co-inyectan GLP-1 y exendina-(9-39), las acciones anorexígenas de GLP-1 se bloquean. Cuando OXM se co-inyecta con exendina-(9-39), los efectos anorexígenos de OXM también se bloquean completamente. Esto reforzaría el argumento de que OXM media sus efectos mediante el GLP-1R.

- 45 Los inventores investigaron los efectos de glicentina y glucagón después de una inyección ICV aguda en ratas en ayunas. No se vio efecto en el consumo de alimentos inducido por ayuno después de la administración de estos péptidos. Además, no hubo efecto de estos péptidos cuando se administraron iPVN. Cuando SP-1, la estructura activa mínima potencial de OXM, se inyectó iPVN, no se observó inhibición de consumo de alimentos. Por lo tanto el efecto visto con OXM es específico.

50

Ejemplo 2

La administración periférica de OXM también reduce el consumo de alimentos y el aumento de peso corporal.

## Péptidos y agentes químicos

5 La OXM se obtuvo de IAF BioChem Pharma (Laval, Canadá). GLP-1 se obtuvo de Peninsula Laboratories Inc. (St. Helens, Reino Unido). Exendina 9-39 se sintetizó en el Consejo de Investigación Médica, Unidad de Hemostasis, Centro de Ciencias Clínicas, Hospital Hammersmith, Londres, Reino Unido usando química F-moc en un sintetizador peptídico 396 MPS (Advanced ChemTech Inc., Louisville, KY) y se purificó por HPLC de fase inversa en una columna C<sub>8</sub> (Phenomex, Macclesfield, Reino Unido), usando un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0,1 %.

10 El peso molecular correcto se confirmó por espectrometría de masas. Todos los agentes químicos se obtuvieron de Merck Eurolab Ltd. (Lutterworth, Leicestershire, Reino Unido), a no ser que se indique de otro modo.

## Animales

15 Se mantuvieron ratas Wistar machos adultas (180-200 g) en jaulas individuales en condiciones controladas de temperatura (21-23 °C) y luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) con acceso a voluntad a pienso de rata convencional (dieta RM1, Special Diet Services UK Ltd., Witham, Essex, Reino Unido) y agua. Todos los procedimientos realizados se aprobaron por el British Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (licencias de proyecto PPL: 90/1077, 70/5281 y 70/5516).

## Canulación de núcleo intra-arqueado

20 Los animales tenían cánulas guía de acero inoxidable unilaterales permanentes (Plastics One, Roanoke, VA) implantadas de forma estereotáctica en el núcleo arqueado del hipotálamo, usando un protocolo de canulación que usa cánulas posicionadas 3,3 mm posteriores a y 0,3 mm laterales a la bregma y 9,0 mm por debajo de la superficie exterior del cráneo.

## Inyecciones intraperitoneales (IP)

25 Todas las inyecciones IP se suministraron usando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 25. El volumen máximo de inyección fue de 500 µl y se ajustó de acuerdo con el peso del animal individual. Todos los péptidos se disolvieron en solución salina.

En estos estudios, la OXM humana y el GLP-1 humano se usaron con las secuencias proporcionadas en las páginas 15 y 16 anteriores.

Protocolos *in vivo*

30 1. Investigar el efecto de respuesta a dosis de administración periférica de OXM en el consumo de alimentos en animales en ayunas:

35 Se sometió a ayuno a los animales durante 24 horas antes del estudio. Durante la fase de la luz temprana (09.00-10.00 horas), se proporcionó a las ratas una inyección IP sencilla de solución salina, GLP-1 (30 nmoles/kg de peso corporal como un control positivo) u OXM (10-300 nmoles/kg de peso corporal) (n = 12 por grupo) en un volumen de 500 µl. Después de la inyección, se devolvió a los animales a sus jaulas respectivas y se proporcionó una cantidad pre-pesada de pienso. Se midió el consumo de alimentos 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección.

2. Investigar el efecto de administración periférica de OXM en el consumo de alimentos en animales no en ayunas durante la fase oscura:

40 La fase oscura es el momento de alimentación "normal" para las ratas. Por lo tanto, cualquier inhibición del consumo de alimentos en este momento podría considerarse que es más fisiológica que las alteraciones a la realimentación después de un ayuno. Los animales recibieron una inyección IP sencilla de solución salina u OXM (3-100 nmoles/kg de peso corporal) (n = 12 por grupo) antes de apagar las luces (18.00-19.00 horas). Se midió el consumo de alimentos 1, 2, 4, 8 y 12 horas después de apagar las luces.

3. El efecto de inyecciones IP repetidas de OXM

45 Se seleccionó aleatoriamente a 45 animales por peso en tres grupos (n = 15 por grupo): 1) tratados con solución salina con acceso a voluntad al alimento, 2) tratados con OXM (50 nmoles/kg de peso corporal por inyección - una dosis basada en el experimento de respuesta a dosis previo) con acceso a voluntad al alimento, 3) tratados con solución salina, pero con alimentos restringidos a la media de consumo de alimentos de fase luminosa y oscura del grupo tratado con OXM. Se inyectó a los animales dos veces diariamente (07.00 y 18.00 horas) durante siete días.

50 El consumo de alimentos (g), peso corporal (g) y consumo de agua (ml) se midieron diariamente. El octavo día, se sacrificó a los animales por decapitación. Se retiró el tejido adiposo blanco epididimal (WAT) y el tejido adiposo marrón interescapular (BAT) y se pesaron como una evaluación de adiposidad corporal.

4. Investigar el efecto de administración periférica de OXM en vaciado gástrico. Se sometió a ayunas a los animales durante 36 horas para asegurar que el estómago estaba vacío. Durante la fase de luz temprana (09:00-10:00) se permitió acceso a voluntad a una cantidad pre-pesada de pienso de ratas convencional durante treinta minutos. Después de ese tiempo, el alimento se retiró y se volvió a pesar. Se inyectó después IP a los animales solución salina, OXM (50 nmoles/kg de peso corporal) o CCK-8 (15 nmoles/kg de peso corporal). Se sacrificó a las ratas después en los mismos momentos que los usados en los estudios de alimentación previos: 1, 2, 4 u 8 horas después de la alimentación (n = 12 por grupo por punto temporal). El grupo CCK-8 se usó como un control positivo para el experimento solamente en el punto temporal de dos horas. Se sacrificó a los animales por asfixia con dióxido de carbono. Se realizó rápidamente una laparotomía y se expuso el estómago. Se ligó el punto de unión pilórico (2.0 Mersilk, Johnson & Johnson, Bélgica), seguido de ligación del punto de unión gastroesofágico y se retiró el estómago. Los contenidos gástricos se retiraron después, se colocaron en una bandeja de peso previamente pesada y se dejó que se secara al aire durante 48 horas. Una vez secos, los contenidos se pesaron y se calculó después el porcentaje del pienso ingerido durante el periodo de re-alimentación de media hora que permaneció en el estómago por rata usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de alimentos que permanecen en el estómago} = \frac{\text{peso seco de contenido del estómago}}{\text{peso del alimento ingerido}} \times 100$$

5. Investigar el efecto de dosis crecientes de OXM intra-arqueado

Se seleccionaron aleatoriamente ratas con cánulas intra-arqueadas (Intra-ARC (iARC)) (n = 12-15 por grupo) por peso en 6 grupos. Durante la fase de luz temprana (0900-1000), las ratas en ayunas durante 24 horas recibieron una inyección iARC de solución salina, OXM (0,01, 0,03, 0,1, 0,3 ó 1,0 nmoles). Se midió el consumo de alimentos 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección.

6. Investigar si OXM administrado periféricamente está actuando directamente mediante receptores de GLP-1 del núcleo arqueado.

Se seleccionaron aleatoriamente ratas con cánulas en el núcleo arqueado en 6 grupos (n = 10-12 por grupo). Durante la fase de luz temprana (0900-1000) las ratas en ayunas durante 24 horas recibieron una inyección iARC de solución salina o exendina<sub>9-39</sub> (5 nmoles) seguido de una inyección IP de solución salina, OXM (30 nmoles/kg de peso corporal) o GLP-1 (30 nmoles/kg de peso corporal) 15 minutos después. Los detalles de la inyección se describen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Grupo	Inyección intra-ARC	Inyección IP
1	Solución salina	Solución salina
2	Solución salina	OXM (30 nmoles/kg)
3	Solución salina	GLP-1 (30 nmoles/kg)
4	Exendina 9-39 (5 nmoles)	Solución salina
5	Exendina 9-39 (5 nmoles)	OXM (30 nmoles/kg)
6	Exendina 9-39 (5 nmoles)	GLP-1 (30 nmoles/kg)

#### Inmunohistoquímica

90 minutos después de una inyección IP de OXM (50 nmoles/kg), CCK (15 nmoles/kg) o solución salina, se anestesió de forma terminal a las ratas, se perfundió por vía transcardiaca solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) seguido de PB-formalina 4 % (PBF). El cerebro se retiró y se fijó durante una noche en PBF y después se transfirió a PB-sacarosa (20 % p/v) durante una noche. Se cortaron secciones coronales de 40 µm del cerebro y del tronco encefálico en un microtomo de congelación y se tiñeron con respecto a inmunorreactividad de tipo fos (FLI) por el procedimiento de avitina-biotina-peroxidasa. Las secciones se montaron después en portaobjetos revestidos con poli-L-lisina, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (50-100 %), se deslipidaron en xileno y se colocó un cubre-objetos usando un soporte DPX. Se examinaron los porta-objetos con respecto a núcleos positivos para FLI usando un microscopio de luz (Nikon Eclipse E-800) y se capturaron las imágenes usando un microimager (Xillix Microlmager). Los números de núcleos positivos para FLI en el hipotálamo y tronco encefálico se contaron por un miembro independiente del equipo de investigación que era ciego a los grupos experimentales. El número medio de núcleos positivos para FLI por sección se calculó y se expresó como un número entero para cada animal.

## Incubación estática de explante hipotalámico

Se usó un sistema de incubación estático. Se sacrificó a ratas Wistar macho por decapitación y se retiró el cerebro completo inmediatamente. El cerebro se montó, con la superficie ventral hacia arriba y se colocó en un microtomo de vibración (Microfield Scientific Ltd., Dartmouth, Reino Unido). Se tomó un corte de 1,7 mm desde el hipotálamo basal, se bloqueó lateral al polígono de Willis y se incubó en cámaras que contenían 1 ml de fluido cerebroespinal artificial que se equilibró con O<sub>2</sub> 95 % y CO<sub>2</sub> 5 %. El corte hipotalámico abarcaba el área preóptica media, PVN (núcleo hipotalámico paraventricular), núcleo dorsomedial, núcleo ventromedial, hipotálamo lateral y ARC. Los tubos se colocaron en una plataforma en un baño de agua mantenido a 37 °C. Después de un período de equilibrio inicial de 2 horas, cada explante se incubó durante 45 minutos en 600 µl de aCSF (período basal) antes de enfrentarse a un período de ensayo. Se usó OXM 100 nM como una dosis que representa una concentración diez veces la de su CI<sub>50</sub> para el receptor GLP-1. La viabilidad del tejido se confirmó por una exposición final de 45 minutos a aCSF que contenía KCl 56 mM. Al final de cada período experimental, el aCSF se retiró y se almacenó a -20 °C hasta la medición de inmunorreactividad a αMSH por radioinmunoensayo.

## Radioinmunoensayo para medir αMSH-IR

Se midió alfa-MSH usando un radioinmunoensayo interno, desarrollado usando un anticuerpo de Chemicon International Inc.

## Análisis estadístico

Los datos de los estudios de alimentación IP e iARC se analizaron mediante ensayo ANOVA con LSD (mínima diferencia significativa) post-hoc. Se analizaron los pesos de la almohadilla adiposa de diferentes grupos de tratamiento usando un ensayo de t de muestras no relacionadas. Los datos del estudio de incubación de explante hipotalámico, en el que cada explante se comparó con su propio período basal, se analizaron por ensayo de t para muestras relacionadas. En todos los casos P < 0,05 se consideró que era estadísticamente significativo.

## Resultados

## 1. El efecto de administración periférica de OXM en animales en ayunas:

La administración intraperitoneal de OXM (100 nmoles/kg y 300 nmoles/kg) provocó una inhibición significativa en la realimentación de animales en ayunas durante 24 horas una hora después de la inyección, en comparación con controles de solución salina (1 hora: OXM 100 nmoles/kg, 5,4 ± 0,2 g (P < 0,05), 300 nmoles/kg, 4,5 ± 0,2 g (P < 0,05) frente a solución salina, 6,3 ± 0,2 g). La reducción en el consumo de alimentos provocada por 100 nmoles/kg se mantuvo hasta 8 horas después de la inyección. Sin embargo, la dosis mayor de OXM (300 nmoles/kg) continuó inhibiendo significativamente el consumo de alimentos 24 horas después de la inyección (8 horas: OXM, 300 nmoles/kg, 9,5 ± 0,6 g frente a solución salina, 17,5 ± 0,7 g; P < 0,05) (Figura 6a). Los 30 nmoles/kg y 10 nmoles/kg no alteraron el consumo de alimentos en ningún punto temporal investigado.

## 2. El efecto de la administración periférica de OXM en animales no en ayunas en consumo de alimentos en fase oscura:

OXM, 3 y 10 nmoles/kg no afectó al consumo de alimentos en ningún punto temporal investigado en ratas que se alimentaban de forma nocturna inyectadas inmediatamente antes de la fase oscura. Sin embargo, OXM, 30 nmoles/kg, inhibió significativamente el consumo de alimentos hasta 2 horas después de la inyección (2 horas: OXM, 30 nmoles/kg, 4,5 ± 0,4 g frente a solución salina, 5,8 ± 0,4 g; P < 0,05). El consumo de alimentos se redujo 4 horas después de la inyección, pero esto no fue significativo. OXM, 100 nmoles/kg, inhibió significativamente el consumo de alimentos durante la fase oscura (8 horas: OXM, 100 nmoles/kg, 14,1 ± 0,8 g frente a solución salina, 16,9 ± 0,5 g; P < 0,05) (Figura 6b).

## 3. El efecto de la administración IP repetida de OXM

Inyecciones IP dos veces diarias de OXM (50 nmoles/kg) durante siete días provocaron una reducción significativa en el consumo de alimentos diario acumulativo, en comparación con animales de control tratados con solución salina (consumo de alimentos acumulativo día 7: OXM, 50 nmoles/kg, 168 ± 4,6 g frente a solución salina, 180 g + 4,3 g; P < 0,01) (Figura 7a). Además, los animales tratados con OXM ganaron peso de forma significativamente más lenta que los controles de solución salina (aumento de peso acumulativo día 7: OXM, 50 nmoles/kg, 21,0 ± 1,5 g frente a solución salina, 37,6 ± 1,9 g; P < 0,005). Además, los animales "alimentados en paralelo" con alimentación restringida no ganaron peso tan lentamente como los animales tratados con OXM, a pesar de recibir el mismo consumo de alimentos (día 7: alimentación en paralelo, 33,5 ± 2,0 g; P = NS frente a solución salina (alimentación a voluntad), P < 0,05 frente a OXM) (Figura 7b). Además, la OXM crónica causó una reducción en la adiposidad que no se vio en animales alimentados en paralelo con inyección de solución salina (Tabla 2). El consumo de agua se redujo significativamente en animales tratados con OXM los días 1 y 2 del experimento (día 1: OXM, 24,1 ± 1,28 ml frente a solución salina, 28,1 ± 1,33 ml; P < 0,05). Los días posteriores, hubo un aumento en el consumo de agua

diario en comparación con animales tratados con solución salina (días 3-6). Sin embargo, el día 7, no hubo diferencias en el consumo de agua entre los grupos tratados con solución salina y OXM (no mostrado). La diferencia de peso corporal entre las ratas "alimentadas en paralelo" y las ratas tratadas con OXM se debe al gasto de energía aumentado puesto que los dos grupos comieron la misma cantidad de alimentos.

