

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 303**

51 Int. Cl.:
A61K 31/58 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06015512 .4**
96 Fecha de presentación: **06.05.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1776955**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54 Título: **Uso médico y composición para el tratamiento de trastornos del metabolismo de lípidos y de glucosa**

30 Prioridad:
07.05.1996 US 17377 P
06.06.1996 US 19336 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.12.2012

73 Titular/es:
VEROSCIENCE LLC (100.0%)
1334 MAIN ROAD
TIVERTON RI 02878, US

72 Inventor/es:
CINCOTTA, ANTHONY H.

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 393 303 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

Uso Médico y Composición para el Tratamiento de Trastornos del Metabolismo de Lípidos y de Glucosa

- 5 Esta invención se refiere a tratamientos mejorados novedosos para la modificación o regulación en un sujeto (animal vertebrado o ser humano) de al menos uno del metabolismo de lípidos y de glucosa.

Antecedentes de la Invención

- 10 Obesidad y Trastornos en el Metabolismo de Lípidos – Pérdida de Grasa Corporal

En seres humanos la obesidad se define como un peso corporal que excede 20% del peso corporal deseable para individuos del mismo sexo, altura y constitución (Salans, L.B., en *Endocrinology & Metabolism*, 2d Ed., McGraw-Hill, Nueva York 1987, págs. 1203-1244; véase también, R.H. Williams, *Textbook of Endocrinology*, 1974, págs. 904-916). En otros animales (o también en seres humanos) la obesidad se puede determinar por medio de patrones de peso corporal correlacionados con perfiles de prolactina dado que los miembros de una especie que son jóvenes, delgados y "sanos" (es decir, libres de cualquier trastorno, no solo trastornos metabólicos) tienen perfiles del nivel de prolactina en plasma diarios que siguen un patrón característico de la especie. Este patrón es altamente reproducible con una pequeña desviación típica. Los miembros de una especie que padecen trastornos de al menos uno del metabolismo de lípidos, no obstante, tienen perfiles de prolactina aberrantes que se apartan del patrón normal (o de los de sujetos sanos) en al menos 1 ETM en al menos dos momentos puntuales separados o en al menos 2 ETM (error típico de la media) en al menos un momento puntual.

La obesidad, o el exceso de depósitos de grasa, se correlaciona con y puede desencadenar el comienzo de diversos trastornos del metabolismo de lípidos y/o de glucosa, p. ej. hipertensión, diabetes de Tipo II, aterosclerosis, etc.

Incluso en ausencia de obesidad clínica (de acuerdo con la definición anterior) la reducción de almacenes de grasa corporal (notablemente almacenes de grasa visceral) en el hombre, especialmente a largo plazo o de manera permanente, tendría una ventaja significativa, tanto cosméticamente como fisiológicamente.

La reducción de los almacenes de grasa corporal en animales domésticos (así como en mascotas) especialmente a largo plazo o de manera permanente también tendría obviamente un considerable beneficio económico para el hombre, concretamente puesto que los animales de granja suministran la porción principal de la dieta humana; y la grasa animal puede terminar como depósitos de grasa *de novo* en el hombre.

Si bien la dieta controlada y el ejercicio pueden producir resultados modestos en la reducción de los depósitos de grasa corporal, antes del trabajo acumulativo de los autores de la presente invención (incluyendo las solicitudes de patente co-pendientes anteriores y las patentes de los Estados Unidos expedidas), no se ha encontrado un tratamiento eficaz o práctico para controlar la obesidad u otros trastornos del metabolismo de lípidos.

La hiperlipoproteinemia es una afección en la cual la concentración de una o más lipoproteínas que portan colesterol o triglicéridos (tales como los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL y las lipoproteínas de baja densidad o LDL) en el plasma excede un límite normal. Este límite superior se define generalmente como el percentil nonagésimo quinto de una población al azar. Los niveles elevados de estas sustancias también se han correlacionado positivamente con la aterosclerosis y el a menudo infarto cardíaco resultante, o "ataque al corazón", que representa aproximadamente la mitad de las muertes en los Estados Unidos. Se ha presentado una fuerte evidencia clínica que correlaciona una reducción en la concentración en plasma de lipoproteína con una reducción del riesgo de aterosclerosis (Noma, A., et al., *Atherosclerosis* 49:1, 1983; Illingworth, D. y Conner, W., en *Endocrinology & Metabolism*, McGraw-Hill, Nueva York 1987). De este modo, se ha dedicado una cantidad significativa de investigación a descubrir métodos de tratamiento que reduzcan los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma. Las LDL y/o VLDL elevadas acompañadas por elevados niveles de triglicéridos en sangre constituyen los factores de riesgo más importantes para la aterosclerosis. La reducción de uno o de ambos de lipoproteínas y triglicéridos en la sangre reduciría el riesgo de aterosclerosis y detendría o retardaría su desarrollo.

Otro subgrupo de lipoproteínas del plasma que se encuentra en los vertebrados son las lipoproteínas de alta densidad, o HDL. Las HDL sirven para eliminar el colesterol libre del plasma. Una elevada concentración de HDL como porcentaje del colesterol total en plasma se ha asociado con una reducción del riesgo de aterosclerosis y enfermedades cardíacas. De este modo las HDL se conocen en la prensa no especializada como "colesterol bueno". Por lo tanto, las estrategias terapéuticas implican intentos tanto para reducir el contenido de LDL y VLDL en plasma (esto es, reducir el colesterol total en plasma), como para incrementar la fracción HDL del colesterol en plasma total. Diversas líneas de investigación indican que simplemente incrementar las HDL resulta beneficioso incluso en ausencia de reducción de LDL o VLDL: Bell, G.P. et al., *Atherosclerosis* 36:47-54, 1980; Fears, R., *Biochem. Pharmacol.* 33:219-228, 1984; Thompson, G., *Br. Heart J.* 51:585-588, 1989; Blackburn, H. *N.E.J.M.* 309:426-428, 1983.

Las terapias actuales para las hiperlipoproteinemias incluyen una dieta con bajo contenido en grasa y la eliminación de factores agravantes tales como el estilo de vida sedentario. Si la hiperlipoproteinemia es secundaria (esto es, inherente a, p. ej. una deficiencia de lipoproteína lipasa o receptor de LDL, diversas patologías endocrinas, alcoholismo, trastornos renales, trastornos hepáticos) el control de la enfermedad subyacente también es fundamental para el tratamiento. Las hiperlipoproteinemias también se tratan con fármacos, que normalmente alteran los niveles de componentes concretos del colesterol en plasma total, así como también reducen el componente de lípidos en plasma totales. Entre los fármacos más recientemente introducidos para tratar la hiperlipoproteinemia se encuentra la lovastatina (MEVACOR[®]) que inhibe selectivamente una enzima implicada en la producción de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Este fármaco reduce específicamente el colesterol total y puede causar un modesto incremento (5-10%) en las concentraciones de HDL. Sin embargo, las ventajas de estas terapias varían de sujeto a sujeto.

Por otra parte, el uso del inhibidor de la enzima HMG-CoA viene acompañado a veces por efectos secundarios tales como toxicidad hepática, mioglobinuria renal, fallo renal, y opacidad lenticular. El riesgo de tales efectos secundarios necesita un estrecho seguimiento de los pacientes (p. ej., la función del hígado se somete a ensayo mensualmente).

Otro fármaco prescrito contra la hiperlipoproteinemia es el clofibrato. La eficacia del clofibrato también varía de sujeto a sujeto y su uso está acompañado a menudo por efectos secundarios tales como síndromes nefróticos, mialgia, náuseas y dolor abdominal.

Diabetes y Trastornos del Metabolismo de la Glucosa

La diabetes, una de las más insidiosas de las enfermedades importantes, puede comenzar repentinamente o permanecer sin diagnosticar durante años mientras ataca los vasos sanguíneos y los nervios. Los diabéticos como grupo están aquejados más a menudo de ceguera, enfermedades cardíacas, apoplejía, enfermedades del riñón, pérdida de audición, gangrena e impotencia. Un tercio de todas las visitas a los médicos están ocasionadas por esta enfermedad y sus complicaciones, y la diabetes y sus complicaciones son una causa principal de muerte prematura en los Estados Unidos y en el mundo Oriental.

La diabetes afecta adversamente al modo en el que el organismo utiliza los azúcares y los almidones que, durante la digestión, se convierten en glucosa. La insulina, una hormona producida por el páncreas, pone la glucosa a disposición de las células del organismo para producir energía. En el músculo, los tejidos adiposo (graso) y conectivo, la insulina facilita la entrada de glucosa en las células mediante una acción sobre las membranas celulares. La glucosa ingerida se convierte normalmente en el hígado en CO₂ y H₂O (50%); en glucógeno (5%); y en grasa (30-40%), siendo esta última almacenada en depósitos de grasa. Los ácidos grasos de los tejidos adiposos circulan, vuelven al hígado para la re-síntesis de triacilglicerol y se metabolizan en cuerpos cetónicos para su utilización por los tejidos. Los ácidos grasos también son metabolizados por otros órganos. La formación de grasa es la ruta principal para la utilización de carbohidratos.

El efecto neto de la insulina es promover el almacenamiento y el uso de carbohidratos, proteínas y grasa. La deficiencia de insulina es una afección patológica común y grave en el hombre. En la diabetes insulino dependiente (DMID o de Tipo I) el páncreas produce poca o ninguna Insulina, y se debe inyectar insulina diariamente para la supervivencia del diabético. En la diabetes no insulino dependiente (DMNID o de Tipo II) el páncreas conserva la capacidad para producir insulina y de hecho puede producir cantidades de insulina mayores de lo normal, pero la cantidad de insulina es relativamente insuficiente, o menos que totalmente eficaz, debido a la resistencia celular a la insulina.

En cualquier forma de diabetes existen anomalías generalizadas. En la mayor parte de los sujetos con DMNID, los defectos fundamentales para los cuales se pueden rastrear las anomalías son (1) una entrada reducida de glucosa en diferentes tejidos "periféricos" y (2) un incremento de la liberación de glucosa en la circulación desde el hígado. Existe por consiguiente un exceso de glucosa extracelular y una deficiencia de glucosa intracelular. También hay una disminución en la entrada de aminoácidos en el músculo y un incremento en la lipólisis. La hiperlipoproteinemia también es una complicación de la diabetes. El efecto acumulativo de estas anomalías asociadas con la diabetes es un grave daño de los vasos sanguíneos y de los nervios.

Aparte de la presente invención y del trabajo previo de los autores de la presente invención (comentado más abajo), no se ha encontrado ningún tratamiento eficaz para controlar tanto la hiperinsulinemia como la resistencia a la insulina. La hiperinsulinemia es un nivel de insulina superior al normal en la sangre. La resistencia a la insulina se puede definir como un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica inferior a la normal. En los pacientes con diabetes tratados con insulina, se considera que la resistencia a la insulina está presente siempre que la dosis terapéutica de insulina exceda la tasa secretora de insulina en personas normales. La resistencia a la insulina también está asociada con niveles de insulina superiores al normal esto es, hiperinsulinemia – cuando se encuentran presentes niveles normales o elevados de glucosa en sangre.

Trabajo Previo en Este Campo

Los estudios de los autores de la presente invención y otros han indicado que el ciclo anual natural del nivel de almacenamiento de grasa, omnipresente entre los vertebrados en la naturaleza, refleja las actividades de un metabolostato central ajustable que está formado por componentes neurales hipotalámicos circadianos. Los cambios en las relaciones de fase de las actividades circadianas dopaminérgica y serotoninérgica inducen cambios estacionales en el metabolismo, y estas actividades circadianas se pueden ajustar por medio de tratamientos apropiadamente sincronizados con hormonas o medicamentos que afectan a los neurotransmisores. A este respecto, se ha demostrado que la bromocriptina, un agonista simpatolítico D2 de dopamina con actividades agonística $\alpha 2$ y antagonista $\alpha 1$, así como actividades inhibitoras de serotonina, reduce los niveles de almacenamiento de grasa en el cuerpo en una serie de animales, incluyendo los seres humanos, sin reducir el consumo de alimentos y también reduce la hiperinsulinemia, la hiperlipidemia y la intolerancia a la glucosa.

Los autores de la presente invención y sus colaboradores han descubierto anteriormente que la administración de uno o ambos de (i) ciertos agonistas de dopamina (D2) reductores de prolactina tales como bromocriptina y (ii) sustancias que incrementan la prolactina tales como los antagonistas de dopamina, tales como metoclopramida; y los agonistas y precursores de serotonina, tales como 5-hidroxitriptófano, reducen los almacenamientos de grasa corporal, la obesidad, los triglicéridos del plasma y el colesterol, así como la hiperglicemia, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina: Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.659.715; 4.749.709; 4.783.469; 5.006.526.

Es preferible administrar las sustancias reductoras de prolactina en un primer momento predeterminado para producir una disminución de los niveles de prolactina circulante en el sujeto a tratar durante un intervalo dentro del ciclo o ritmo diario de prolactina del sujeto, cuando los niveles de prolactina circulante (sangre) son bajos en individuos jóvenes, sanos de la misma especie, provocando de esta manera que el ritmo de prolactina del individuo tratado se aproxime o se adapte al patrón o ritmo de prolactina en individuos sanos. Es preferible también administrar las sustancias que incrementan la prolactina en un segundo momento predeterminado para provocar un incremento en los niveles de prolactina circulante del individuo a tratar durante un intervalo dentro del ciclo o ritmo diario de prolactina del individuo, cuando los niveles de prolactina circulante (sangre) son elevados en individuos sanos, jóvenes de la misma especie, provocando por lo tanto que el ritmo de prolactina en el individuo tratado se aproxime, o se adapte, al patrón o ritmo de prolactina en individuos sanos. Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.468.755; 5.496.803; 5.344.832, Patente de los Estados Unidos 5.585.347 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 08/456.952 y Solicitudes PCT US93/12701 y US95/09061.

Es sabido también en la técnica que algunos de los efectos de la bromocriptina están estimulados por la dopamina endógena. (Ergot Compounds and Brain Functions Neuropsychiatric Aspects: Advances in Biochemical Psychopharmacology. M.Goldstein y otros, Eds. (Raven Press, Nueva York, 1980) vol. 23). De manera específica, se ha demostrado que las respuestas al comportamiento de estimulación locomotriz y estereotipo con respecto a la bromocriptina son bloqueadas por el agotamiento de dopamina endógena en roedores. No obstante, si se facilita a continuación un agonista D a animales con agotamiento de dopamina, la capacidad de respuesta a la bromocriptina se restablece. Jackson, D.M. y otros, Psychopharmacology 94:321 (1988). Se ha demostrado una interacción dopaminérgica D2:D1 similar en la inhibición dopaminérgica del comportamiento de alimentación. Si bien estos estudios confirman la importancia de una interacción D2:D1 en la activación de actividades dopaminérgicas, el incremento de la actividad locomotriz y la disminución de la respuesta de alimentación a agonistas D2:D1 es aguda y de corta duración, durando solamente unas pocas horas. (Cooper, S.J. et al., en D1:D2 Dopamine Receptor Interactions, J. Waddington, Ed. (Academic Press Londres, 1993) páginas 203-234).

El trabajo anterior por terceros con agonistas D1 y D2 de dopamina combinados no ha demostrado efecto alguno sobre el metabolismo de lípidos y de glucosa, y no ha producido respuestas a largo plazo de actividades dopaminérgicas. De manera significativa, los autores de la presente invención han descubierto que la administración conjunta de un agonista D1 y un agonista D2 de dopamina (o como mínimo uno de: antagonista adrenérgico $\alpha 1$, agonista adrenérgico $\alpha 2$ e inhibidor serotoninérgico) da como resultado una mejora inesperada y sorprendente en uno o varios de los índices metabólicos relacionados con el metabolismo de lípidos y de glucosa cuando se comparan con las mejoras (si existen) facilitadas por la administración de un agonista D2 de dopamina tal como bromocriptina administrada sola.

Objetos de la Invención

Uno de los objetos de la presente invención consiste en proporcionar tratamientos mejorados para reducir en individuos vertebrados (incluyendo seres humanos) que necesiten dicho tratamiento, como mínimo uno de: consumo de alimentos, peso corporal, grasa corporal, plasma o glucosa en sangre e insulina en sangre.

Asimismo se describen en la presente memoria métodos para reducir al menos uno de: resistencia a la insulina (tolerancia alterada a la glucosa), hiperinsulinemia e hiperglicemia, y hemoglobina glicosilada (incluyendo A1C), y reducir la diabetes de Tipo II.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir o retrasar o detener la aterosclerosis reduciendo al menos uno de: hiperlipoproteinemia y triglicéridos en sangre elevados.

5 Otro objeto de esta invención es proporcionar terapias para modificar y regular el metabolismo de lípidos y de glucosa de una manera beneficiosa para el sujeto.

Otro objeto más de la invención es proporcionar terapias para modificar y regular el metabolismo de lípidos y de glucosa para proporcionar tratamientos eficaces para la obesidad.

10 **Compendio de la Invención**

Se ha descubierto ahora que se puede lograr al menos uno de los siguientes objetos administrando a un sujeto que necesite dicho tratamiento un agonista D₁ de dopamina junto con un agonista D₂ de dopamina que es un alcaloide de ergot.

15 Preferiblemente, los agentes anteriores de los apartados (i), (ii) o (iii) de más arriba ("agentes conjuntos") se administran en un momento predeterminado, esto es, en una porción restringida de un período de 24 horas. Puesto que el agonista D₁ de dopamina amplifica el efecto de otro agente u otros agentes, el agonista D₁ también se administra preferiblemente aproximadamente al mismo tiempo.

20 La administración conjunta de un agonista D₁ de dopamina con el otro agente identificado más arriba da como resultado un aumento sustancial, y de hecho a menudo sinérgico, de los efectos en la mejora de uno o más índices metabólicos relacionados con el metabolismo de los lípidos o de la glucosa, y por lo tanto una modificación o regulación mejoradas de al menos uno de: el metabolismo de lípidos o el de la glucosa.

25 El agonista D₂ es preferiblemente un alcaloide de ergot, lo más preferiblemente bromocriptina.

Otro aspecto de la descripción está dirigido a la administración a dicho sujeto de:

- 30 1. (i) un agonista D₂; y
2. (ii) al menos un agente, distinto de un agonista D₂, seleccionado del grupo que consiste en antagonistas adrenérgicos α_1 , agonistas adrenérgicos α_2 e inhibidores serotoninérgicos.

35 Se ha descubierto que dicha administración conjunta logra una mejora mayor en uno o más de los índices metabólicos anteriores que la administración de un agonista D₂ por separado.

Breve Descripción de las Figuras

40 La Fig. 1 es un diagrama de barras que ilustra la pérdida de peso (barras negativas) o la ganancia de peso (barras positivas) obtenidas en el grupo experimental al que se administraron tanto bromocriptina (BC) como SKF 38393 (SKF) en comparación con animales a los que se administró SKF solo o BC solo o nada (controles negativos).