5 Tabla 2: El efecto de la administración IP dos veces diarias de solución salina u OXM (50 nmoles/kg) durante siete días en el peso de WAT del epidídimo y BAT interescapular en ratas alimentadas a voluntad y con alimentación restringida.

Tejido/hormona	Solución salina	OXM	Alimentado con el par
WAT	0,69 ± 0,02	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>b</sup>
BAT	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>

4. El papel del vaciado gástrico retardado en el efecto anorexogénico de OXM:

10 Una hora después se presentó alimento a las ratas en ayunas durante 36 horas, el peso seco de los contenidos de los estómagos (como porcentaje del alimento consumido durante el periodo de alimentación de 30 minutos) de animales tratados con GLP-1 fue significativamente mayor que el de animales tratados con solución salina (1 hora: GLP-1, 50 nmoles/kg, 76,9 ± 2,7 g frente a solución salina, 65,8 ± 1,6 g; P<0,01), lo que sugiere que GLP-1 provocó una reducción significativa en el vaciado gástrico.

15 Los contenidos de los estómagos de animales tratados con OXM fue mayor que la de los controles tratados con solución salina, aunque esto no fuese estadísticamente significativo (1 hora: OXM, 50 nmoles/kg, 72,0 ± 1,4 g frente a solución salina, 65,8 ± 1,6 g; P=0,07). Dos horas después de la alimentación, OXM no afectó a los contenidos del estómago en comparación con animales tratados con solución salina.

20 Sin embargo, los animales inyectados con el control positivo para este punto temporal, CCK (15 nmoles/kg), tuvieron un contenido en el estómago significativamente mayor (2 horas: CCK, 15 nmoles/kg, 64,7 ± 6,4 g frente a solución salina, 38,5 g; P<0,01), lo que sugiere que CCK provocó una reducción significativa en la velocidad del vaciado gástrico. No hubo efecto de OXM sobre los contenidos del estómago, en comparación con animales tratados con solución salina, a las 4 u 8 horas después de la alimentación (Figura 8).

25 5. Investigar el efecto de dosis crecientes de OXM inyectadas en el núcleo intra-arqueado. El consumo de alimentos se inhibió significativamente por todas las dosis (excepto 0,01 nmoles) de OXM administrada iARC durante la primera hora de re-alimentación después de un ayuno de 24 horas (1 hora: OXM 0,03 nmoles, 6,1 ± 0,5 g (P<0,05); 0,01 nmoles, 5,6 ± 0,4 g (P<0,05); 0,3 nmoles, 5,1 ± 0,6 g (P<0,01); 1,0 nmoles, 3,6 ± 0,5 g (P<0,005) todos frente a solución salina, 7,7 ± 0,2 g) (Figura 9). OXM de 0,3 y 1,0 nmoles continuó inhibiendo significativamente el consumo de alimentos hasta 8 horas después de la inyección. Veinticuatro horas después de la inyección, el consumo de alimentos se inhibió por OXM 1,0 nmoles, aunque esto no fue significativo (24 horas: OXM, 1,0 nmoles, 37,8 ± 3,0 g frente a solución salina, 40,8 ± 1,6 g; P=NS).

6. Investigar si la OXM administrada de forma periférica actúa mediante receptores de GLP-1 de núcleo arqueado.

35 La administración intraperitoneal tanto de GLP-1 (30 nmoles/kg) como de OXM (30 nmoles/kg) provocó una inhibición significativa del consumo de alimentos una hora después del comienzo de la fase oscura (1 hora: GLP-1, 5,0 ± 0,6 g, OXM, 5,1 ± 0,4 g frente a solución salina, 9,2 ± 0,3 g). Sin embargo, la anorexia causada por administración IP de OXM se bloqueó por administración previa del antagonista del receptor de GLP-1, exendina 9-39 (300 nmoles/kg), inyectado directamente en el ARC (Tabla 3 y Figura 10). La inhibición del consumo de alimentos por GLP-1 IP no se vio afectada por la administración previa iARC de exendina 9-39.

40 Tabla 3: El efecto de la administración iARC de exendina 9-39 (5 nmoles) o solución salina inyectada 15 minutos antes de la administración IP de OXM (30 nmoles/kg), GLP-1 (30 nmoles/kg) o solución salina en el consumo de alimentos a 1 hora (g). (S = solución salina, G = GLP-1 (30 nmoles/kg), Ox = OXM (30 nmoles/kg), Ex = exendina 9-39 (5 nmoles)).

Péptido	Consumo de alimento (g)	E.T.M
Solución salina / solución salina	9,2	0,3
Solución salina / GLP-1	5,0	0,6
Exendina 9-39 / GLP-1	5,0	0,3
Solución salina /OXM	5,1	0,4
Exendina 9-39 / OXM	9,4	0,4
Exendina 9-39 / solución salina	9,0	0,3

## 7. Mapear la expresión de FLI en el hipotálamo en respuesta a OXM IP:

Después de la administración de OXM IP (50 nmoles/kg) se encontró tinción densa de FLI casi exclusivamente en el núcleo arqueado hipotalámico (Figura 11a). Ningún otro núcleo hipotalámico (PVN) (núcleo hipotalámico ventricular), DMH (núcleo hipotalámico dorsomedial), VMH (núcleo hipotalámico ventromedial)) demostró tinción específica de c-fos.

En el tronco encefálico, la CCK (15 nmoles/kg) IP provocó una tinción densa de FLI, más notablemente en el NTS (núcleo del tracto solitario) y el área postrema (Figura 6b). Sin embargo, ni la solución salina IP ni la OXM IP (50 nmoles/kg) provocaron un aumento específico en la expresión de c-fos en los mismos núcleos del tronco encefálico investigados (Figura 11b).

## 8. Cambios en la liberación de alfa-MSH de explantes hipotalámicos cuando se incuban con OXM

Incubar OXM (100 nM) con explantes hipotalámicos provocó un aumento significativo en la liberación de  $\alpha$ -MSH, en comparación con la liberación basal ( $\alpha$ -MSH: OXM, 100 nM,  $4,1 \pm 0,6$  fmoles/explante frente a  $2,6 \pm 0,5$  fmoles/explante;  $P < 0,005$ ). La viabilidad del explante se evaluó por incubación con KCl 56 mM y la viabilidad se confirmó en  $>80\%$  de los explantes. Los explantes que no fueron viables se excluyeron del análisis.

## Discusión

La administración periférica de OXM provoca una reducción en el consumo de alimentos en ratas. Esto se vio después de un ayuno en la fase de luz y durante la fase de alimentación nocturna. El efecto anorexogénico fue potente y prolongado durante periodos de hasta 24 horas. Dos administraciones diarias IP de OXM durante siete días provocaron una reducción en el consumo de alimentos diario en comparación con los tratados con solución salina, sin taquifilaxia. Los animales tratados con OXM ganaron significativamente menos peso que los animales alimentados en paralelo, a pesar de que los dos grupos recibieron un consumo calórico diario idéntico. La administración intraperitoneal de OXM redujo transitoriamente el consumo de agua aunque esto no fue prolongado, lo que sugiere que la reducción en la tasa de aumento de peso corporal no se debió a deshidratación.

Al concluir el estudio crónico, se retiraron WAT del epidídimo y BAT interescapular y se pesaron. Se descubrió que hubo una reducción en los pesos de todas las almohadillas adiposas en animales tratados con OXM en comparación con animales alimentados en paralelo, a pesar de un consumo de alimentos idéntico. Por lo tanto parece que la administración periférica de OXM también afecta otros parámetros metabólicos.

Un contribuyente principal a la saciedad es el vaciado gástrico retardado mediante mecanismos mediados por el nervio vago que conducen a la activación del tronco encefálico. Tanto GLP-1 como OXM son potentes inhibidores del vaciado gástrico en roedores y seres humanos y en el caso de GLP-1, se cree que este es el mecanismo dominante a través del que promueve la saciedad. Los inventores han planteado la hipótesis de que OXM estaba actuando de la misma manera y que sus efectos de vaciado gástrico eran la causa de anorexia prolongada. Sin embargo, aunque la administración periférica de OXM condujo a un ligero retardo en el vaciado gástrico en la primera hora después de la re-introducción de alimento, esto no fue significativo y el efecto fue de corta duración. Esto sugirió que OXM ralentiza el vaciado gástrico, pero probablemente no es el responsable de la inhibición prolongada y robusta del consumo de alimentos.

Los inventores indican aquí que la administración periférica de OXM aumenta la FLI casi exclusivamente en el ARC. Además, los inventores descubrieron que incubar el explante hipotalámico con OXM provocó un aumento significativo en la liberación del producto derivado de POMC (pro-opiomelanocortina),  $\alpha$ MSH de explantes hipotalámicos. OXM IP no afectó a la expresión de FLI en las áreas de NTS y AP que se sabe que son importantes en la integración de la información mediada por el nervio vago, fortaleciendo adicionalmente la noción de que OXM no está actuando mediante estas rutas.

Se cree que los núcleos en el tronco encefálico son el sitio principal de acción de GLP-1 y se envía información posteriormente al PVN hipotalámico, en el que se median sus efectos anorexígenos. La inyección directa de OXM en el ARC, incluso a dosis muy bajas provocó una inhibición robusta y prolongada del consumo de alimentos, apoyando adicionalmente la hipótesis de que el ARC es el sitio de las acciones de OXM. Los efectos anorexígenos causados por administración periférica de OXM se bloquearon por administración previa de exendina 9-39 en el ARC. Resulta interesante observar, sin embargo, que las acciones anorexígenas de GLP-1 administrado periféricamente no se bloquearon. Este hallazgo indica firmemente que la OXM está actuando mediante receptores de GLP-1 en el ARC. Además, ha identificado rutas específicas que median las acciones de GLP-1 y OXM.

Tomados juntos, estos datos demuestran que OXM es potencialmente importante en regulación tanto a largo como a corto plazo del consumo de alimentos y mantenimiento del peso corporal. En lugar de reducir el apetito mediante rutas de saciedad "tradicionales", que implican la ralentización del vaciado gástrico y la activación de los núcleos del tronco encefálico, la OXM en circulación media sus efectos anorexígenos mediante interacción directa con ARC, potencialmente por activación de neuronas de POMC (pro-opiomelanocortina) dentro del núcleo. Por lo tanto, la OXM puede ser útil en el tratamiento o prevención del exceso de peso tal como obesidad en mamíferos y además representa una nueva diana para el desarrollo de agentes terapéuticos en el tratamiento de exceso de peso tal como

obesidad de mamíferos.

### Ejemplo 3

#### Investigación del Efecto de Infusión de OXM en el Consumo de Alimentos en Sujetos Humanos

##### Procedimientos

##### 5 Estudio 1

El diseño del estudio fue un cruce controlado por placebo de doble ciego, véase Figura 12. 13 voluntarios sanos (edad  $27 \pm 2$  años; BMI  $25,3 \pm 0,7 \text{ kg}^{-2}$ ) recibieron una infusión intravenosa de 90 minutos de OXM ( $3,0 \text{ pmoles/kg/minuto}$ ) y una infusión de solución salina con  $\geq 1$  semana de separación, en orden aleatorio. OXM se disolvió en solución salina que contenía haemaccel (5 % en volumen) para reducir la adsorción a la jeringa y a los tubos. Los voluntarios completaron una comida diariamente durante tres días antes de cada infusión y durante las siguientes 24 horas. Se instruyó a los sujetos para seguir una dieta similar los días precedentes a cada infusión. Consumieron una comida idéntica (de su elección) la noche antes de cada infusión y estuvieron en ayunas desde las 9 pm.

En cada día del estudio se insertaron cánulas intravenosas bilateralmente en venas de los brazos, una para administración de la infusión, mientras que otra se usó para toma de muestras sanguíneas. Se conectó a los sujetos a un monitor cardíaco y se midió la presión cada 15 minutos. Se recogieron muestras sanguíneas cada 30 minutos en tubos de Litio-Heparina (LIP LTD, Reino Unido) que contenían 5.000 Unidades Inhibidoras de Kallikreina (2 ml) de aprotinina (TrasyloI, Bayer) y se almacenaron en hielo. Después de la centrifugación se separó inmediatamente el plasma y se almacenó a  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

15 15 minutos antes de la finalización de la infusión, se ofreció a los sujetos una comida de tipo bufet que se proporcionó en exceso de modo que todos los apetitos pudieran satisfacerse y los sujetos fueran incapaces de evaluar su propio consumo de alimentos. Las selecciones consistieron en pollo al curry, arroz blanco cocido, macedonia y una diversidad de mini barras de chocolate y dulces con sabor a frutas. El agua estuvo libremente disponible. El consumo dietético se calculó pesando los alimentos y el agua de pre y postprandial.

25 El consumo de alimentos durante 24 horas después del alimento de tipo bufet se registró en diarios de alimentos y el consumo de energía se calculó con la ayuda del programa Dietplan (Forestfield Software LTD, West Sussex, Reino Unido).

30 Cada 30 minutos los sujetos completaron escalas análogas visuales (VAS) que evaluaban hambre, saciedad, plenitud, consumo de alimentos prospectivo y náusea. Estas consistieron en escalas de 100 mm expresando el texto la puntuación más positiva y la negativa ajustada a cada extremo.

##### Estudio 2

Se siguió el mismo protocolo que en el Estudio 1, excepto que se administró a los ocho voluntarios sanos en ayunas OXM por vía subcutánea a dosis de 100 nmoles a 250 nmoles (en solución salina normal) treinta minutos antes del bufet.

##### 35 Resultados

##### Estudio 1

40 La infusión de OXM condujo a una reducción significativa en las calorías consumidas en la comida de tipo bufet ( $192 \pm 59 \text{ kcal}$ ;  $17,6 \pm 5,7 \%$ ). 12/13 sujetos mostraron una reducción en las calorías consumidas con infusión de OXM, véase Figura 13. La infusión de OXM se asoció con una reducción significativa en las puntuaciones de hambre subjetivas, véase Figura 14 (VAS “¿Cuánta hambre tiene ahora mismo?” 60 minutos  $P < 0,05$ ). No hubo efectos adversos de la infusión de OXM. En particular no hubo efectos de OXM en sensaciones de mareo (náuseas) (VAS “¿Cómo de mareado se encuentra ahora mismo?” 75 minutos  $P = 0,8$ ). El efecto parece ser rápido.

## Estudio 2

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Nombre	wt KG	BMI	dosis nmol	dosis nmol/kg	Energía (Kcal)		Kcal	
					solución salina	sc oxm	Dif	Dif %
01	89	27	100	1,12	1344	283	-1061	-79
02	95	28	100	1,05	1059	840	-219	-21
03	89	28	150	1,69	917	731	-186	-20
04	91	30	150	1,65	530	467	-63	-12
05	92	31	150	1.63	381	283	-98	-26
06	87	29	200	2,29	922	667	-255	-28
07	113	36	250	2,21	966	875	-91	-9
08	106	36	250	2,36	910	742	-168	-18
				MEDIA	879	611	-268	-32
				ETM	106	84	116	12

## Discusión

- 5 La demostración de que la administración parenteral de OXM a sujetos humanos da como resultado una reducción en las calorías consumidas y una reducción significativa en sensaciones subjetivas de hambre sin efectos secundarios no deseados, en particular, sensaciones de mareo (nauseas) es una confirmación de la utilidad de OXM en el tratamiento o prevención de exceso de peso tal como obesidad en mamíferos y como una nueva diana para el desarrollo de agentes terapéuticos en el tratamiento de exceso de peso tal como obesidad en mamíferos.

10 Ejemplo 4

Investigación de los niveles de inmunorreactividad a OXM (IR) e inmunorreactividad IR a grelina (IR-grelina) en plasma después de administración IP de OXM.

## Procedimientos

- 15 Se administró OXM o solución salina a ratas en ayunas para investigar los niveles de IR-OXM e IR-grelina en plasma después de OXM IP. Se midieron los niveles de IR-OXM en plasma, usando un ensayo previamente descrito, que también mide el enteroglucagón (es decir, OXM alargada en el extremo N-terminal) (Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR 1983 J Clin Endocrinol Metab 57: 488-495). El ensayo de IR-OXM pudo detectar cambios de 10 pmoles/l (límite de confianza del 95 %) con una variación intra-ensayo del 5,7 %. El radioinmunoensayo de grelina (English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP 2002 J Clin Endocrinol Metab 87: 2984) midió tanto octanoil como des-octanoil grelina (grelina Total). No reaccionó de manera cruzada con ninguna hormona peptídica gastrointestinal o pancreática conocida y pudo detectar cambios de 10 pmoles/l (límite de confianza del 95 %) con una variación intra-ensayo de 9,5 %.

- 25 Se inyectó a ratas (n=10 por grupo) IP OXM (30 nmoles/kg y 100 nmoles/kg) o solución salina al comienzo de la fase de luz. Las ratas se decapitaron 30 y 90 minutos después de la inyección IP, se recogió sangre del tronco. Todo el plasma se recogió y se congeló a -20 °C hasta que se ensayo con respecto a IR-OXM e IR-grelina. Durante el periodo completo post-inyección las ratas permanecieron en ayunas. Los puntos temporales y las dosis de OXM se seleccionaron con referencia a estudios de alimentación previos.

- 30 Se ha descubierto que la liberación de hormonas en el intestino está influida por el contenido de la dieta, en particular el contenido de grasas. Por esta razón, se investigaron tres grupos adicionales (n = 10): a) ratas en ayunas durante una noche y sacrificadas al comienzo de la fase de luz, b) ratas alimentadas con pienso para ratas alto en grasa (45 % de grasa, Research Diets Inc.) durante una noche y decapitadas al comienzo de la fase de luz, c) ratas en ayunas durante una noche y al comienzo de la fase de luz, se les administró acceso a voluntad a pienso alto en grasa 45 % durante 2 horas. Las ratas se decapitaron la final de esta comida alta en grasa de 2 horas (es decir, 2 horas después del comienzo de la fase de luz). Todo el plasma se recogió y se congeló a -20 °C hasta que se

ensayó con respecto a IR-OXM e IR-grelina.

#### Resultados

La administración IP de OXM (30 nmoles/kg y 100 nmoles/kg) aumentó IR-OXM en plasma 30 y 90 minutos después de la inyección (30 minutos IR-OXM en plasma pmol/l: solución salina  $61,8 \pm 8,9$ , OXM 30 nmoles/kg  $448,9 \pm 184,4$ , OXM 100 nmoles/kg  $997,1 \pm 235,4$ , 90 minutos en plasma IR-OXM pmol/l: solución salina  $47,5 \pm 4,5$ , OXM 30 nmoles/kg  $150,6 \pm 52,5$ , OXM 100 nmoles/kg  $107,8 \pm 25,0$ ).

Los niveles de IR-OXM en plasma se determinaron en tres grupos adicionales: a) Ratas en ayunas durante una noche y sacrificadas al comienzo de la fase de luz (IR-OXM en plasma pmoles/l:  $51,9 \pm 5,8$ ), b) Ratas alimentadas con pienso para ratas alto en grasa durante una noche y decapitadas al comienzo de la fase de luz (IR-OXM en plasma pmoles/l:  $220,2 \pm 22,2$ ), c) Ratas en ayunas durante una noche, después proporcionadas acceso a voluntad a pienso alto en grasa durante 2 horas al comienzo de la fase de luz, se decapitaron al final de la comida alta en grasa de 2 horas (IR-OXM en plasma pmoles/l:  $254,0 \pm 32,7$ ).

La administración IP de OXM (30 nmoles/kg y 100 nmoles/kg) redujo significativamente la IR-grelina en plasma en ayunas y 90 minutos después de la inyección (30 minutos grelina en plasma pmoles/l: solución salina,  $1056,9 \pm 64,0$ , OXM, 30 nmoles/kg  $867,4 \pm 42,0$  ( $p < 0,01$ ), OXM, 100 nmoles/kg  $860,0 \pm 47,5$  ( $p < 0,02$ ). Noventa minutos IR-grelina en plasma pmol/l: solución salina,  $1055,2 \pm 52,5$ , OXM, 30 nmoles/kg  $886,9 \pm 36,3$  ( $p < 0,01$ ), OXM, 100 nmoles/kg  $900,0 \pm 52,9$  ( $P < 0,05$ ), véase Figura 15.

Los niveles de IR-grelina en plasma se determinaron en tres grupos adicionales: a) Ratas en ayunas durante una noche y sacrificadas al comienzo de la fase de luz (IR-grelina en plasma pmoles/l:  $1066,1 \pm 80,9$ ), b) Ratas alimentadas con pienso de rata alto en grasa durante una noche y decapitadas al comienzo de la fase de luz (IR-grelina en plasma pmoles/l:  $611,3 \pm 16,9$ ), c) Ratas en ayunas durante una noche, al comienzo de la fase luz se les proporcionó acceso a voluntad a pienso alto en grasa durante 2 horas, se decapitaron al final de la comida alta en grasa de 2 horas (grelina en plasma pmoles/l:  $648,9 \pm 57,3$ ).

#### Ejemplo 5

#### Investigación del efecto de la infusión de OXM en sujetos humanos

##### Procedimientos

##### Diseño del estudio

El diseño del estudio fue como en el Ejemplo 3. Los sujetos permanecieron en la habitación de estudio hasta  $t_{225}$ . Continuaron hasta completar VAS hasta las 09:00 de la mañana siguiente y se registró el consumo de alimentos en diarios durante 24 horas después de la comida de tipo bufet (hasta las 13:00 del día siguiente). Los diarios de alimento se analizaron por un dietista ciego al estudio y el consumo de energía se calculó con ayuda del programa Dietplan (Forestfield Software LTD, West Sussex, Reino Unido).

##### Mediciones de hormona en plasma

Todas las muestras se ensayaron por duplicado y dentro de un ensayo para eliminar variación inter-ensayos. Se midieron OLI, glucagón pancreático, péptido YY (PYY), insulina, péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1) y grelina en plasma usando RIA internos establecidos. El ensayo de OLI (Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR 1983 J Clin Endocrinol Metab 57:488-495) pudo detectar cambios de 10 pmoles/l (límite de confianza de 95 %) con una variación intra-ensayo de 5,7 %. El ensayo de PYY (Adrian TE, Savage AP, Sagor GR, Allen JM, Bacarese-Hamilton AJ, Tatemoto K, Polak JM, Bloom SR 1985 Gastroenterology 89:494-499) pudo detectar cambios de 2 pmoles/l (límite de confianza de 95 %) con una variación intra-ensayo de 5,8 %. El anticuerpo PYY fue específico para el extremo C terminal de PYY y reacciona de manera cruzada completamente con PYY 3-36 humano. El ensayo de insulina (Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR 1987 Lancet 2:1300-1304) pudo detectar cambios de 6 pmoles/l (límite de confianza de 95 %) con una variación intra-ensayo de 5,4 %. El ensayo de GLP-1 (Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR 1987 Lancet 2:1300-1304) pudo detectar cambios de 8 pmoles/l (límite de confianza de 95 %) con una variación intra-ensayo de 6,1 %. El anticuerpo de GLP-1 fue específico para GLP-1 amidado y no reacciona de forma cruzada con GLP-1 (1-37), GLP-1 (1-36) o GLP-1 (7-37). El ensayo de grelina (English PJ, MA Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP 2002 J Clin Endocrinol Metab 87:298) pudo detectar cambios de 10 pmoles/l (límite de confianza de 95 %) con una variación intra-ensayo de 9,5 %. Se midió la leptina en plasma usando el kit RIA de leptina humana de Linco Research (Missouri, Estados Unidos).

#### Resultados

##### 1. Efectos de infusión de OXM en el consumo de energía

La infusión de OXM redujo significativamente el consumo de energía en la comida de tipo bufet en  $19,3 \pm 5,6$  % (reducción frente a solución salina:  $220 \pm 60$  kcal,  $P < 0,01$ ). 12 de los 13 sujetos estudiados mostraron una

reducción en el consumo de energía con infusión de OXM (Figura 17). No hubo una causa obvia para la falta de respuesta en un sujeto. La infusión de OXM redujo significativamente el consumo de energía acumulativo de 12 horas en  $11,3 \pm 6,2$  % (reducción frente a solución salina:  $365 \pm 159$  kcal,  $P < 0,05$ ) (figura 3). El consumo de energía acumulativa a las 24 horas no se alteró significativamente (solución salina  $3043 \pm 366$  kcal, OXM  $2768 \pm 297$  kcal). OXM no cambió el consumo de agua o la proporción de calorías obtenida de diferentes macronutrientes en la comida de tipo bufet o en el consumo de alimentos acumulativo posterior de 12 y 24 horas.

## 2. Efectos de la infusión de OXM sobre el apetito y apetibilidad

Durante la infusión de solución salina las puntuaciones análogas visuales para hambre no cambiaron significativamente a lo largo del período de ayunas (Figura 18) mientras que la infusión de OXM provocó una reducción significativa en el hambre (ABC de incremento  $t_0$  a  $t_{75}$ : solución salina +  $273 \pm 128$  mm.minuto, OXM menos  $374 \pm 185$  mm.minuto,  $P < 0,05$ ). La reducción de hambre después de la comida de tipo bufet fue similar en días de infusión de OXM y solución salina y las puntuaciones de hambre permanecieron similares en lo sucesivo. La duración de la comida se redujo significativamente por OXM (solución salina  $19,2 \pm 1,3$  minutos, OXM  $15,1 \pm 1,8$  minutos,  $P < 0,05$ ). No hubo un efecto significativo de OXM en las puntuaciones análogas visuales para saciedad, consumo de alimentos prospectivo, náuseas y apetibilidad de comidas (datos no mostrados).

## 3. Niveles en plasma de inmunorreactividad de tipo OXM (OLI)

La infusión de OXM elevó la OLI en plasma de  $62 \pm 5$  pmoles/l a un máximo de  $907 \pm 32$  pmoles/l a  $t_{60}$  (Figura 19). En comparación, el día de infusión de solución salina, el consumo de la comida de tipo bufet condujo a un nivel de OLI postprandial máximo de  $151 \pm 18$  pmoles/l a 195 minutos. El análisis de permeación en gel de muestras de plasma durante la infusión de OXM (Figura 20) demostró un máximo inmunorreactivo sencillo que eluye en la misma posición que OXM sintético ( $K_{av} = 0,6$ ). Por lo tanto OXM de longitud completa intacta fue la forma en circulación principal.

## 4. Efectos de infusión de OXM en la grelina en plasma

Durante la infusión de solución salina, los niveles de grelina en plasma aumentaron a lo largo del período de ayunas (a  $461 \pm 32$  pmoles/l,  $t_{75}$   $484 \pm 35$  pmoles/l) y se redujo postprandialmente ( $t_{225}$   $357 \pm 28$  pmoles/l). Sin embargo, durante la infusión de OXM los niveles en ayunas de grelina se redujeron antes de la comida (a  $482 \pm 33$  pmoles/l,  $t_{75}$   $435 \pm 35$  pmoles/l) y hubo una reducción postprandial adicional en grelina ( $t_{225}$   $356 \pm 31$  pmoles/l). Por lo tanto la grelina en plasma antes de la comida de tipo bufet se redujo significativamente por infusión de OXM en comparación con solución salina (cambio medio en grelina de  $t_{75}$ : solución salina +  $24 \pm 10$  pmoles/l, OXM menos  $47 \pm 11$  pmoles/l,  $P < 0,0001$ ) (Figura 21). La supresión de grelina en plasma debido a infusión de OXM representa  $44 \pm 10$  % de la reducción postprandial en grelina el día de infusión de solución salina correspondiente (reducción postprandial media  $155 \pm 19$  pmoles/l).

## 5. Efectos de la infusión de OXM en los niveles de hormonas en plasma

No hubo un efecto significativo de la infusión de OXM en los niveles en ayunas en plasma de PYY, insulina, glucagón pancreático, GLP-1 o leptina (Tabla 1). Las concentraciones en plasma de leptina en sujetos femeninos fue mayor que en masculinos como se ha indicado previamente.

## Discusión

Los inventores han demostrado que la administración sistémica de OXM reduce significativamente el consumo de alimentos en sujetos humanos sanos. La infusión intravenosa de OXM redujo el consumo de calorías en 19 % en la comida de tipo bufet y el consumo de energía acumulativo se redujo en las 12 horas después de la infusión. Alteraciones mucho menores en el consumo de alimentos conducirían a pérdida de peso si se prolongaran a largo plazo. Sin embargo no hubo efecto significativo de OXM en el consumo de energía acumulativa de 24 horas. El trabajo de los inventores indica que OXM puede aumentar el gasto de energía. OXM no afectó al disfrute de la comida, lo que es importante en vista de su uso terapéutico potencial.

La grelina es un estimulador potente del apetito en el hombre (Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992) y se ha sugerido que los aumentos preprandiales de grelina en plasma son un desencadenante del inicio de la comida (Cummings DE, Pumell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719). Por lo tanto nuestro nuevo hallazgo de que la infusión de OXM suprime la grelina en plasma en ayunas es potencialmente importante. La inhibición del aumento preprandial normal de grelina por OXM es probablemente un mecanismo por el que la infusión de OXM reduce el apetito. Este hallazgo puede también arrojar luz sobre el mecanismo escasamente entendido por el que los niveles de grelina se reducen postprandialmente. En roedores, los aumentos en ayunas de grelina en plasma, mientras se consume glucosa por vía oral, pero no agua, reduce la secreción de grelina, lo que sugiere que la supresión de grelina en plasma está relacionada con la ingestión de nutrientes en lugar de distensión estomacal. Por lo tanto OXM liberada en respuesta a ingestión de nutrientes puede

contribuir a la inhibición postprandial normal de grelina en plasma. Se cree que solamente una proporción de la grelina en circulación total es la forma octanilada biológicamente activa. El efecto del consumo de alimentos e infusión de OXM puede ser reducir principalmente los niveles de esta grelina activa.