45 La Fig. 2 es un gráfico de toma de alimentos (g/ratón/día) con respecto a los días de tratamiento de ratones experimentales ob/ob con bromocriptina y SKF (círculos oscuros) o sin medicamentos (círculos abiertos) o animales delgados de control que no recibieron medicamentos (triángulos oscuros).

50 Las Figs. 3A y 3B son gráficos de barras de mediciones de masa corporal grasa medida en forma de glicerol (en g/ratón) (Fig. 3A) o masa corporal magra (proteína en g/ratón) (Fig. 3B) para animales ob/ob que no recibieron medicamentos (control) o recibieron bromocriptina sola (segunda barra desde la izquierda) o SKF solo (tercera barra desde la izquierda) o tanto BC como SKF (cuarta barra). El asterisco indica una diferencia significativa en comparación con la barra de control.

55 Las Figs. 4A y 4B son gráficos de barras de glucosa en sangre (mg/dl) de animales ob/ob (Fig. 4A) o insulina en suero (ng/ml) de animales ob/ob (Fig. 4B) que no recibieron la administración de medicamentos (control); (barra más a la izquierda); recibieron BC solo (segunda barra de la izquierda); SKF solo (tercera barra de la izquierda) o tanto BC como SKF (cuarta barra). Los asteriscos tienen el mismo significado que para la Fig. 3A.

60 Las Figs. 5A y 5B son gráficos de barras de niveles de triglicéridos en suero (TG) en ng/dl (Fig. 5A) o niveles de ácidos grasos libres en suero (FFA) en mmoles/l (Fig. 5B) para animales sin administración de medicamentos (control; barra más a la izquierda); administración de BC solo (segunda barra desde la izquierda); SKF solo (tercera barra de la izquierda) o tanto BC como SKF (cuarta barra). Los asteriscos tienen el mismo significado que para la Fig. 3A.

Las Figs. 6A-6C son gráficos de barras de niveles de glucosa en sangre en mg/dl (Fig. 6A) niveles de triglicéridos en suero en mg/dl (Fig. 6B) y FFA de suero en mmoles/l (Fig. 6C) para animales sin administración de medicamentos

(barra de la izquierda) o con administración de BC y SKF (barra de la derecha). Los asteriscos tienen el mismo significado que para la Fig. 3A. Los animales fueron sacrificados en 3 HALO del pico de lipogénesis para ratones.

Las Figs. 7A-7C son gráficos de barras de actividad de enzima en el hígado (en milimoles de ácido graso por mg de proteína por minuto) para las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos en el hígado: ácido graso sintasa (Fig. 7A), enzima málica (Fig. 7B) o glucosa-6-fosfatasa (Fig. 7C) mostrando la diferencia en dichas actividades igual que entre animales sin administración de medicamentos (barra de la izquierda) o con administración de BC y SKF (barra de la derecha). Los asteriscos tienen el mismo significado que para la Fig. 3A.

Las Figs. 8A y 8B son gráficos de barras similares a los de las Figs. 7A-7C, pero para las enzimas del hígado PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Las Figs. 9A-9C son gráficos de barras similares a los de las Figs. 7A-7C, pero para las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos en tejidos adiposos: ácido graso sintasa (Fig. 9A) enzima málica (Fig. 9B) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig. 9C).

Las Figs. 10A y 10B son gráficos de barras de transporte de glucosa (en pmoles/célula/minuto) (Fig. 10A) y oxidación de glucosa en CO₂ (en pmoles/célula/minuto) (Fig. 10B) medido para ratones tratados con BC + SKF y "sin medicamentos" en ausencia (barras blancas) y presencia (barras oscuras) de insulina en adipocitos aislados.

La Fig. 11 es un gráfico de barras de lipólisis medida en forma de liberación de glicerol (pmoles/célula/minuto) en adipocitos aislados para ratones tratados con BC + SKF y ratones "sin medicamento".

La Fig. 12A es un gráfico de lipogénesis adiposa medida en forma de velocidad de incorporación de glicerol en lípidos (mg/minuto/gramo de grasa) como función del tiempo de sacrificio para ratones (en HALO) tratados con BC + SKF (círculos abiertos) o no tratados (círculos oscuros).

La Fig. 12B es un gráfico de barras de la actividad lipasa en lipoproteína (LPL) (en mmoles de ácido graso libre/10⁶ células/hora para ratones tratados con SKB + BC o "sin medicamentos").

Las Figs. 13A y 13B son micrografías de adipocitos de animales tratados con BC + SKF (Fig. 13B) y sin tratamiento (Fig. 13A). La cantidad de lípido por célula (en µg lípido/célula) se indica al lado de cada Fig. .

Las Figs. 14A-14C son micrografías de núcleos arqueados de ratones de control ob/ob (Fig. 14A), ratones ob/ob tratados con BC + SKF (Fig. 14B) y controles de delgados (57 BL/6J) (Fig. 14C) mostrando grandes cantidades de ARNm de neuropéptido Y (NPY) en los controles ob/ob y cantidades significativamente reducidas de ARNm de NPY en los ratones tratados ob/ob.

La Fig. 15 es un gráfico de barras de ARNm de NPY en el núcleo arqueado de ratones ob/ob tratados con BC + SKF (barra intermedia) o ratones ob/ob sin tratamiento (barra de la izquierda) o controles de animales delgados sin tratamiento (barra de la derecha).

La Fig. 16 es un gráfico de peso corporal con respecto al día de tratamiento con un agonista D₂ solo o con un agonista D₁ solo, o con una combinación D₁/D₂ de acuerdo con la invención. BC (10 mg/kg), BC más SKF 38393, o inyección de vehículo en el peso corporal en ratones C57BL/6J ob/ob durante dos semanas de tratamiento diario 1 hora después del inicio de la iluminación. Un asterisco indica una diferencia significativa en cambio de peso corporal con respecto a todos los demás grupos de tratamiento (P<0,02).

Descripción Detallada de la Invención

En un aspecto de la descripción, un agonista D₁ de dopamina, SKF 38393 es administrado conjuntamente con un segundo agente, que consiste en al menos un agonista D₂, un agonista α₂, un antagonista α₁ y un inhibidor serotoninérgico (o un agonista D₂ y al menos uno de los agentes restantes) preferiblemente en un momento específico del día a un individuo con necesidad de tratamiento.

Según se utiliza en la presente memoria y se aplica a la administración de más de un ingrediente activo, los términos "conjunto" o "en conjunción" significan que el individuo que está siendo tratado de esta manera recibe un primer agente activo y también como mínimo otro agente activo, pero no necesariamente dentro de la misma forma de formulación o dosificación y no necesariamente en el mismo momento de administración. Por ejemplo, el agonista D₁ y el agonista D₂ o los otros agentes pueden ser administrados al mismo tiempo (en la misma forma de dosificación o en dos o más formas de dosificación divididas) o secuencialmente en diferentes momentos y con diferentes formas de dosificación.

El agonista D₁ de dopamina puede ser una o más sustancias cualesquiera de las sustancias conocidas por los

expertos en la técnica que son capaces de activar o potenciar los receptores D₁ de dopamina. Los agonistas D₁ que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen SKF38393, dihidrexidina, SKF 75670, SKF 82957, A77636, A68930, SKF 82526 (fenoldopam), y trans-10,11-dihidroxi 5,6,6a,7,8,12b-hexahidro racémico.

5 Los agonistas D₂ para su uso en la presente invención son alcaloides de ergot tales como 2-bromo-alfa-ergocriptina (bromocriptina), 6-metil-8-beta-carbobenciloxi-aminoetil-10-alfa-ergolina, 8-acilaminoergolina, 6-metil-8-alfa-(N-acil)amino-9-ergolina, pergolida, lisurida, 6-metil-8-alfa-(N-fenil-acetil)amino-9-ergolina, argocamina, 9,10-dihidroergocomina, cualquier ergolina D-2-halo-6-alquil-8-sustituida, y D-2-bromo-6-metil-8-cianometilergolina. De estos el más preferido es la bromocriptina.

10 Las cantidades eficaces de alcaloides de ergot para seres humanos y vertebrados, cuando se administran solos (no conjuntamente con un agonista D₁), se encuentran de manera típica en un intervalo de 5,0 µg/kg/día a 0,2 mg/kg/día.

15 En general, las cantidades eficaces de agonista D₂ para seres humanos y vertebrados se encuentran en el intervalo de 5 µg/kg/día a 3,5 mg/kg/día.

20 Los antagonistas α₁ pueden ser uno o más cualesquiera de los compuestos conocidos por los expertos en la técnica que bloquean directamente o indirectamente la activación de adrenoceptores α₁. Los antagonistas α₁ incluyen bromocriptina, benoxatina HCl, naftopidilo 2HCl, (±)-niguldipina HCl, S(+)-niguldipina HCl, prazosina HCl, doxazosina HCl, espiperona HCl, urapidilo HCl, 5-metil urapidilo, WB-4101 HCl.

Las cantidades eficaces de antagonista α₁ para seres humanos y vertebrados están generalmente en el intervalo de 0,02 a 0,3 mg/kg/día.

25 Los agonistas α₂ pueden ser uno o más cualesquiera de los compuestos conocidos por los expertos en la técnica que son capaces de activar los adrenoceptores α₂. Los agonistas α₂ incluyen bromocriptina, sulfato de agmatina, p-aminoclonidina HCl, B-HT 920 diHCl, B-HT 933 diHCl, clonodina HCl, acetato de guanabenz, p-yodoclonidina HCl, oximetazolina HCl, UK 14,304, y xilazina HCl.

30 Las cantidades eficaces de agonista α₂ para seres humanos y vertebrados se encuentran generalmente en el intervalo de 1 µg/kg/día a 0,3 mg/kg/día.

Los inhibidores serotoninérgicos incluyen bromocriptina:

35 Las cantidades eficaces de inhibidores serotoninérgicos para seres humanos y vertebrados se encuentran generalmente en el intervalo de 5 µg/kg/día a 0,2 mg/kg/día.

40 Cuando se administran dos (o más) agentes conjuntamente como se describe en el Compendio de la Invención, la cantidad de uno u otro pueden ser inferiores a las establecidas más arriba, e incluso se pueden emplear cantidades que están por debajo del umbral (cuando un agente se utiliza individualmente).

45 El agonista D₁ de dopamina y el agonista D₂ de dopamina pueden ser administrados a un individuo preferiblemente por vía oral, o con inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular. Los sistemas de administración dérmica, por ejemplo, parches cutáneos, así como supositorios y otros sistemas bien conocidos para administrar agentes farmacéuticos, pueden ser también utilizados. Asimismo se prevén formas de administración sublingual, nasal u otras modalidades transmucosales. Se prefieren las composiciones de liberación acelerada, tales como las que se dan a conocer en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de serie 08/459.021.

50 Cada uno de: el agonista D₂, el antagonista α₁, el agonista α₂ y el inhibidor serotoninérgico, se administran preferiblemente en un momento predeterminado. La razón es que el efecto de cada uno de estos agentes sobre el metabolismo de lípidos y/o glucosa es sensible al momento, tal como se ha explicado de manera más detallada para los agonistas D₂ en la Patente de los Estados Unidos 5.585.347 y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 08/456.952. El momento preferido de administración se encuentra dentro de un intervalo que da como resultado niveles eficaces en sangre del agente o agentes en un momento durante el cual los niveles de prolactina normales en individuos sanos de la especie que se va a tratar son bajos. Por ejemplo, en seres humanos, los niveles de prolactina estándar son bajos entre las 9:00 y las 22:00. Por consiguiente, el momento predeterminado de administración de uno o más de los agentes antes mencionados es entre las horas 5:00 y 13:00, preferiblemente de las 7:00 a las 12:00. Se pueden administrar dosis divididas y el programa de administración se puede variar para tener en cuenta características farmacocinéticas de cada uno de los agentes activos. Se facilitan detalles de administración en la Patente de los Estados Unidos 5.585.347 y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 08/456.952 para la bromocriptina, pero también se aplican a los antagonistas α₁, a los agonistas α₂ y a los inhibidores serotoninérgicos.

60 Para los ratones el momento preferido de administración del agente activo es dentro de una hora después del inicio de la iluminación. Adicionalmente se prefiere que la administración tenga lugar cuando el individuo no se encuentra

ni activo ni en fase de alimentación.

Para otros animales vertebrados, el momento preferido de administración se puede determinar por referencia al ritmo de prolactina normal para la especie del animal a tratar. La curva de prolactina normal puede ser generada midiendo la prolactina en miembros de la especie jóvenes y sanos durante un periodo de 24 horas. Véase en la Patente de los Estados Unidos 5.585.347 y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos. 08/456.952.

La administración del agonista D₁ también es programada preferiblemente, es decir, el agonista D₁ es administrado también en un momento predeterminado. Dado que el agonista D₁ amplifica el efecto del agente unido al mismo, es ventajoso administrar al agonista D₁ en el momento de la administración del agente o agentes conjuntos, o cerca de la misma, de manera tal que el periodo de actividad del agonista D₁ en la corriente sanguínea del individuo tratado se solape (de hecho, se solape preferiblemente en el mayor grado posible) con el periodo de actividad del agente conjunto. Por conveniencia para la administración y para ayudar a la adaptación del individuo, el agonista D₁ puede ser administrado en el mismo momento que el agente o agentes conjuntos.

El agonista D₁ puede encontrarse, sin que ello sea necesario, en la misma forma de formulación o dosificación (o puede formar parte de la misma composición) que el agente o agentes conjuntos. Si se administra más de un agente conjuntamente, los agentes administrados conjuntamente pueden encontrarse en la misma forma de formulación o dosificación o pueden formar parte de la misma composición, sin que ello sea necesario.

En el tratamiento de vertebrados, en general, las dosificaciones de agonista D₁ y del agente o agentes conjuntos son administradas típicamente durante un periodo comprendido desde aproximadamente 10 días hasta aproximadamente 180 días, o un tiempo más prolongado. Algunos pacientes (por ejemplo, pacientes en estado físico especialmente desfavorable o los de edad avanzada) pueden requerir un tratamiento más largo, o incluso continuo. Una duración de tratamiento que supera seis meses o incluso un tratamiento continuo pueden ser deseables aunque no sean requeridos.

Como mínimo uno de los factores siguientes: depósitos corporales de grasa, peso corporal, glucosa en plasma o en sangre, insulina en circulación, triglicéridos en plasma (TG), ácidos grasos libres en plasma (FFA) y consumo de alimentos del individuo se reducirán como resultado del tratamiento. Los desórdenes de metabolismo de lípidos y glucosa son tratados de este modo y los individuos que sufren de dichas patologías tales como hiperfagia, obesidad, resistencia a la insulina (tolerancia alterada a la glucosa), hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia mostrarán mejoras con índices metabólicos correspondientes.

Si bien la administración apropiadamente programada de ciertos agonistas D₂ (es decir, bromocriptina) solos producirá los efectos descritos anteriormente en cierto grado, estos efectos se amplifican (potencian) por la administración conjunta de los agentes agonistas D₁ descritos en la presente invención. En otras palabras, el efecto sinérgico de la administración conjunta del agonista D₁ y del agente conjunto (es decir, un agonista D₂, y/o un antagonista α 1, y/o un inhibidor serotoninérgico y/o un agonista α 2) produce resultados que son superiores a los experimentados por la administración de la misma cantidad de agonista D₂ solo. Se debe observar que la presente invención permite, pero no requiere, que cada uno de los agentes sea administrado en una cantidad superior a la cantidad umbral (en ausencia de un agente conjunto) para mejorar uno o más índices metabólicos precisamente a causa del mayor efecto alcanzado en esos índices por la administración conjunta de acuerdo con la presente invención.

Las ventajas de la invención no están limitadas a la modificación y regulación de metabolismo de lípidos y de la glucosa. Otras funciones corporales, tales como presión sanguínea, se pueden modificar de manera beneficiosa y se pueden regular por la administración programada de un agonista D₂ (como monoterapia) en el intervalo de dosificación que se ha dado a conocer anteriormente. Por ejemplo, el autor de la presente invención ha demostrado que la bromocriptina del agonista D₂, administrada a una dosis dentro del intervalo que se ha indicado anteriormente (4,8 mg/día a las 8:00 AM) disminuye significativamente la presión sanguínea diastólica en seres humanos.

Estas y otras características de la invención se comprenderán mejor haciendo referencia a los experimentos que se describen en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Se trataron ratones hembra ob/ob (40-70 g de peso corporal) durante dos semanas con uno de: 1) bromocriptina (11 mg/kg) al inicio de la iluminación, 2) SKF38393 (20 mg/kg) al inicio de la iluminación, 3) bromocriptina más SKF38393 al inicio de la iluminación, o 4) vehículo al inicio de la iluminación.

La bromocriptina o SKF38393 solos produjeron reducciones moderadas de la hiperfagia, aumento de peso corporal y obesidad. No obstante, la bromocriptina más el tratamiento con SKF produjeron reducciones significativas en la hiperfagia (50-60% $p < 0,01$), dando como resultado notables pérdidas de peso corporal (21%, $p < 0,0001$, en

comparación con los controles).