5 Se ha mostrado que la infusión intravenosa de OXM inhibe el vaciado gástrico en seres humanos. La supresión de vaciado gástrico puede conducir a distensión gástrica aumentada lo que puede contribuir a saciedad causando una sensación de plenitud. En el presente estudio las puntuaciones de hambre se redujeron significativamente por OXM en el estado de ayunas cuando la distensión gástrica probablemente no es importante. Por lo tanto la reducción del apetito en el período pre-comida no es probable que resulte de efectos de OXM en el vaciado gástrico. El efecto anorexogénico de OXM no parece estar mediado por estimulación de la liberación de PYY o leptina puesto que las concentraciones de estas hormonas no estuvieron afectadas por la infusión de OXM.

10 Los inventores han demostrado en seres humanos el efecto anorexogénico de los niveles elevados en circulación de OXM. La infusión de OXM produjo niveles en circulación de OLI que fueron comparables con las concentraciones elevadas vistas en esprue tropical y después de revascularización quirúrgica yeyuno-ileal para obesidad mórbida. Por lo tanto OXM puede contribuir a la pérdida de apetito y pérdida de peso observada en estas afecciones. Los inventores consideran que las concentraciones postprandiales inferiores de OXM contribuyen a la reducción fisiológica del apetito en individuos normales y que la administración exógena de OXM tiene capacidad de reducir el consumo de alimentos y/o aumentar el gasto de energía en los obesos.

15 Tomados juntos, estos datos demuestran que la OXM es potencialmente importante en regulación tanto a largo como a corto plazo del consumo de alimentos, gasto de energía y mantenimiento del peso corporal. Por lo tanto, la OXM puede ser útil en el tratamiento o prevención de exceso de peso tal como obesidad en mamíferos y representa además una diana para el desarrollo de agentes terapéuticos en el tratamiento del exceso de peso tal como obesidad en mamíferos, especialmente en seres humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD
- <120> MODIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO
- <130> 9250WO/Jsvn
- 30 <150> GB 0300571.7
- <151> 10-01-2003
- <160> 8
- 35 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 40 <211> 37
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Lys Asn Asn Ile Ala  
 35

45

<210> 2  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Lophius piscatorius

5

<400> 2

His Ser Glu Gly Thr Phe Ser Asn Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Asp  
 1 5 10 15

Arg Lys Ala Gln Glu Phe Val Arg Trp Leu Met Asn Asn Lys Arg Ser  
 20 25 30

Gly Val Ala Glu  
 35

10

<210> 3  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Anguilla japonica

15

<400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Asn Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Thr  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Ser Lys Arg Ser  
 20 25 30

Gly Gly Pro Thr  
 35

20

<210> 4  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 4

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

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu  
 20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly  
 35

30

<210> 5  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 5

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

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gly Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu  
 20 25 30

Val Lys Gly Arg  
 35

5  
 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

10  
 15  
 <210> 7  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

20  
 25  
 <210> 8  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu  
 1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr  
 20 25 30

Arg Gln Arg Tyr  
 35

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende oxintomodulina y uno o más agentes adicionales, cada uno de los cuales tiene una influencia en el peso y/o el consumo de alimentos.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en una forma adecuada para administración mediante una vía periférica al cerebro.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en una forma adecuada para administración por una vía oral, mucosa (por ejemplo, bucal, sublingual, nasal, rectal), subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.
- 10 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente o agentes adicionales tienen uno cualquiera o más de los siguientes efectos: reducen el consumo de alimentos y/o reducen el hambre, reducen el peso, reducen o previenen la obesidad, aumentan el gasto de energía o reducen la disponibilidad de nutrientes en un mamífero.
- 15 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente adicional o uno de los agentes adicionales es GLP-1 o un agonista del mismo; el agente adicional o uno de los agentes adicionales es PYY o un agonista del mismo; o los agentes adicionales son PYY o un agonista del mismo y GLP-1 o un agonista del mismo.
- 20 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en forma farmacéutica unitaria, en la que el PYY o agonista del mismo y/o el GLP-1 o agonista del mismo se administra periféricamente a una dosis de 0,1 nmoles por kg de peso corporal del sujeto o más, por ejemplo, 0,2 nmoles o más, por ejemplo, 0,4 nmoles o más, por ejemplo, 0,6 nmoles o más, por ejemplo, 0,8 nmoles o más, por ejemplo, 1,0 nmoles o más, por ejemplo, 1,2 nmoles o más, por ejemplo, 1,4 nmoles o más, por ejemplo, 1,6 nmoles o más, por ejemplo, 1,8 nmoles o más, por ejemplo, 2,0 nmoles o más, por ejemplo, 2,2 nmoles o más, por ejemplo, 2,4 nmoles o más, por ejemplo, 2,6 nmoles o más, por ejemplo, 2,8 nmoles o más, por ejemplo, 3,0 nmoles o más, por ejemplo, hasta 3,2 nmoles por kg de peso corporal.
- 25 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6 en forma farmacéutica unitaria, en la que el PYY o agonista del mismo y/o el GLP-1 o agonista del mismo se administra periféricamente en una cantidad de hasta 3,0 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, hasta 2,8 nmoles, por ejemplo, hasta 2,6 nmoles, por ejemplo, hasta 2,4 nmoles, por ejemplo, hasta 2,2 nmoles, por ejemplo, hasta 2,0 nmoles, por ejemplo, hasta 1,8 nmoles, por ejemplo, hasta 1,4 nmoles, por ejemplo, hasta 1,2 nmoles, por ejemplo, hasta 1,0 nmoles, por ejemplo, hasta 0,8 nmoles, por ejemplo, hasta 0,6 nmoles, por ejemplo, hasta 0,4 nmoles, por ejemplo, hasta 0,2 nmoles por kg de peso corporal.
- 30 8. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en forma farmacéutica unitaria en la que la oxintomodulina se administra periféricamente a una dosis de, por ejemplo, 0,1 nmoles o más por kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, 0,2 nmoles o más, por ejemplo, 0,5 nmoles o más, por ejemplo, 1 nmol o más, por ejemplo, 1,5 nmoles o más, por ejemplo, 2 nmoles o más, por ejemplo, 2,5 nmoles o más, por ejemplo, 3 nmoles o más, por ejemplo, 4 nmoles o más, por ejemplo, 5 nmoles o más, por ejemplo, 6 nmoles o más, por ejemplo, 7 nmoles o más, por ejemplo, 8 nmoles o más, por ejemplo, 9 nmoles o más, por ejemplo, 10 nmoles, por ejemplo, 11 nmoles o más, por ejemplo, hasta 12 nmoles por kg de peso corporal.
- 35 9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en forma farmacéutica unitaria en la que la oxintomodulina se administra a una dosis de hasta 11 nmoles por kg de peso corporal, por ejemplo, hasta 10 nmoles, por ejemplo, hasta 9 nmoles, por ejemplo, hasta 8 nmoles, por ejemplo, hasta 7 nmoles, por ejemplo, hasta 6 nmoles, por ejemplo, hasta 5 nmoles, por ejemplo, hasta 4 nmoles, por ejemplo, hasta 3 nmoles, por ejemplo, hasta 2 nmoles, por ejemplo, hasta 1 nmol, por ejemplo, hasta 0,5 nmoles, por ejemplo, hasta 0,4 nmoles, por ejemplo, hasta 0,2 nmoles por kg de peso corporal.
- 40 10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en forma farmacéutica unitaria en la que la dosis de oxintomodulina y/o la dosis de PYY o agonista del mismo y/o el GLP-1 o agonista del mismo se calcula basándose en un sujeto de 70 a 75 kg.
- 45 11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en una forma adecuada para administración subcutánea, en la que la dosis de oxintomodulina es de 0,5 mg a 2 mg.
- 50 12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un procedimiento para reducir el consumo de calorías en un sujeto, para reducir el apetito en un sujeto, para reducir el consumo de alimentos en un sujeto, para aumentar el gasto de energía en un sujeto, para control de peso o tratamiento en un sujeto, para reducción o prevención de obesidad en un sujeto, para prevenir y reducir el aumento de peso en un sujeto; para inducir y promover la pérdida de peso en un sujeto; un procedimiento para reducir la obesidad según se mide por el índice de masa corporal; un procedimiento para controlar uno cualquiera o más de apetito, saciedad y hambre en un sujeto; un procedimiento para mantener el peso corporal deseado, un índice de masa corporal deseado y/o una apariencia deseada y buena salud en un sujeto; un procedimiento para mejorar el perfil lipídico en
- 55

un sujeto; un procedimiento para aliviar una afección o trastorno en un sujeto, pudiendo aliviarse dicha afección o trastorno reduciendo la disponibilidad de nutrientes y/o aumentando el gasto de energía; o un procedimiento para reducir los niveles de grelina en circulación en un sujeto.

- 5 13. Uso de oxintomodulina y uno o más agentes adicionales, cada uno de los cuales tiene una influencia en el peso y/o consumo de alimentos, para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para reducir el consumo de calorías en un sujeto, para reducir el apetito en un sujeto, para reducir el consumo de alimento en un sujeto, para aumentar el gasto de energía en un sujeto, para control de peso o tratamiento en un sujeto, para reducción o prevención de obesidad en un sujeto, para prevenir y reducir el aumento de peso en un sujeto; para inducir y promover la pérdida de peso en un sujeto; un procedimiento para reducir la obesidad en un sujeto según se mide por el índice de masa corporal; un procedimiento para controlar uno cualquiera o más de apetito, saciedad y hambre en un sujeto; un procedimiento para mantener buena salud en un sujeto; un procedimiento para mejorar el perfil lipídico en un sujeto; un procedimiento para aliviar una afección o trastorno en un sujeto, pudiendo aliviarse dicha afección o trastorno reduciendo la disponibilidad de los nutrientes y/o aumentando el gasto de energía; o un procedimiento para reducir los niveles de grelina en circulación en un sujeto.
- 10
- 15 14. Un procedimiento no terapéutico para mantener el peso corporal deseado, un índice de masa corporal deseado y/o una apariencia deseada en un sujeto, que comprende administrar al sujeto oxintomodulina y uno o más agentes adicionales, cada uno de los cuales tiene una influencia en el peso y/o consumo de alimentos del sujeto.