- Los análisis de composición corporal de cuerpos tratados con KOH/EtOH no reveló disminución significativa de masa proteínica ni una disminución de 22% ($p < 0,05$) de la masa adiposa en ratones tratados con bromocriptina más SKF con respecto a los controles. También el tratamiento de bromocriptina más SKF disminuyó en mucha mayor medida que la bromocriptina o el SKF solos, los ácidos grasos libres en plasma (FFA) (44%, $p < 0,001$), los triglicéridos (TG) (50%, $p < 0,05$), y la glucosa (57%, $p < 0,01$). Los niveles de insulina tendieron a disminuir (en 50%; $p < 0,09$) y el colesterol total permaneció sin cambios por la terapia de medicamentos combinados.
- Animales más grandes (65-75 g) tratados con bromocriptina más SKF 38393 mostraron una pérdida incluso más notable de peso corporal con respecto a los controles (10 + 1 g en diez días; $p < 0,01$). Los niveles de ARNm del neuropéptido arqueado Y (NPY) siguen sin cambios después del tratamiento de bromocriptina más SKF en comparación con los controles.
- Se trataron ratones obesos hembra C57BL/6J con 40-45 g de peso corporal mediante inyecciones diarias (en 1 HALO) de bromocriptina (BC a 10 mg/kg) y/o SKF38393 (SKF a 20 mg/kg). Los animales fueron retenidos en fotoperíodos diarios de 12 horas y alimentados ad libitum. El consumo de alimentos fue controlado diariamente y los pesos corporales fueron controlados en los días 0, 7 y 14 del tratamiento.
- Los animales fueron sacrificados en las horas 1 y/o 4 después del inicio de la iluminación ("HALO") (excepto lo que se describe en la figura 12A) y se recogieron sangre, muestras de hígado y de tejidos adiposos. Los cuerpos fueron sometidos a digestión en KOH etanólico y se analizaron para determinar el contenido de proteínas y lípidos. Se midió la glucosa en sangre con un medidor de glucosa Accu-Chek Advantage (Boehringer). Se midió la insulina en suero con un kit de radioinmunoanálisis (Linco Research) utilizando estándares de insulina en ratas. Se midieron los triglicéridos totales y los ácidos grasos libres con kits de Sigma Diagnostics, St. Louis, MO y Wako Chemicals, respectivamente.
- Se midió la actividad enzimática de la ácido graso sintasa, la enzima málica y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la fracción citosólica aislada por métodos espectrofotométricos. Se analizó la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK) en citosol de hígado por incorporación de $H^{14}CO_3^-$ en fosfoenolpiruvato. Se determinó la actividad de glucosa-6-fosfatasa espectrofotométricamente en microsomas de hígado aislados.
- Se aislaron adipocitos de masas de grasa perigonadal por digestión de colagenasa y se determinaron sus dimensiones combinando la medición al microscopio de su diámetro y la extracción de lípidos de su contenido de lípidos. Se midieron el transporte de glucosa y el metabolismo de la misma por U- ^{14}C -glucosa en ausencia y presencia de insulina, y se analizó la lipólisis basal por medición de la liberación de glicerol utilizando ^{32}P -g-ATP. Se midieron los niveles de ARNm de neuropéptido Y (NPY) en los núcleos arqueados de los ratones utilizando hibridación *in situ*.
- Como resumen, el tratamiento con bromocriptina (BC) más SKF38393 (SKF) de ratones C57 BL/6 ob/ob produce los siguientes cambios en la fisiología metabólica:
- (1) Reducción del 42% de hiperfagia, reduciendo los niveles de alimentación diarios a menores o iguales que los controles de individuos delgados (+/+) (Fig. 2)
 - (2) Pérdida de 3,67 g de peso corporal con respecto a 4,3 g de ganancia de peso corporal en los controles de obesidad. (Fig. 1)
 - (3) Reducción de 27% de masa corporal grasa (Fig. 3A) sin pérdida de proteínas (Fig. 3B) a pesar de una reducción sustancial en el consumo de alimentos.
 - (4) Reducción de 57 y 41% en hiperglicemia (Fig. 4A) y en hiperinsulinemia (Fig. 4B) respectivamente.
 - (5) Reducción de 44 y 50% de la concentración de FFA en el suero (Fig. 5B) y TG (Fig. 5A).
 - (6) Reducción de 27-78% en enzimas de lipogénesis dentro del hígado y adiposas (Figs. 7A-7C, 8A-8B, 9A-9C).
 - (7) Reducción de 64% en glucosa-6-fosfatasa del hígado y 80% de incremento en actividades de G6P deshidrogenasa (Fig. 8B) así como reducción significativa en ácido graso sintasa (Fig. 7A) y enzima málica (Fig. 7B).
 - (8) 42% de reducción lipólisis basal a partir de adipocitos aislados (Fig. 11) o en ratones tratados *in vivo* sin cambio en el transporte de glucosa (Fig. 10A) o de oxidación (Fig. 10B) o de expresión de GLUT4 (no se muestran datos) y también reducción significativa en las dimensiones de los adipocitos (Comparar Figs. 13B y 13A).
 - (9) Reducción de 50% en actividad de lipoproteína lipasa (LPL) de tejidos adiposos y bloqueo de lipogénesis (Figs. 12B y 12A respectivamente).
 - (10) Los cambios metabólicos observados inducidos por BC + SKF están asociados a una reducción de 30% del nivel de ARNm de NPY dentro de los núcleos arqueados, dando como resultando niveles que son todavía el doble que en oponentes delgados (+/+) (Fig. 15). Se puede observar cualitativamente un resultado similar en

las Figs. 14A-14C.

- (11) La reducción en glucosa en la sangre, triglicéridos y ácidos grasos libres es más pronunciada en 4 HALO (máximo de lipólisis en el ratón). Ver la Fig. 6 y comparar la Fig. 6A con la Fig. 4A, la Fig. 6B con la Fig. 5A y la Fig. 6C con la Fig. 5B.

El tratamiento de ratones C57 BL/6J genéticamente obesos con bromocriptina (agonista D₂) además de SKF38393 (agonista D₁) indujo una reducción de peso corporal asociada con una marcada reducción (42%) de la hiperfagia. La pérdida de peso corporal resultante fue atribuida casi exclusivamente a la pérdida de grasas, permaneciendo la masa de proteínas restante sin cambios o incluso con incremento. La pérdida de grasas puede ser atribuida a una disminución de la absorción calórica y también a una disminución de la lipogénesis dado que se redujeron las actividades de la enzima lipogénica tanto hepática como de adiposa por el tratamiento. La reducción sustancial en la absorción calórica inducida por tratamiento fue asociada a una leve reducción en los ácidos grasos libres circulantes (FFA). Es decir, las dimensiones de las células de grasa (contenido de lípidos) disminuyeron notablemente mientras que disminuyeron simultáneamente la lipogénesis y la movilización de lípidos. Aparentemente, la movilización disminuida está asociada con una disminución todavía mayor del incremento de lípidos. Esta conclusión se basa en los descubrimientos de la disminución de LPL adiposa, y suero total y VLDLTG (lipoproteínas/triglicéridos de muy baja densidad).

La marcada reducción en la glucosa en suero inducida por tratamiento está asociada con una fuerte reducción en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en el hígado y una disminución algo menos notable en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. De modo interesante, la reducción en la actividad de G-6-fosfatasa en el hígado y el incremento simultáneo de actividad G-6-P dehidrogenasa sugieren una canalización metabólica específica hacia la utilización de glucosa en el hígado, en vez de liberación de glucosa o producción de la misma. Estas alteraciones en el metabolismo del hígado facilitan el incremento de HADPH hepático, ácidos nucleicos y síntesis de proteínas.

Los descubrimientos anteriores pueden ser aplicados al tratamiento de seres humanos afectados de obesidad y otros desórdenes de lípidos.

Ejemplo 2

Se trataron diferentes grupos de ratones C57BL/6 ob/ob de 6 semanas de edad (carentes de proteína leptina funcional) con bromocriptina ("BC") (10 mg/kg peso corporal), SKF38393 ("SKF") (10 mg/kg peso corporal), ambos medicamentos simultáneamente, o vehículo durante dos semanas 1 hora después del inicio de iluminación (HALO). Los animales fueron retenidos en fotoperíodos de 12 horas diarias y se permitió su alimentación *ad libitum*. El consumo de alimento fue controlado diariamente durante 3 días antes del inicio del tratamiento a lo largo del periodo de tratamiento de 14 días. Los animales fueron sacrificados entre 1 y 3 HALO al día siguiente del tratamiento final (es decir, 24-26 horas después de la última inyección) y se recogió plasma para análisis de insulina, glucosa y lípidos mientras que los cuerpos fueron solubilizados en KOH etanólico y analizados para averiguar el contenido de proteínas y de lípidos. La bromocriptina y el SKF38393, individualmente, fueron ineficaces en la reducción de ganancia de peso corporal mientras que SKF, pero no BC, redujo el consumo de alimentos (19%, $P < 0,01$). No obstante, el tratamiento combinado de bromocriptina y SKF38393 (BC/SKF) disminuyó el consumo de alimentos en 46% (de $4,8 \pm 0,2$ a $2,6 \pm$ g/día; $P < 0,001$) y el peso corporal en 15% (de un incremento de 3,2 g en los controles a una disminución de 4,3 g; $P < 0,005$) en 14 días de tratamiento (Fig. 16). Con respecto a los controles, en términos absolutos, el contenido de lípidos de los animales tratados con BC/SKF disminuyó en 40% (de $4,2 \pm 0,2$ a $2,5 \pm 0,3$ g glicerol/animal; $P < 0,0003$) mientras que el contenido de proteínas se incrementó en 8% (de $3,7 \pm 0,08$ a $4,0 \pm 0,08$ g/animal; $P < 0,05$). Por lo tanto, con respecto a los ratones de control, los animales tratados con BC/SKF consumieron menos alimentos pero realmente incrementaron la masa de proteínas mientras que simultáneamente perdieron peso y grasa. Este efecto en la composición corporal se observó por tratamientos de SKF ($P < 0,003$) ó BC ($P < 0,04$) solos, si bien en un menor grado que por la combinación BC/SKF ($P < 0,05$). Si bien BC solo y SKF solo redujeron significativamente la concentración de glucosa en el plasma (en 31%; $P < 0,02$ y 43%; $P < 0,004$, respectivamente), la combinación BC/SKF redujo la glucosa en plasma (en 60%; $P < 0,0004$) sustancialmente en mayor grado que cualquiera de los dos medicamentos solos ($P < 0,03$) a valores equivalentes a los valores indicados para ratones delgados euglicémicos C57BL/6 (+/+) (1). El nivel de insulina en plasma se redujo igualmente por tratamiento por BC y BC/SKF (50%; $P < 0,04$), pero no quedó afectado por SKF solo. BC/SKF, pero ni BC ni SKF, redujeron los niveles de triglicéridos en plasma y de ácidos grasos libres (en 36%; $P < 0,05$ y 44% $P < 0,007$), (Tabla 1, a continuación). Estos datos indican que los efectos interactivos de BC y SKF reducen eficazmente la hiperfagia, la obesidad, la resistencia a la insulina, la hiperglicemia, la hiperinsulinemia, y la hiperlipidemia en ratones ob/ob.

Tabla 1. Efectos de BC (10mg/kg), SKF (10mg/kg), BC más SKF, o inyecciones de vehículo a 1 HALO sobre el peso corporal, la composición del cuerpo, el consumo de alimentos, y la glucosa en plasma, la insulina, y los niveles de lípidos de ratones ob/ob después de dos semanas de tratamiento. Los animales se sacrificaron 24-26 horas después del último tratamiento. Dentro de los parámetros, los valores con superíndices similares indican una diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0,05$ a $< 0,0001$).

	Peso Corporal Final (g)	Lípidos-Glicerol Totalidad Cuerpo (g) (% peso corporal)	Proteína Totalidad Cuerpo (g) (% peso corporal)	Glucosa Plasma (mg/dl)	Insulina Plasma (ng/ml)	TG Plasma (mg/dl)	FFA Plasma (µM)	Consumo Alimentos (g/día)
CONTROL	54 ± 1 ¹	4,2±0,2 ¹	3,7±0,1 ^{1,2,3}	380±38 ^{1,2}	59±12 ^{1,3}	313±45 ¹	826±83 ¹	48±0,2 ^{1,2}
		7,8±0,3 ¹	6,9±0,2 ¹					
BC	53±0,7 ¹	3,7±0,1 ¹	4,0±0,1 ¹	262±26 ¹	30±4 ¹	405±101	518±84 ²	4,5±0,2 ^{3,4}
		7,0±0,2 ¹	7,5±0,1 ¹					
SKF	52±0,7 ¹	3,1±0,1 ¹	4,1±0,04 ¹	218±22 ¹	50±13	234±22 ¹	871±38 ¹	3,9±0,07 ^{3,4,5}
		8,0±0,2 ¹	7,8±0,1 ¹					
SC/SKF	45±2 ^{1,2,3}	2,6± 0,3 ¹	4,0±0,1 ³	164±16 ^{1,2}	20±9 ¹	189±19	481±63 ^{1,2,3}	2,6±0,2 ^{1,2,3}
		5,4±0,5 ¹	9,8±0,04 ¹					

Los valores difieren significativamente con respecto a los controles obesos (a=P<0,06; b=P<0,01; c=P<0,001).

Ejemplo 3

5 Se examinaron los efectos de tratamiento de BC/SKF sobre los ritmos circadianos de actividades enzimáticas metabólicas clave, metabolitos en suero y hormonas reguladoras del metabolismo. Se trataron ratones obesos C57BL/6J durante 2 semanas 1 hora después del inicio de iluminación con BC (10 mg/kg peso corporal y SKF (20 mg/kg peso corporal) o vehículo. Los ratones fueron sacrificados a continuación cada 4 horas durante un periodo de 24 horas para los análisis de hormonas en suero y metabolitos, así como actividades enzimáticas hepáticas. La glucosa en suero, los ácidos grasos libres (FFA) y la actividad de glucosa-6-fosfatasa hepática (G6Pasa) fueron mayores durante el periodo de luz del día, mostrando que este periodo de tiempo es el máximo diario para la lipólisis y la producción de glucosa hepática en ratones. El tratamiento con BC/SKF redujo significativamente la glucosa en sangre (51%), los FFA (56%) y la actividad de G6Pasa (38%) durante este periodo de luz. Además, los niveles de suero de las hormonas lipolíticas y gluconeogénicas la tiroxina y corticosterona fueron también los máximos durante el periodo de luz y sus niveles se redujeron significativamente en 51% y 53%, respectivamente, por el tratamiento con BC/SKF. El tratamiento con BC/SKF disminuyó también el máximo diario de actividad de fosfoenol piruvato carboxiquinasa en el hígado en 27% e incrementó el máximo diario de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa en hígado (en 32%) (potenciando la glicólisis por medio de la producción de xilosa-5-fosfato). Los niveles de insulina en suero y de enzima málica en hígado fueron los máximos durante el periodo de oscuridad (tiempo de alimentación) del día, mostrando lipogénesis incrementada durante este tiempo en los ratones. Durante este periodo de oscuridad, el tratamiento con BC/SKF redujo la insulina en suero significativamente, es decir, en 42%, y la enzima málica en hígado en 26%. El tratamiento con BC/SKF disminuyó también la actividad de la ácido graso sintasa en el hígado en 30-50%, normalizando su ritmo circadiano. Estos efectos demostraron la implicación tanto de los sistemas circadianos como de la influencia de BC/SKF sobre estos sistemas en la regulación del metabolismo.

Ejemplo 4

Se estudió *in vitro* el efecto de tratamiento *in vivo* de BC/SKF sobre la liberación de insulina inducida por glucosa. Se trataron ratones C57BL/6J obesos (ob/ob) y delgados (+/+) diariamente durante 2 semanas con BC (10 mg/kg) más SKF (20 mg/kg) o solamente con vehículo. Se sacrificaron los ratones 25 horas después del final del tratamiento y se aislaron islotes para su incubación estática con glucosa. El tratamiento con BC/SKF de ratones obesos redujo la glucosa en sangre (173± 14 mg/dl, P < 0,01), el glicerol total en plasma 162±9 con respecto a 386±33 mg/dl, P<0,01), y el colesterol total en plasma (143±5 con respecto a 184±5 mg/dl, P<0,01) con respecto a los controles obesos. Los ácidos grasos libres en plasma y los niveles de insulina de los ratones tratados fueron reducidos también en 20-30% en comparación con los de los controles obesos. En ratones de control ob/ob, la liberación de insulina de islotes aislados, estimulada por glucosa 10 mM, fue igual que la de glucosa 8 mM (1,6±0,2 con respecto a 1,9±0,5 ng/islote/h), mientras que en los ratones ob/ob tratados con BC/SKF, la glucosa 15 mM indujo un incremento significativo de la liberación de insulina en comparación con la glucosa 8 mM (4,1±0,8 con respecto a 1,8±0,4 ng/islote/h, P<0,05). Este incremento es comparable al observado en ratones delgados que mostraron un incremento del doble de liberación de insulina en respuesta a la glucosa 15 mM frente a 8 mM. Un tratamiento similar con BC/SKF de ratones delgados no mostró efecto alguno en la liberación de insulina estimulada por glucosa

de islotes aislados en comparación con los controles delgados. El tratamiento con BC/SKF invirtió la detección de empeoramiento de glucosa en los islotes en ratones ob/ob, posiblemente debido, en parte, a la mejora de la hiperglicemia y la hiperlipidemia por este tratamiento.

- 5 Dado que la hiperglicemia y la hiperlipidemia pueden inducir la desensibilización de los islotes a la glucosa, lo cual es un síndrome común en DMNID asociada a obesidad en seres humanos, el descubrimiento anterior puede ser aplicado a la terapia de la DMNID en seres humanos.

Ejemplo 5

10 Se evaluaron los cambios metabólicos resultantes del tratamiento con agonista D₁/D₂ en ratones para determinar si se veían acompañados de disminución en la densidad de la inmunoreactividad NPY en núcleos hipotalámicos discretos. Se trataron ratones hembra ob/ob (30-35 g) diariamente 1 hora después del inicio de la luz con SKF38393 (20 mg/kg) y bromocriptina (15 mg/kg) o con vehículo. Sirvieron también como controles ratones delgados (C57BL/6J; 18-21 g) tratados con vehículo. Después del tratamiento durante 12 días, los ratones fueron sacrificados y sus cerebros fueron procesados para determinar la inmunoreactividad NPY. El tratamiento (resumido en la siguiente Tabla 2) produjo una disminución significativa de niveles NPY en el SNC (38,5% P<0,01), núcleo arqueado (41 %; P<0,005) y el PVN (31,4% P<0,05) en comparación con controles obesos. Además, durante el estudio los pesos corporales aumentaron en los controles obesos (8,3+/-0,9 g) mientras que disminuyeron en los animales tratados (-1,1 +/-2 g) (P<0,0001). Estos resultados indican que la coactivación D₁/D₂ dopaminérgica dependiente de la hora del día mejora la hiperfagia, la hiperglicemia y la obesidad en ratones ob/ob, en parte, al reducir los niveles elevados de NPY hipotalámico al de animales delgados.

Tabla 2

25

Tipo	Alimento consumido (g/día)	Glucosa en sangre (mg/dl)	Densidad NPY (unidades arbitrarias)		
			SCN	Núcleo Arqueado	PVN
Delgado	3,1+/-0,1	133+/-5	39,8+/-3	54+/-4	49+/-5
Obeso	6,1+/-0,1	216+/-16	55,2+/-4	95+/-10	52+/-6
Tratado	4,3+/-0,1 ^c	136+/-9 ^c	34+/-4 ^b	56+/-8 ^b	36+/-3 ^a

Ejemplo 6

30 Se examinó la influencia del tratamiento con BC/SKF sobre el metabolismo hepático de la glucosa. Se trataron ratones obesos (ob/ob) C57BL/6J hembra (peso corporal = 46 ± 1 g) diariamente durante 2 semanas con BC (12,5 mg/kg) y SKF (20 mg/kg) o vehículo (n=8-12/grupo) una hora después del inicio de la luz y a continuación se sacrificaron a las 24-26 horas después del día final del tratamiento y se retiraron tejidos del hígado y se analizaron para determinar la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDasa) y la concentración de xilosa-5-fosfato (X5P) hepática. ++Se determinaron también los niveles de glucosa en suero y de insulina. El tratamiento con BC/SKF redujo sensiblemente (P<0,01) la glucosa en suero en 57% (de 435 ± 21 a 185 ± 8 mg/dl), la insulina en suero en 44% (de 25 ± 2 a 14 ± 3 ng/ml), la actividad de G6Pasa hepática en 67% (de 1,5 ± 0,3 a 0,5 ± 0,07 μmoles/min/mg) e incrementó la actividad de G6PDasa hepática en 73% (de 11 ± 1 a 19 ± 3 nmoles/min/mg), y la concentración de X5P en 73% (de 166 ± 10 a 287 ± 30 nmoles/g) con respecto al control. El tratamiento con BC/SKF tuvo como resultado que el sustrato gluconeogénico fue trasladado de la ruta de glucosa a la de pentosa fosfato por la inhibición simultánea de glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) y la estimulación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDasa) bloqueando respectivamente la producción de glucosa hepática y desplazando la glucosa-6-fosfato a la producción de xilosa-5-fosfato (X5P), un potente activador de glicólisis. Este es el primer estudio que identificó la existencia de dicho cambio bioquímico en el metabolismo hepático de la glucosa y su regulación por activación dopaminérgica. Además, este desplazamiento regulado dopaminérgicamente de gluconeogénesis hepática hacia potenciación de la glicólisis podría contribuir a la normalización de hiperglicemia severa en estos animales y puede tener trascendencia en el desarrollo y tratamiento de la DMNID en seres humanos. Las pruebas de que se dispone sugieren que BC/SKF actúan en parte en el hipotálamo ventromedial produciendo estos efectos.