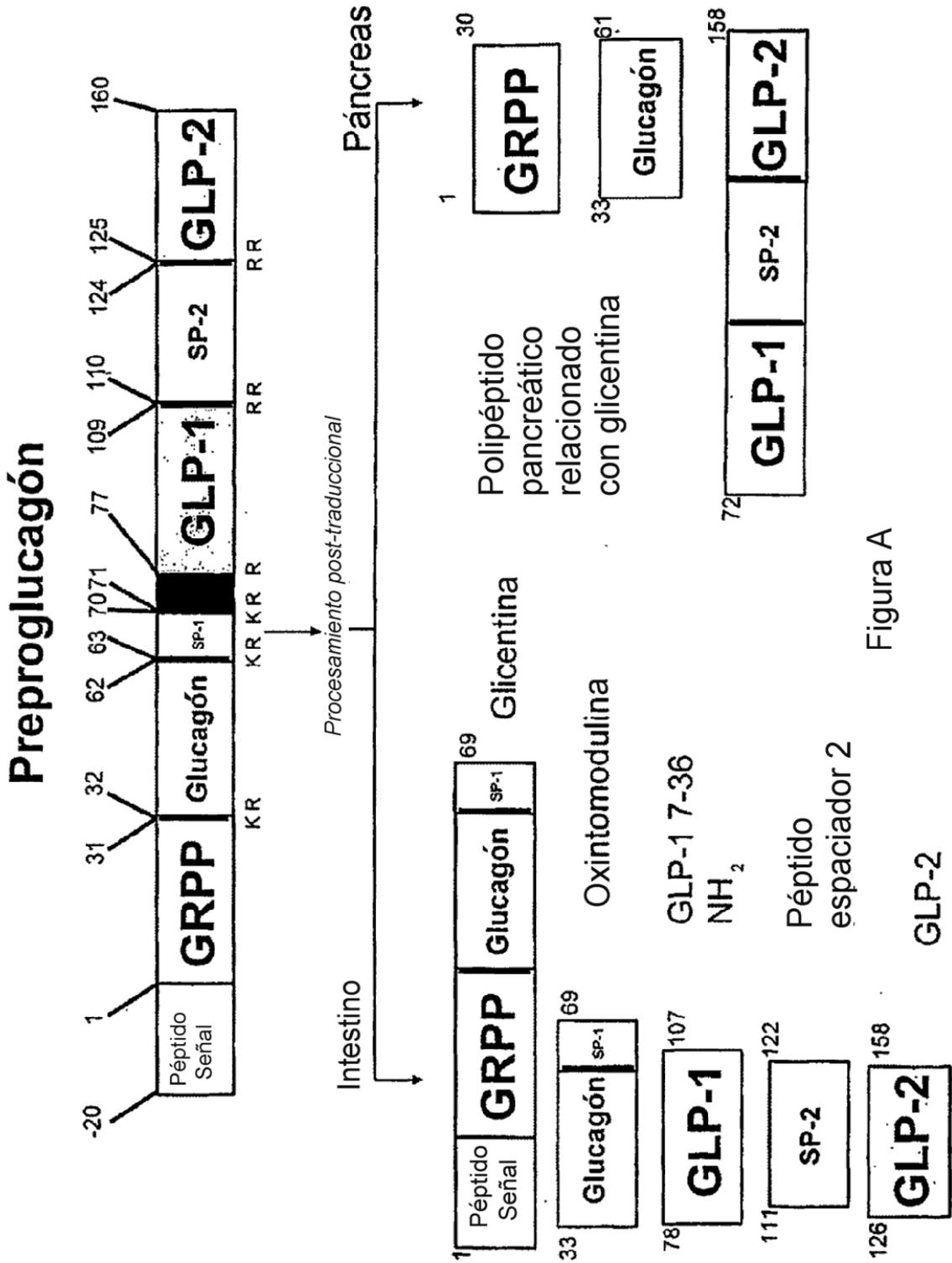


Figura A

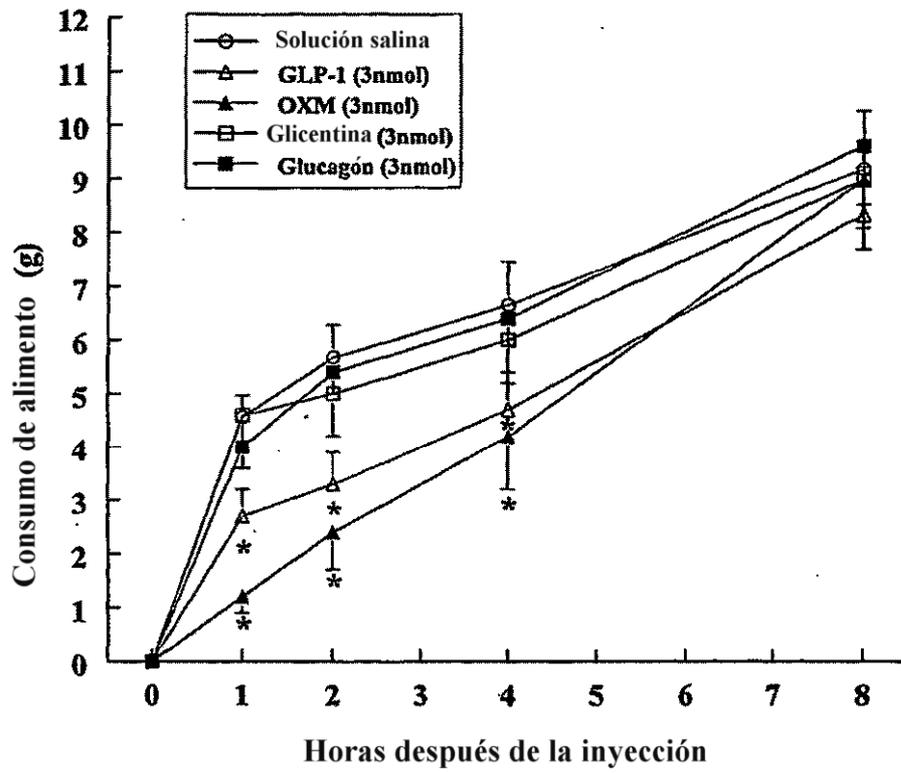


Figura 1A

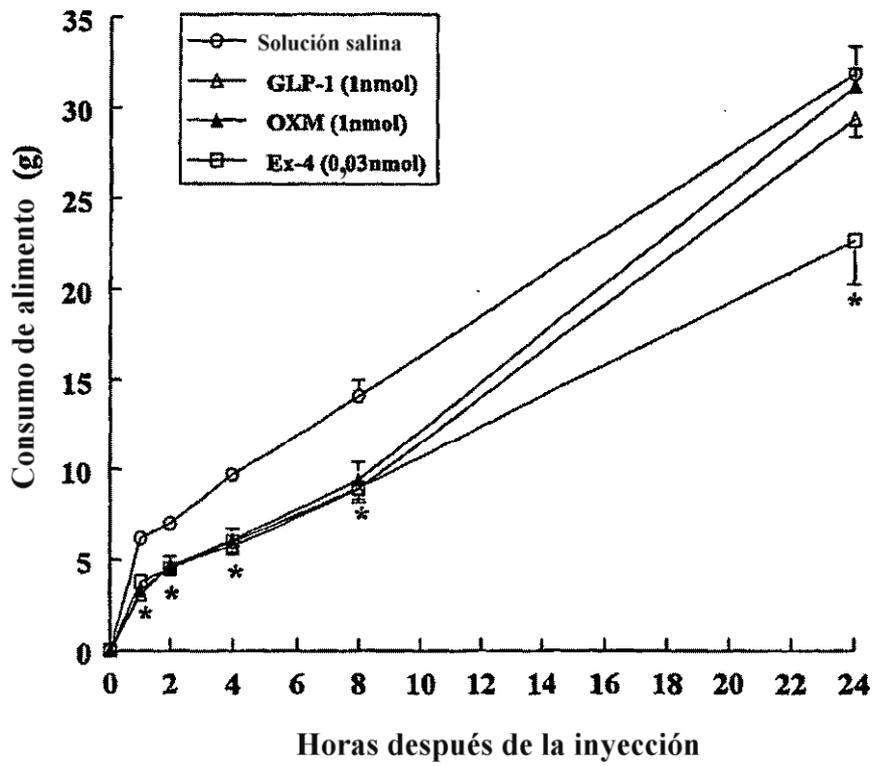


Figura 1B

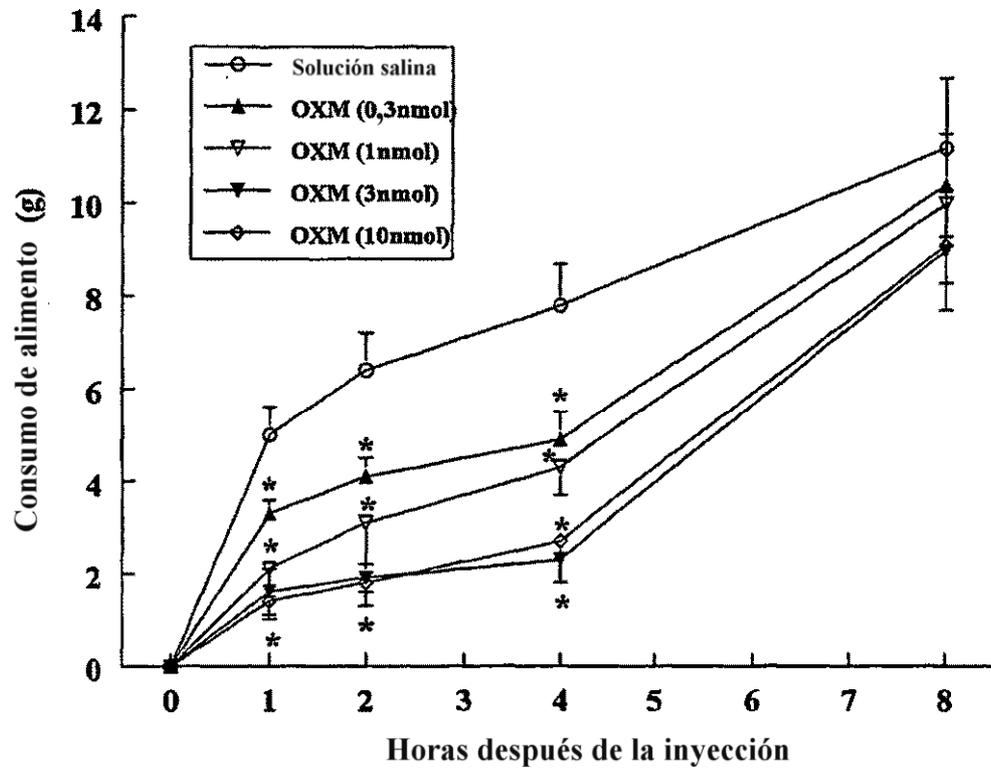


Figura 2A

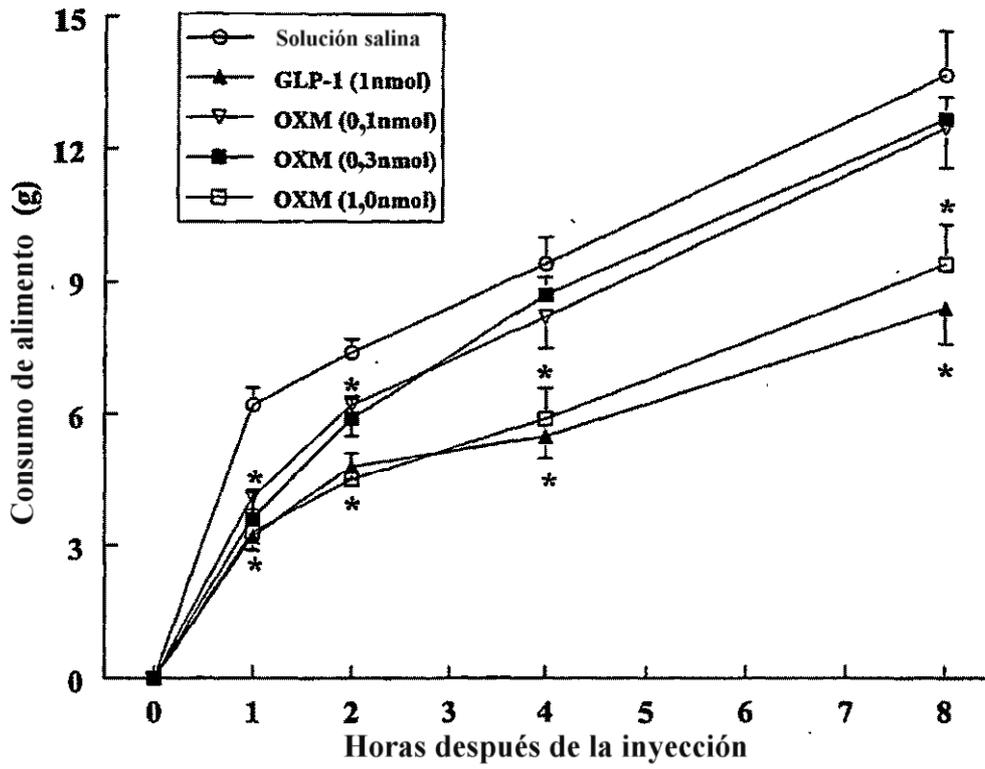


Figura 2B

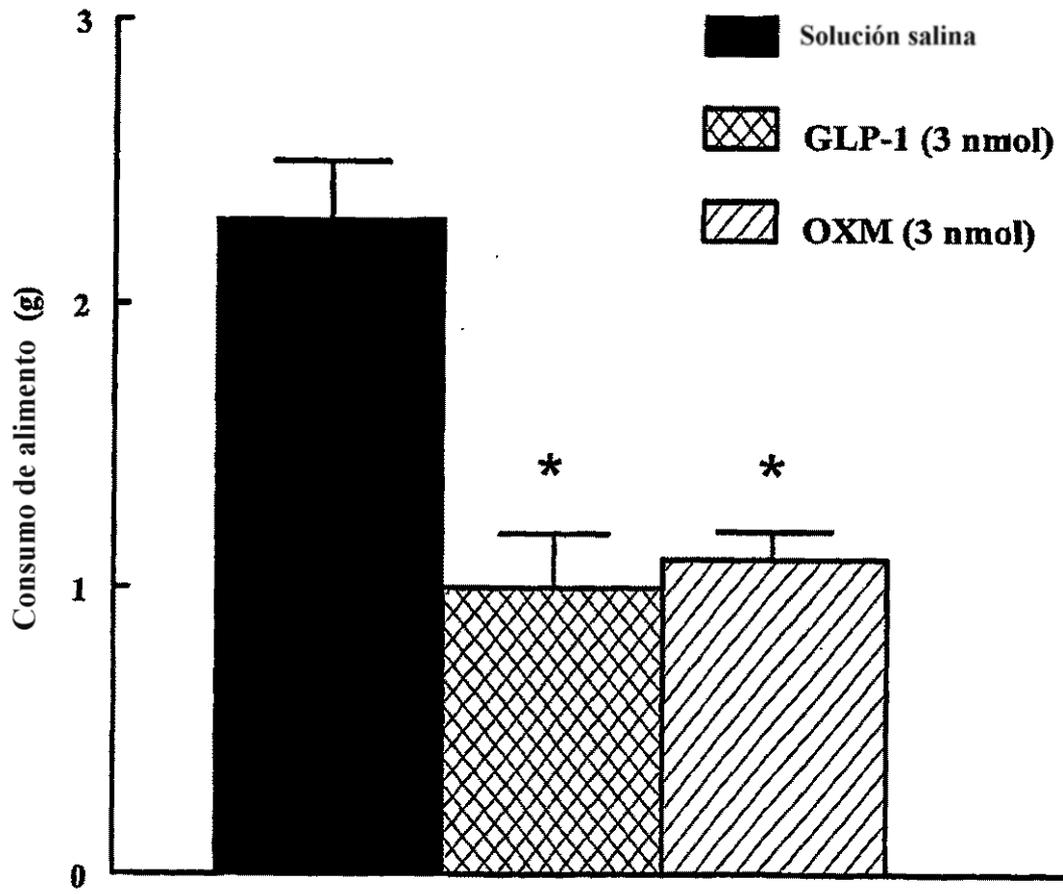


Figura 3A

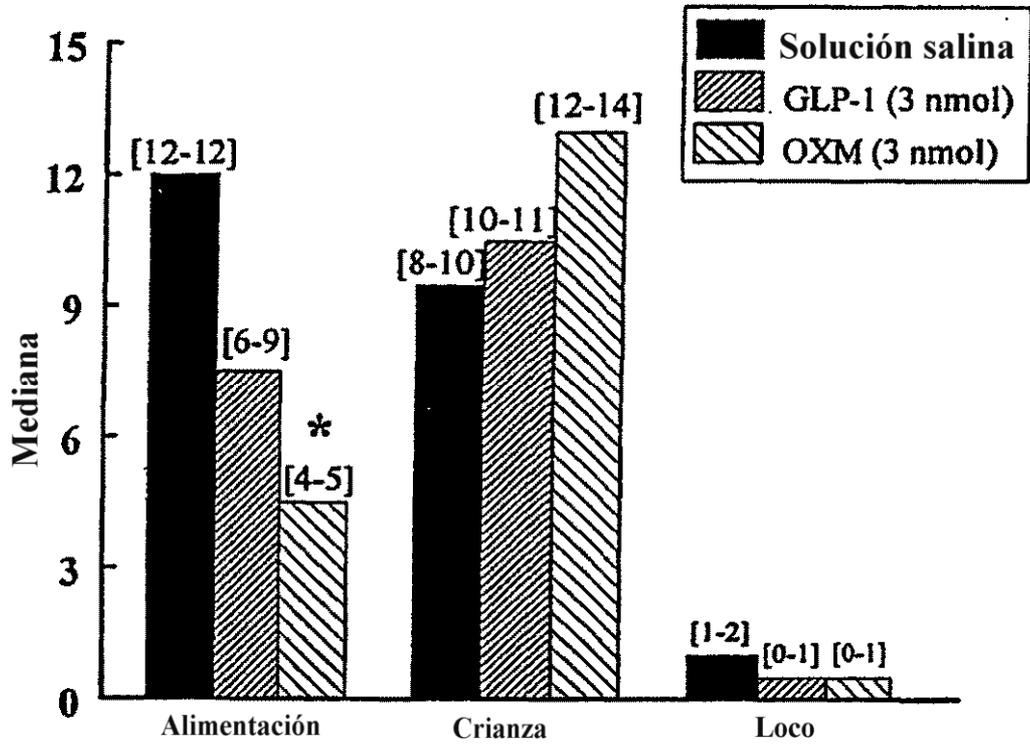


Figura 3B

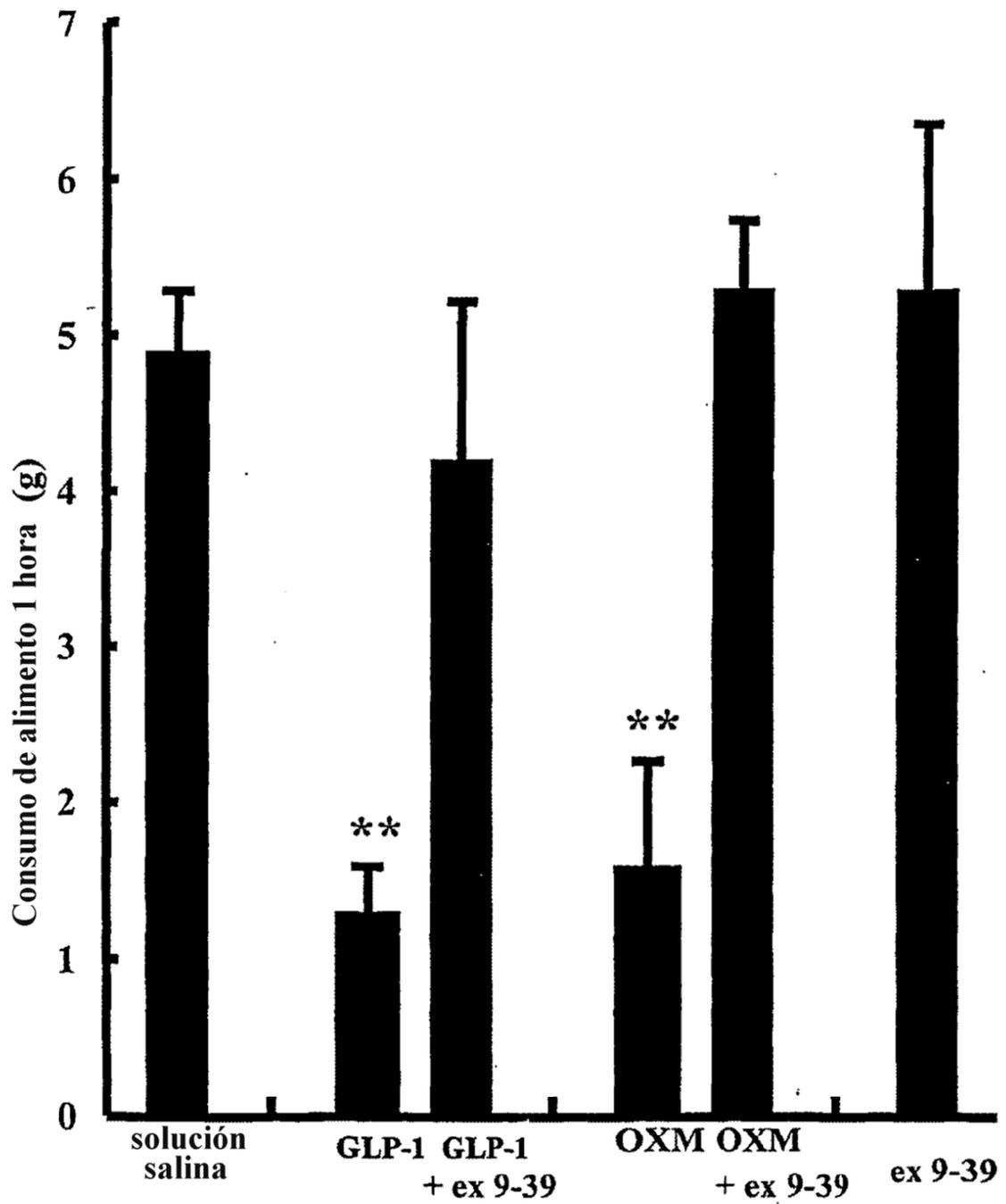


Figura 4A

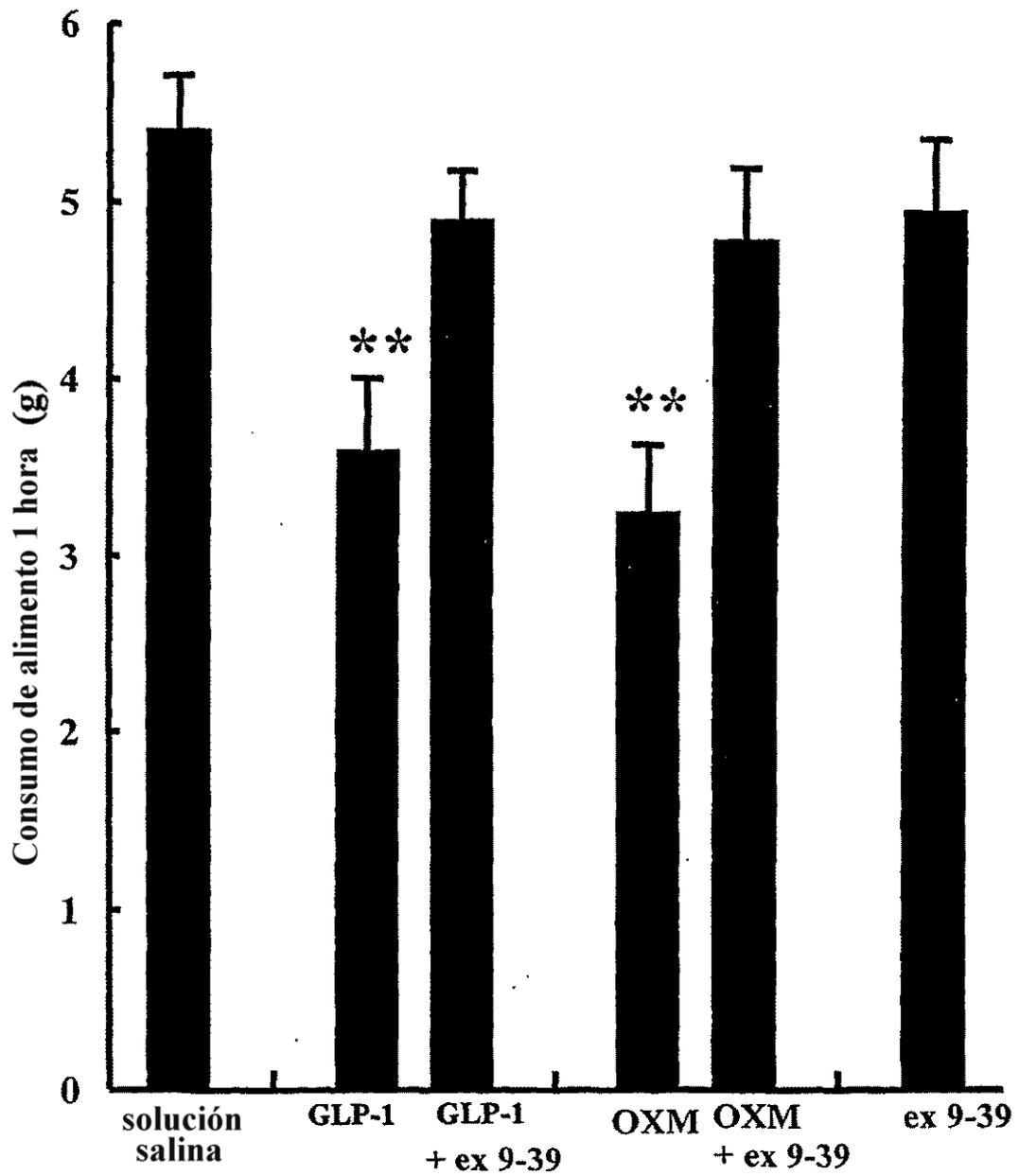


Figura 4B

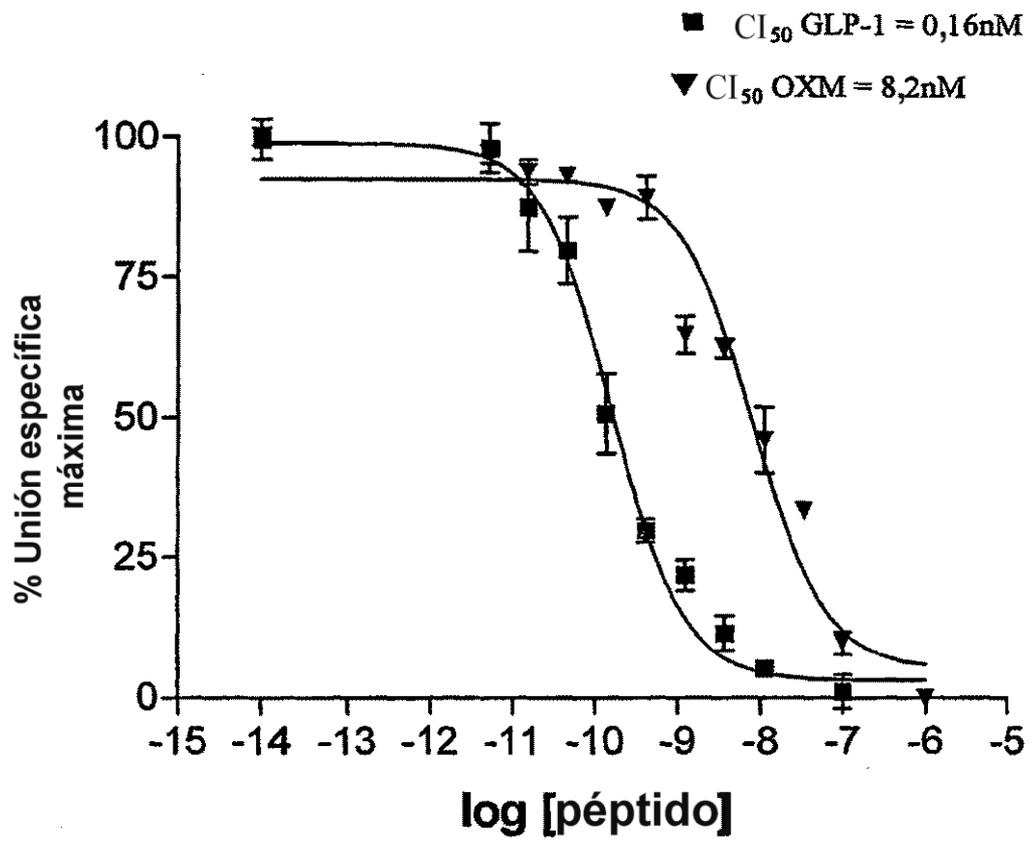


Figura 5

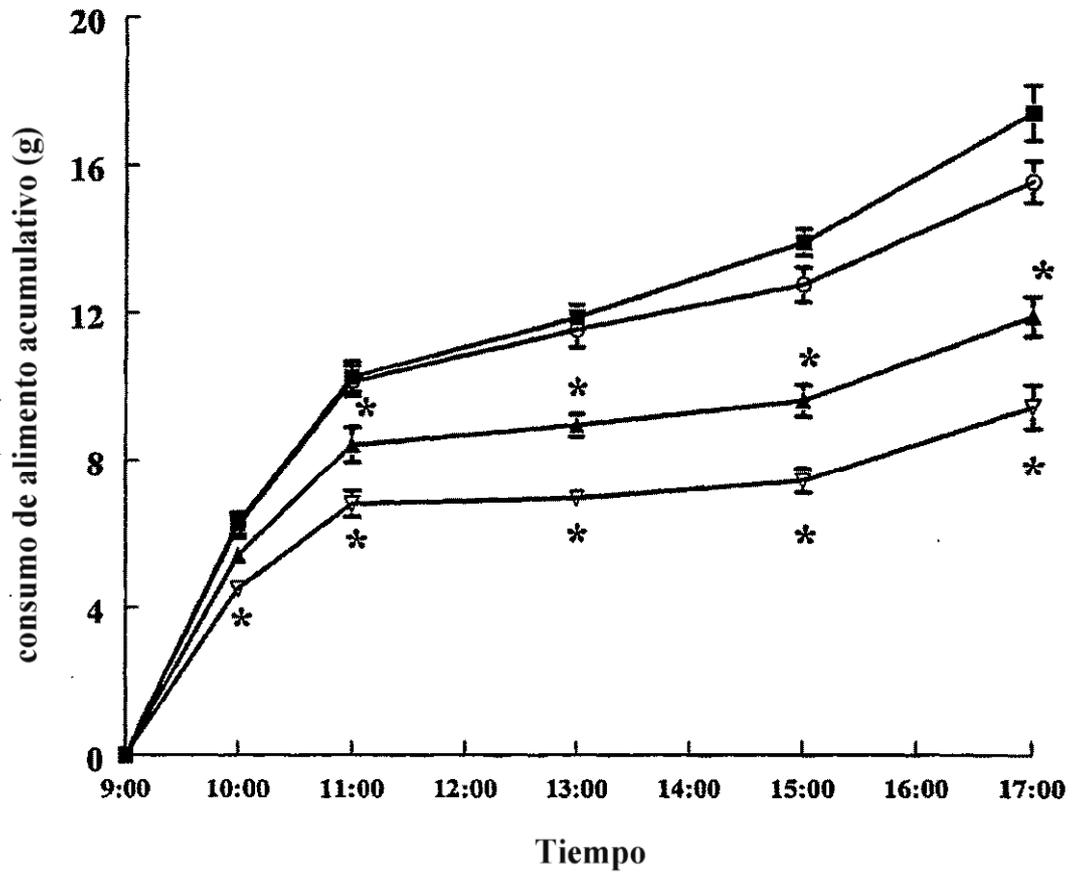


Figura 6a

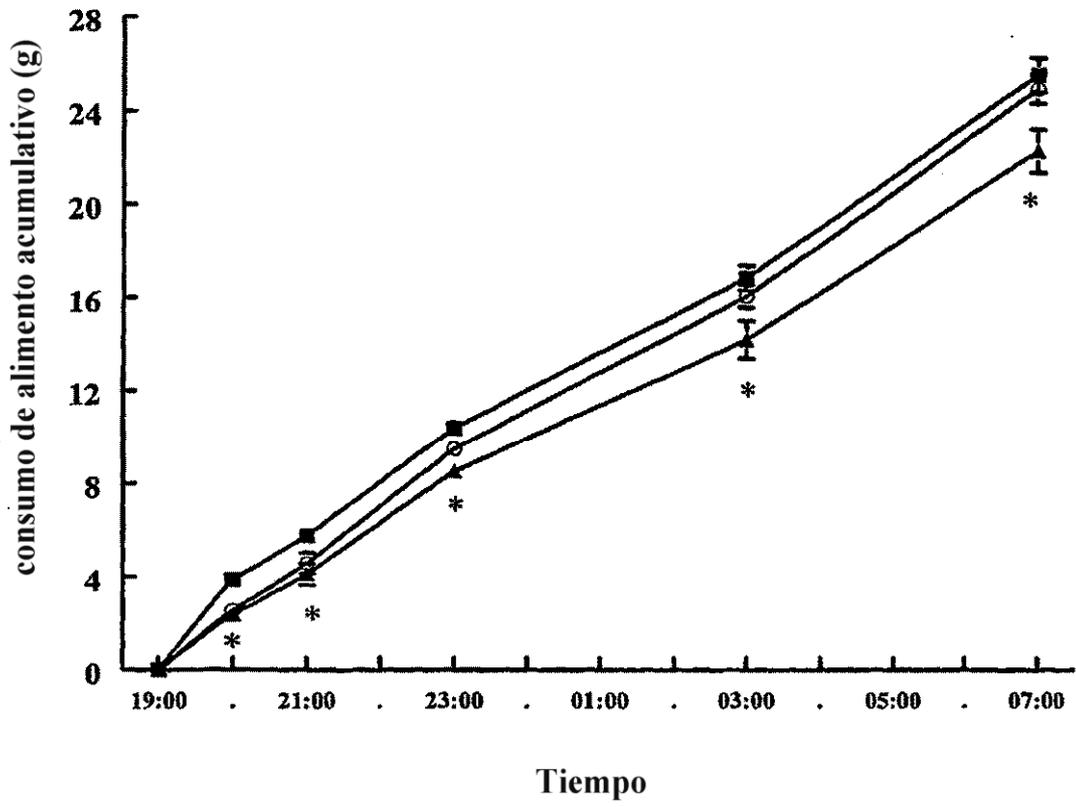


Figura 6b