Ejemplo 7

La combinación de hiperglicemia e hipertrigliceridemia ha sido implicada como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares en la DMNI. Se ha demostrado que la coactivación del receptor D₁/D₂ dopaminérgico con SKF38393 (SKF), un agonista receptor D₁, además de bromocriptina (BC), un agonista receptor D₂ actúa

sinérgicamente reduciendo la obesidad. Sus efectos sobre la hiperglicemia, la dislipidemia y la dinámica de las lipoproteínas en plasma fueron comprobados en ratones ob/ob. Se trataron ratones obesos C57BL/6J (ob/ob) (peso corporal $44,5 \pm 0,5$ g) diariamente al inicio de la luz con vehículo (control) o SKF (20 mg/kg peso corporal) más BC (16 mg/kg peso corporal) durante 14 días. De 25 a 28 horas después del tratamiento final los animales fueron sacrificados y se recogió sangre para el fraccionamiento y análisis de las lipoproteínas. Se midieron lipoproteínas y triglicéridos en suero (TG), colesterol (CH), fosfolípidos (PL), y glucosa en suero, insulina y ácidos grasos libres (FFA). Se recogieron tejidos adiposo blanco, músculo-esquelético y cardíaco para el análisis de las actividades de la lipoproteína lipasa (LPL). Un segundo grupo de animales con tratamiento similar fue utilizado para determinación de la síntesis de triacilglicerol hepático siguiendo la incorporación de ^3H -glicerol a los triglicéridos del hígado 30 minutos después de su administración in vivo. El tratamiento durante 14 días de SKF/BC redujo significativamente la glucosa en sangre (390 ± 17 a 168 ± 6 mg/dl), los TG en suero (397 ± 22 a 153 ± 7 mg/dl), el CH (178 ± 4 a 139 ± 4 mg/dl), los PL (380 ± 7 a 263 ± 11 mg/dl), y los FFA ($1,1 \pm 0,1$ a $0,7 \pm 0,1$ mmoles/l) ($P < 0,01$). La insulina se redujo también de 40 ± 5 a 28 ± 4 ng/ml ($P = 0,058$). Se redujeron quilomicon-TG y VLDG-TG de 228 ± 2 a 45 ± 6 mg/dl y 169 ± 7 a 110 ± 4 mg/dl, respectivamente ($P < 0,01$). Se redujo la síntesis de triacilglicerol hepático en 47% ($P < 0,01$). La actividad de LPL no cambió en los tejidos musculares esquelético y cardíaco pero se redujo fuertemente (67%) en tejidos adiposos ($P < 0,01$). El nivel de colesterol LDL se redujo en 31% ($P < 0,01$). Estos datos indican que SKF/BC normalizó la hipertrigliceridemia por medio de 1) disminución del nivel de quilomicon-TG y 2) disminución de la síntesis y secreción de VLDL-TG. La notable disminución de la actividad de LPL adiposa apoya la conclusión de que el VLDL-TG en suero se reduce por una síntesis hepática reducida en vez de un aumento de la eliminación de la circulación y puede contribuir también a la disminución del nivel de FFA en suero. Además, el nivel reducido de FFA en suero puede contribuir a una hiperglicemia más reducida.

Ejemplo 8

Un tratamiento de 2 semanas con SKF38393 (SKF), un agonista receptor D_1 de dopamina, y bromocriptina (BC), un agonista del receptor D_2 de dopamina actúa sinérgicamente reduciendo las grasas corporales y la hiperglicemia en ratones ob/ob en una forma independiente del consumo de alimentos. Los mecanismos bioquímicos responsables de este efecto fueron evaluados midiendo el consumo de energía y la utilización del sustrato metabólico determinado a partir del cociente respiratorio (CR) de ratones tratados con respecto a ratones de control. Los niveles de ácidos grasos libres circulantes (FFA) representan el factor limitante más importante de la oxidación de grasas y el incremento de FFA potencia también la hiperglicemia en estados de resistencia a la insulina. La influencia de tratamiento *in vivo* con SKF38393 (SKF), un agonista del receptor D_1 de dopamina, y bromocriptina (BC), un agonista del receptor D_2 de dopamina, sobre el nivel de FFA en suero y la lipólisis *in vitro* en adipocitos aislados fue objeto de comprobación. Se trataron ratones C57BL/6J hembra obesos (ob/ob) con vehículo (control) o SKF k (20 mg/kg peso corporal) más BC (10 mg/kg peso corporal) durante 14 días. El tratamiento con BC/SKF incrementó el consumo de O_2 y la producción de CO_2 en 143% y 90% respectivamente ($P < 0,0001$). Además, los valores de CR fueron desplazados por el tratamiento de $1,55 \pm 0,35$ a $1,03 \pm 0,11$ indicando una disminución en la conversión de glucosa *de novo* en lípidos (lipogénesis) y la utilización casi exclusiva de glucosa como fuente de energía (es decir, poca oxidación de grasas). Estos descubrimientos concuerdan con la sustancial disminución inducida por medicamentos en el nivel de glucosa en suero (489 ± 25 a 135 ± 10 mg/dl, $P < 0,0001$). Estas conclusiones de los datos del CR quedan apoyadas además por una notable disminución en el tamaño de las células grasas (de $0,722 \pm 0,095$ a $0,352 \pm 0,03$ μg de lípido/célula, $P < 0,02$) y una notable reducción en los niveles de FFA en el suero (de $1,06 \pm 0,1$ a $0,32 \pm 0,02$ mM, $P < 0,001$) y la lipólisis de isoproterenol estimulada *in vitro* (de $16,4 \pm 2,4$ a $5 \pm 0,6$ pmoles de glicerol liberado/célula/20 minutos, $P < 0,005$). Por lo tanto, el notable incremento en la producción de O_2 y CO_2 (y la reducida dimensión de las células grasas) no pueden ser explicados por la mayor movilización y oxidación de grasas. Estos datos indican que la coactivación del receptor dopaminérgico D_1D_2 desplaza el metabolismo de la glucosa de la lipogénesis a la oxidación con una disminución simultánea de la movilización y oxidación de grasas (mejorando de esta manera posiblemente la sensibilidad a la insulina). Estos descubrimientos tienen trascendencia para el tratamiento de la obesidad y de la hipertrigliceridemia asociada con la DMNID.

Ejemplo 9

Se examinó la eficacia combinada de SKF38393 (SKF), un agonista del receptor D_1 , y bromocriptina (BC), un agonista del receptor D_2 , en el tratamiento de la obesidad y la diabetes en ratones ob/ob (ratones que carecen del gen para la proteína leptina) y ratones db/db (ratones que carecen del receptor de leptina). Se administraron inyecciones de medicamento diarias a ratones hembra C57BL/6J ob/ob y C57BL/KJ db/db 1 hora después del inicio de la luz durante 14 días. Los grupos tratados con medicamentos recibieron BC (16 mg/kg) más SKF (20 mg/kg), mientras que los grupos alimentados en paralelo (alimento ajustado a la absorción de grupos tratados con medicamentos) y los grupos de control recibieron el vehículo. El consumo de oxígeno fue medido en jaulas metabólicas en los días 11 ó 12 de tratamiento. Se midieron la glucosa en plasma, los FFA, y los niveles de insulina en el día 14. En los ratones ob/ob los resultados estadísticamente significativos incluyeron: los controles ganaron $6,9 \pm 1,3$ g de peso corporal, mientras que los ratones tratados perdieron $7,4 \pm 0,4$ g. El consumo diario promedio de alimentos de los controles fue de $6 \pm 0,2$ g frente a $2,8 \pm 0,1$ g de animales tratados. El consumo de oxígeno para los controles y los animales tratados fue de 1277 ± 240 ml/kg/hr y 1623 ± 230 , respectivamente. Los niveles de glucosa

5 en plasma fueron de 471 ± 42 mg/dl en los controles y 164 ± 13 en animales tratados. Los niveles de FFA fueron de $1,27 \pm 0,1$ mM en controles y $0,37 \pm 0,05$ en animales tratados. La insulina en plasma tuvo valores de $63,5 \pm 17$ ng/ml en los controles y de $37,3 \pm 6,6$ en los animales tratados. Se observaron resultados estadísticamente significativos similares en ratones db/db: los controles ganaron $6,6 \pm 0,4$ g de peso corporal frente a $3,4 \pm 1,3$ g en los animales tratados. El consumo diario promedio de alimentos de los controles fue de $10,7 \pm 2,8$ g frente a $5,9 \pm 0,5$ g de los animales tratados. El consumo de oxígeno para animales de control y tratados fue de 898 ± 2150 ml/kg/hr y 2322 ± 283 , respectivamente. Los niveles de glucosa en plasma fueron de 485 ± 29 mg/dl en los controles y de 390 ± 55 en animales tratados. Los niveles de FFA fueron de $1,49 \pm 0,2$ mM en los controles, y de $0,45 \pm 0,04$ en los animales tratados. El plasma en animales alimentados en paralelo (tanto en ratones ob/ob como en ratones db/db) indicó que los cambios metabólicos anteriores inducidos por medicamentos no son básicamente la consecuencia de un consumo reducido de alimentos. Estos resultados sugieren fuertemente que la hiperfagia, la hiperglicemia y la hiperlipidemia en animales que carecen de leptina (ob/ob) o un receptor funcional de leptina (db/db) pueden ser tratados con la administración combinada de agonistas de receptores D₁ y D₂.