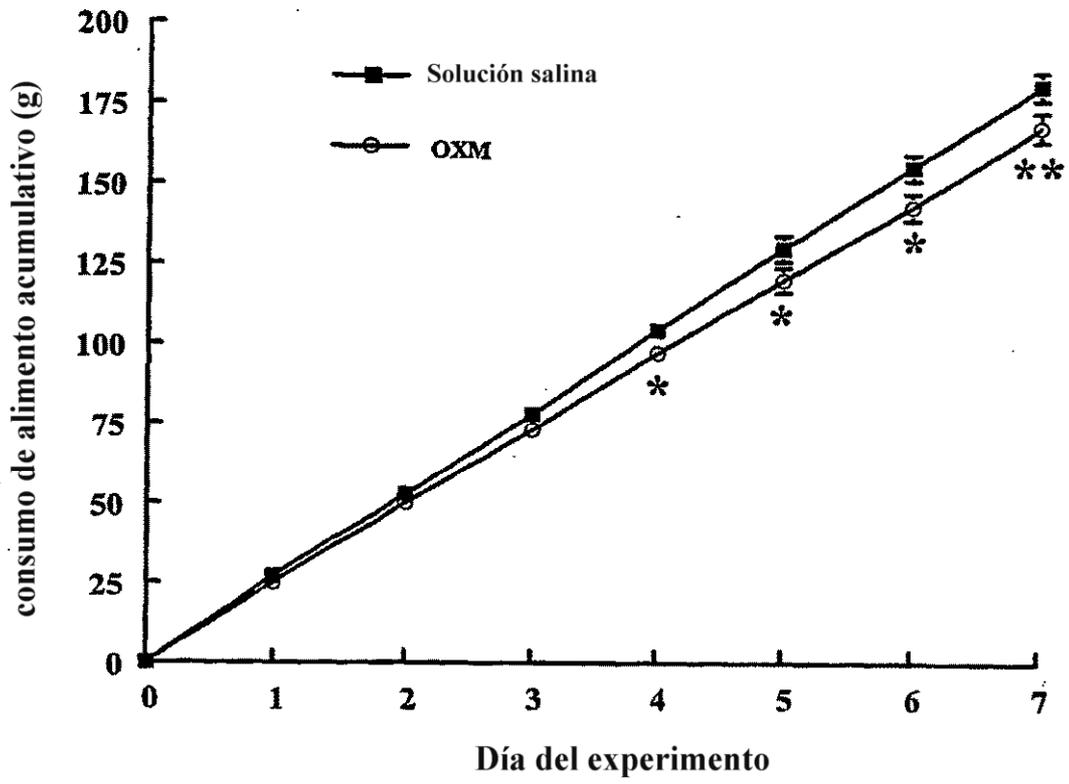


Figura 7a

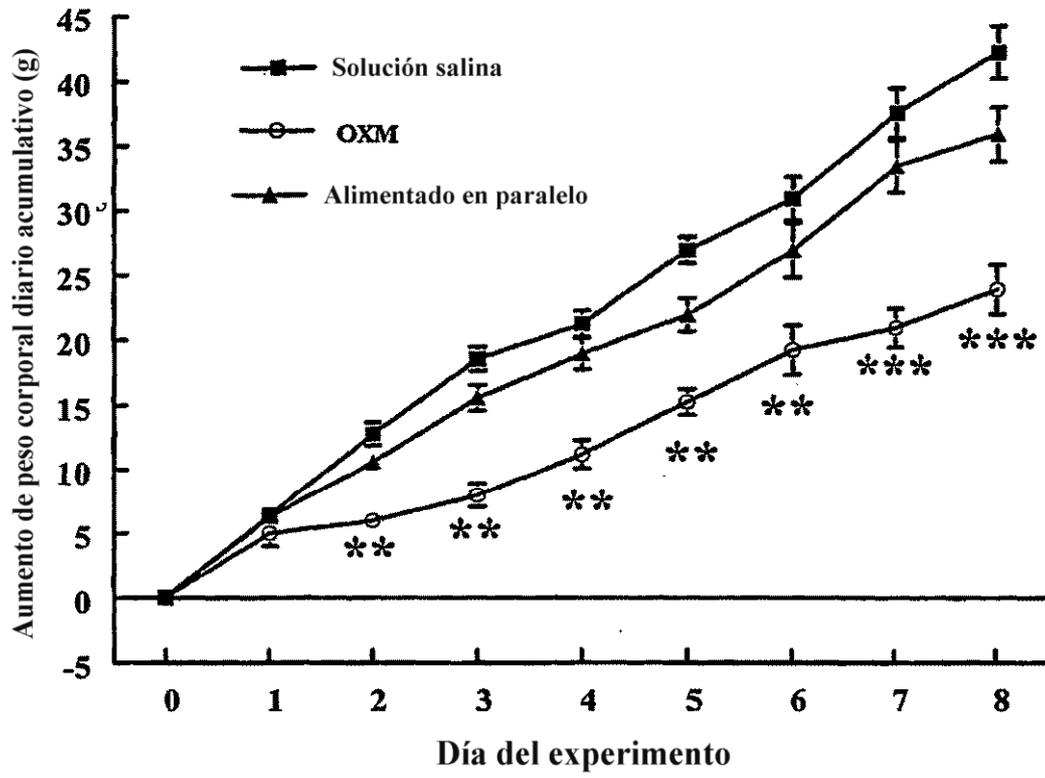


Figura 7b

Figura 8

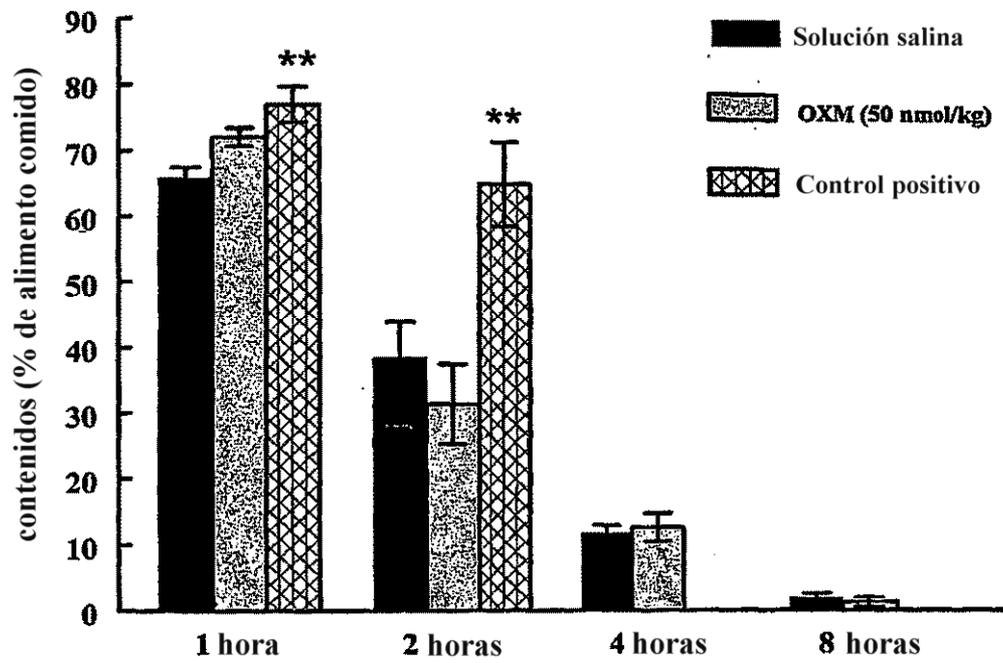


Figura 8

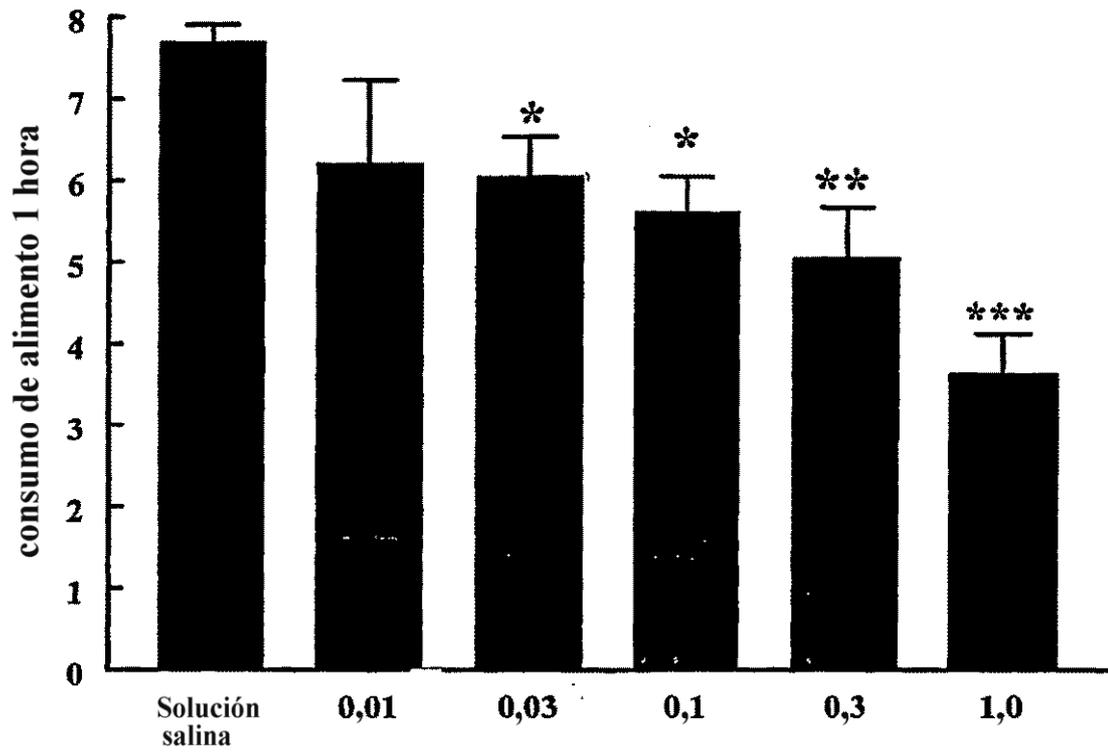


Figura 9

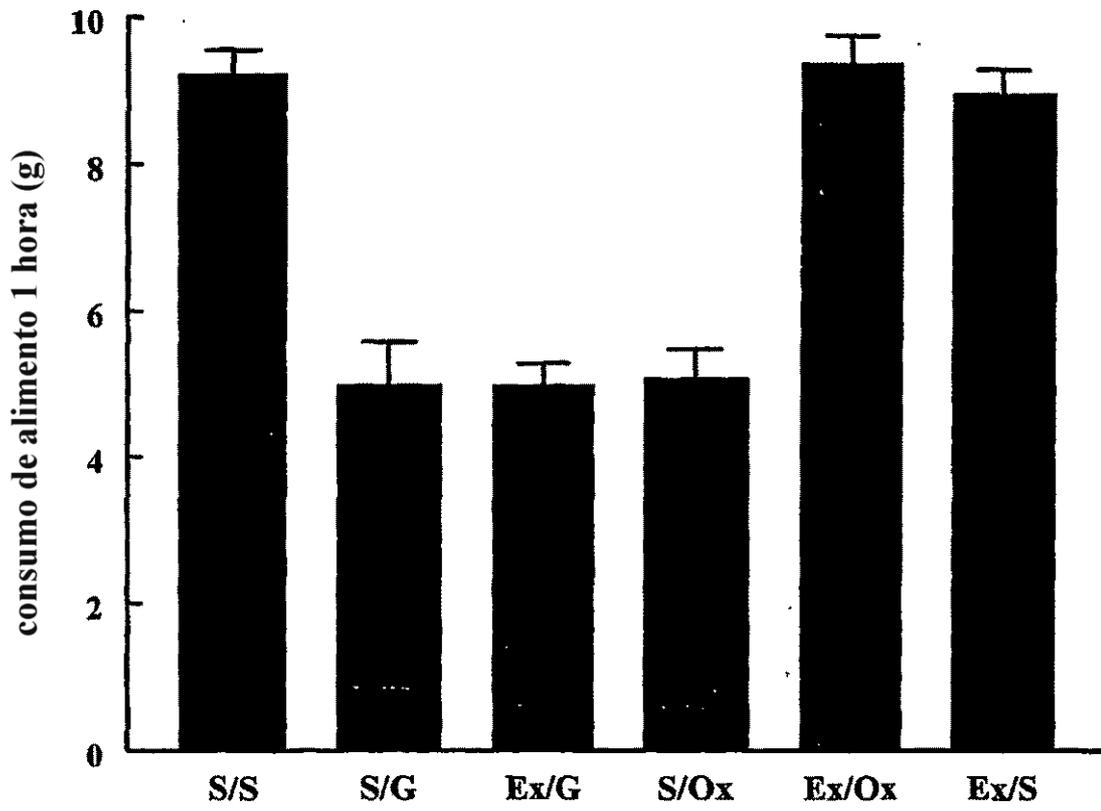
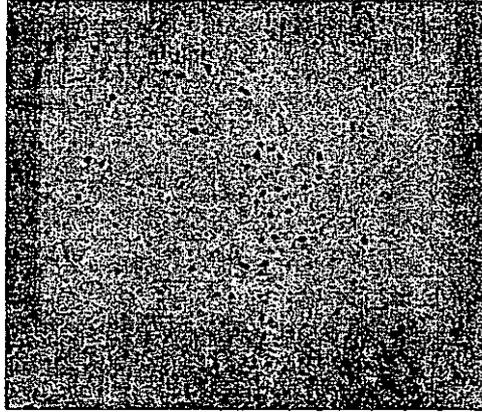
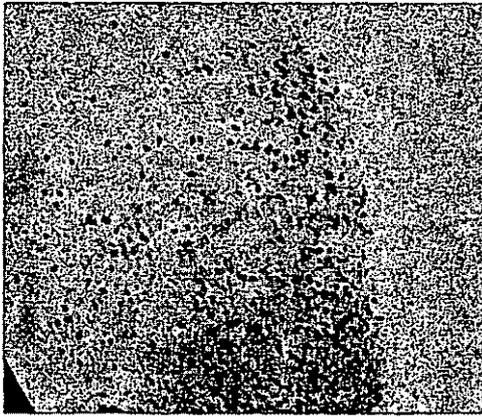


Figura 10

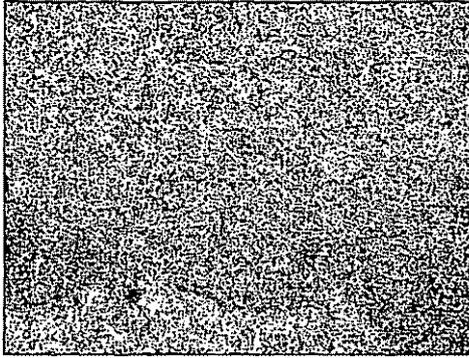


**A**

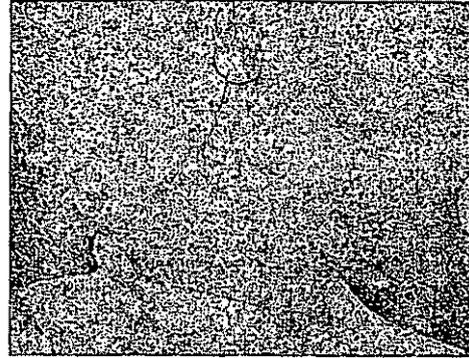


**B**

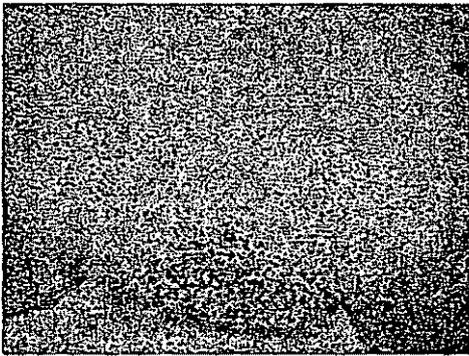
**Figura 11a**



**A)**



**B)**



**C)**

**Figura 11b**

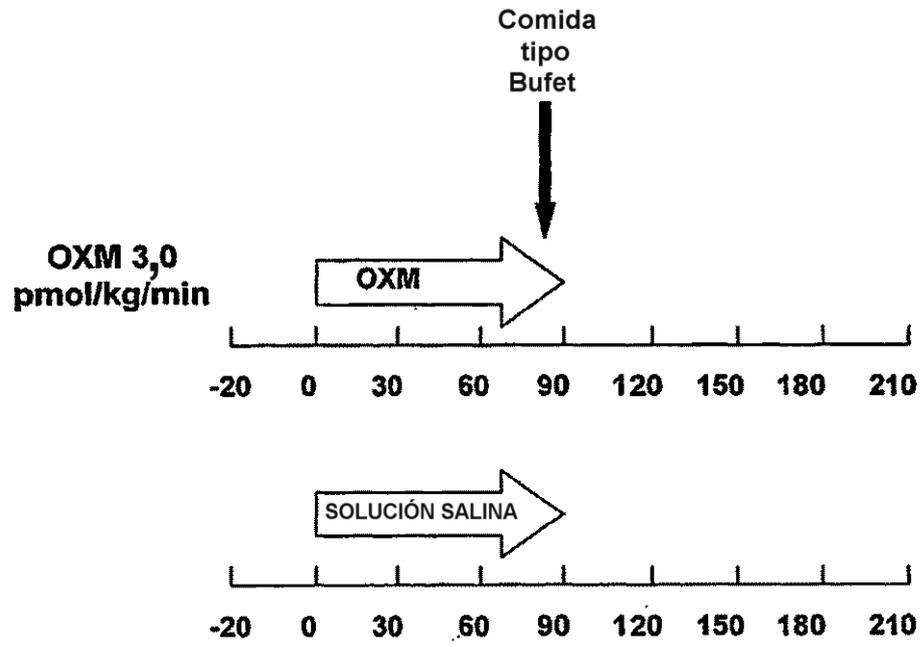


Figura 12

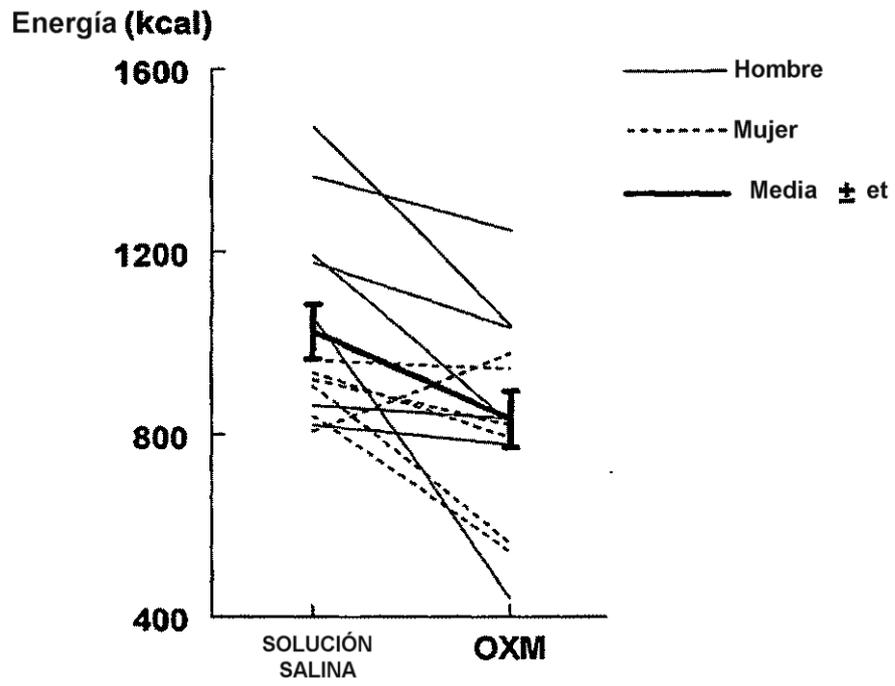


Figura 13

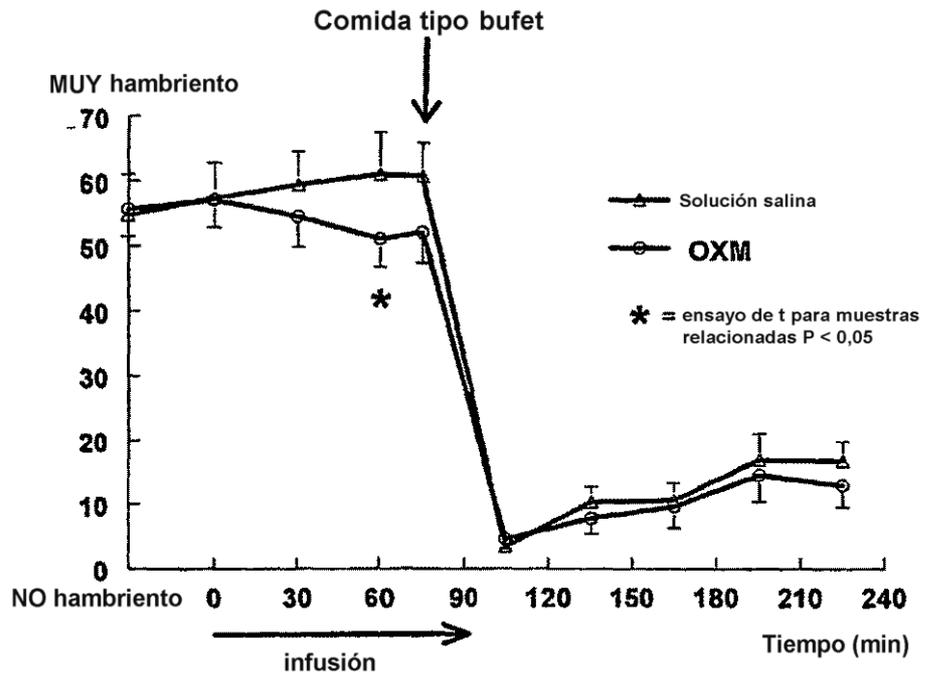


Figura 14

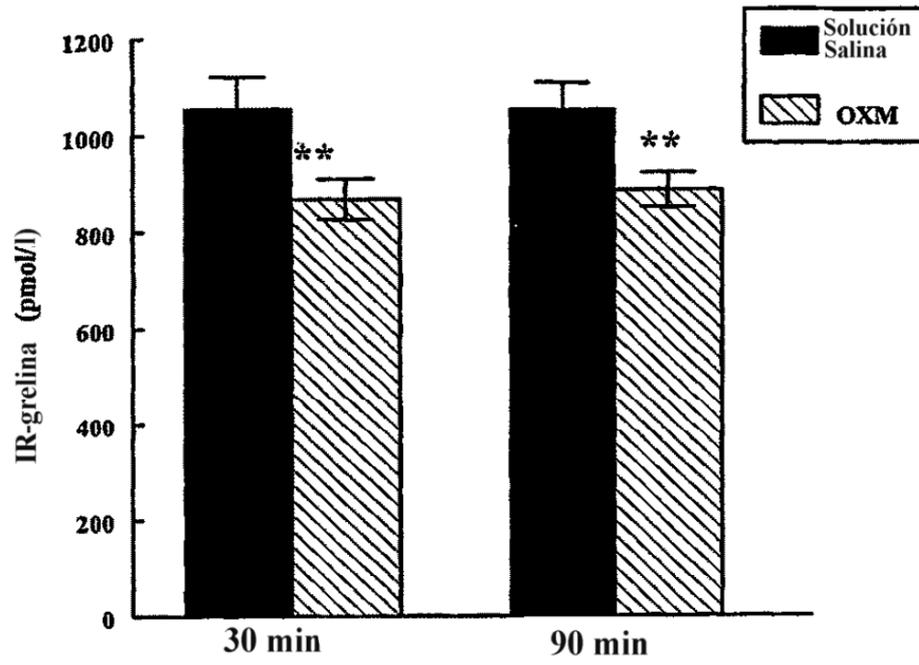


Figura 15

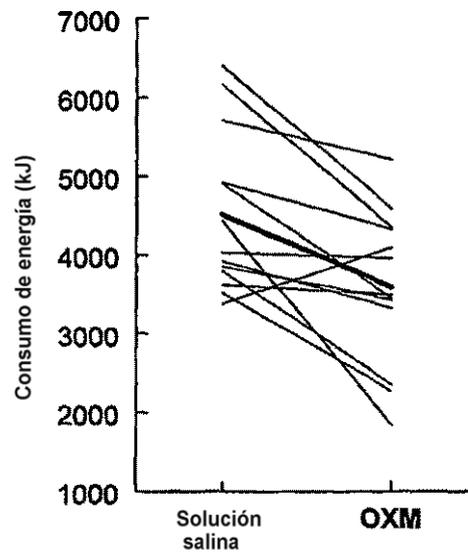


Figura 16

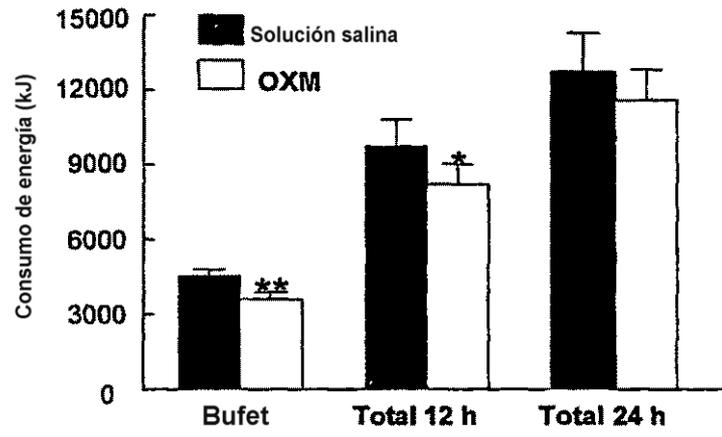


Figura 17

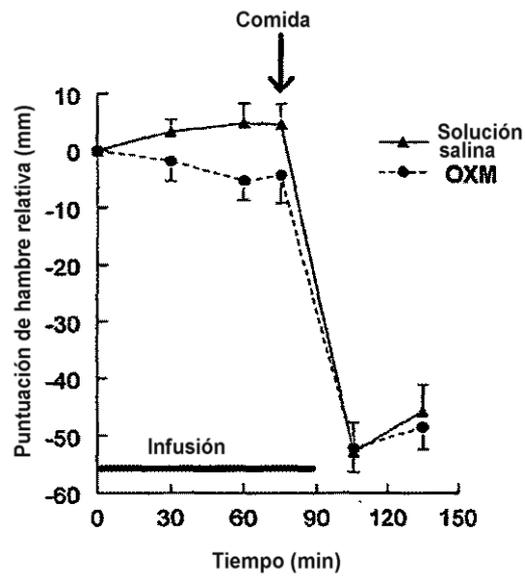


Figura 18

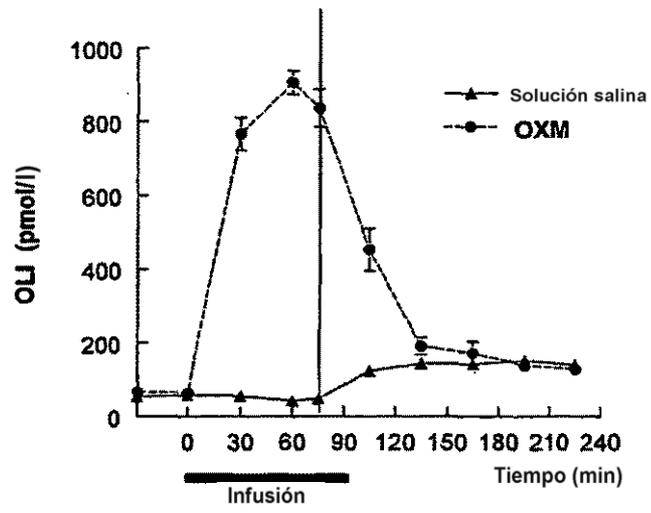


Figura 19

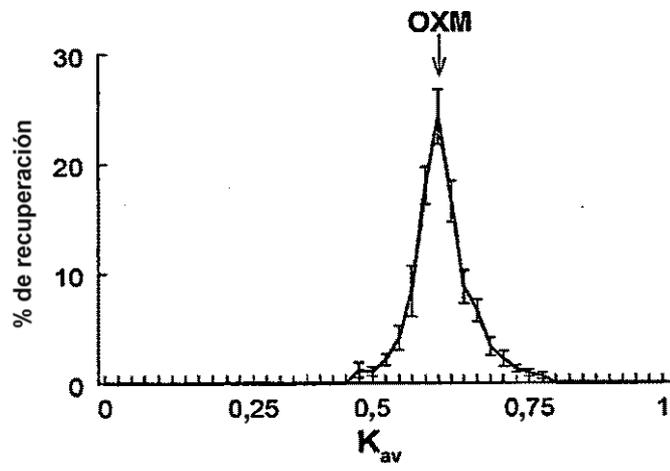


Figura 20

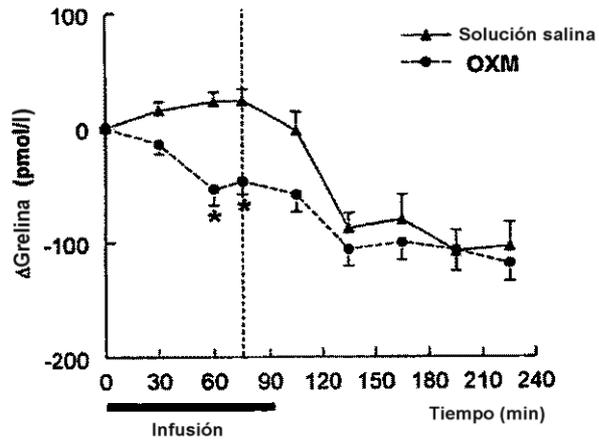


Figura 21