15 **Ejemplo 10**

La intervención farmacológica con bromocriptina mejora el metabolismo de glucosa y lípidos en animales y pacientes con DMNID. Se investigó la influencia de este tratamiento en la función de los islotes pancreáticos. Se evaluó el efecto de agonistas de receptores D₁/D₂ -- bromocriptina/SKSF38393 (BC/SKF) sobre la función de los islotes en un modelo diabético de ratón. Se trataron ratones hembra db/db (30 ± 1 g) diariamente durante 2 semanas 1 hora después del inicio del período de luz con 1) BC (16 mg/kg) más SKF (20 mg/kg), 2) solamente con vehículo (controles), o bien 3) vehículo más restricción alimenticia para equilibrar la reducción del consumo de alimentos en los ratones tratados (alimentados en paralelo). El tratamiento con BC/SKF redujo la glucosa en sangre (347 ± 28 frente a 606 ± 31 mg/dl en los controles, $P < 0,01$) y los niveles de ácidos grasos libres en plasma ($0,6 \pm 0,1$ frente a $1,1 \pm 0,1$ mM en los controles, $P < 0,01$), y un aumento del nivel de insulina en plasma de 3 veces en comparación con el de los controles (49 ± 5 frente a 16 ± 2 ng/ml, $P < 0,01$). En ratones alimentados en paralelo se experimentó una reducción más moderada (30%) ($P < 0,01$) de glucosa en sangre pero sin cambios en insulina en plasma y un incremento de 20% en los ácidos grasos libres en plasma en comparación con los niveles de control. La respuesta de liberación de insulina de los islotes pancreáticos al secretagogo fue comprobada *in vitro*. La liberación de insulina de los islotes incubados estimulada por glucosa (8 y 15 mM), arginina (10 mM) y acetilcolina (10 μ M) fue en cada caso 3-4 veces superior en los grupos tratados en comparación con la de los controles ($P < 0,05$). Contrariamente, la liberación de insulina inducida por secretagogo de los islotes incubados de ratones alimentados en paralelo fue similar a la de los controles. Además, un tratamiento similar a BC/SKF no tuvo efectos en ratones normales. La adición de BC/SKF directamente al tampón de incubación de los islotes no incrementó la liberación de insulina de los islotes de ratones db/db. Estos resultados demuestran que BC/SKF facilitado *in vivo* aumenta notablemente la función de los islotes en los ratones db/db pero no en los ratones normales. Este efecto no es atribuible a la acción directa sobre la función de los islotes o a la inhibición de alimentación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. La utilización de agonista D₁ de dopamina SKF38393 y un agonista D₂ de dopamina para la preparación combinada para modificar o regular al menos uno de un trastorno del metabolismo de glucosa o de lípidos, donde la preparación combinada es eficaz para mejorar al menos uno de los siguientes índices metabólicos de lípidos y glucosa: peso corporal, grasa corporal, insulina en plasma, glucosa en plasma y lípidos en plasma, y lipoproteínas en plasma, y donde el agonista D₂ de dopamina es un alcaloide de ergot.
- 10 2. La utilización de la reivindicación 1, donde el agonista D₂ es un alcaloide de ergot seleccionado del grupo que consiste en 2-bromo-alfa-ergocriptina, 6-metil-8 beta-carbobenciloxiaminoetil-10-alfa-ergolina, 8-acilaminoergolina, pergolida, lisurida, 6-metil-8-alfa-(N-acil)amino-9-ergolina, 6-metil-8-alfa-(N-fenil-acetil)amino-9-ergolina, ergocomina, 9,10-dihidroergocomina, y ergolinas D-2-halo-6-alquil-8-sustituidas, D-2-bromo-6-metil-8-cianometilergolina.
- 15 3. La utilización de la reivindicación 2, donde el alcaloide de ergot comprende bromocriptina.
4. La utilización de la reivindicación 1, donde el agonista D₂ es para la administración en un momento predeterminado del día.
- 20 5. La utilización de la reivindicación 4, donde el agonista D₁ es para la administración aproximadamente en el mismo momento que el agonista D₂.
- 25 6. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho agonista D₁ de dopamina se selecciona del grupo que consiste en SKF 38393, dihidrexidina, SKF 75670, SKF 82957, A77636, A68930, SKF 82526 (fenoldopam), y trans-10,11-dihidroxi 5,6,6a,7,8,12b-hexahidro racémico.
- 30 7. Una preparación combinada que comprende un agonista D₁ y un agonista D₂ para su uso en la modificación o regulación de al menos uno de los trastornos del metabolismo de glucosa o lípidos, donde la preparación es suficiente para mejorar al menos uno de los siguientes índices metabólicos de lípidos y glucosa: peso corporal, grasa corporal, insulina en plasma, glucosa en plasma y lípidos en plasma, y donde el agonista D₂ de dopamina es un alcaloide de ergot.
- 35 8. La preparación combinada para su utilización de acuerdo con la reivindicación 7, donde el agonista D₂ es un alcaloide de ergot seleccionado del grupo que consiste en 2-bromo-alfa-ergocriptina, 6-metil-8-beta-carbobenciloxiaminoetil-10-alfa-ergolina, 8-acilaminoergolina, pergolida, lisurida, 6-metil-8-alfa-(N-acil)-amino-9-ergolina, 6-metil-8-alfa-(N-fenil-acetil)amino-9-ergolina, ergocomina, 9,10-dihidroergocomina, y ergolinas D-2-halo-6-alquil-8-sustituidas, D-2-bromo-6-metil-8-cianometilergolina.
- 40 9. La preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el alcaloide de ergot comprende bromocriptina.
10. La preparación combinada para su utilización de acuerdo con la reivindicación 7, donde el agonista D₂ es para la administración en un momento predeterminado del día.
- 45 11. La preparación combinada para su utilización de acuerdo con la reivindicación 10, donde el agonista D₁ es para la administración aproximadamente al mismo tiempo que el agonista D₂.
12. La preparación combinada para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde dicho agonista D₁ de dopamina se selecciona del grupo que consiste en SKF 38393, dihidrexidina, SKF 75670, SKF 82957, A77636, A68930, SKF 82526 (fenoldopam), y trans-10,11-dihidroxi 5,6,6a,7,8,12b-hexahidro racémico.

FIG. 1

Pérdida de peso notable en el grupo con BC + SKF vs control después de 2 semanas de tratamiento

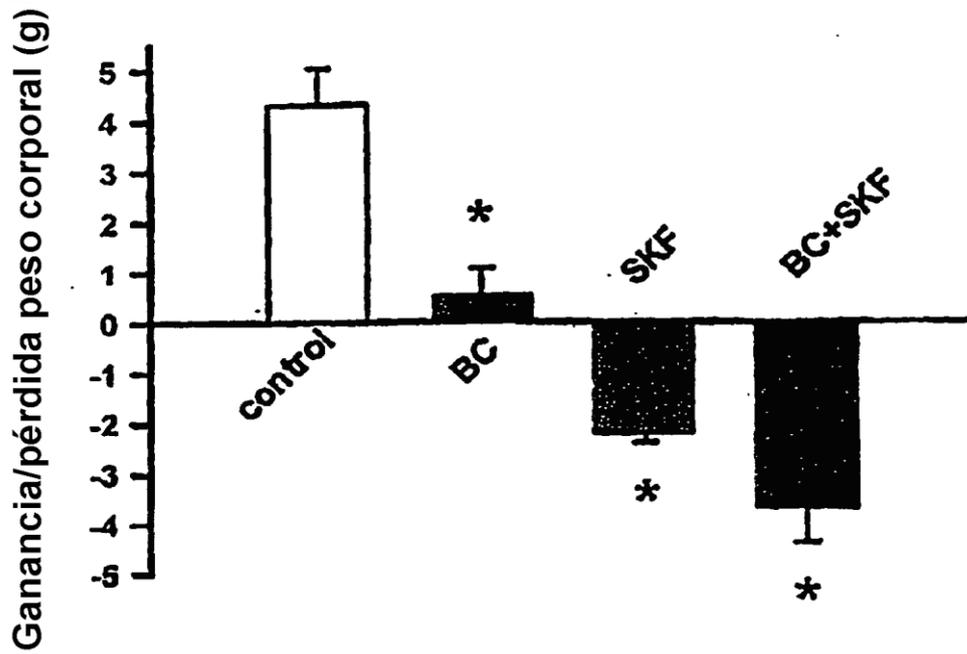
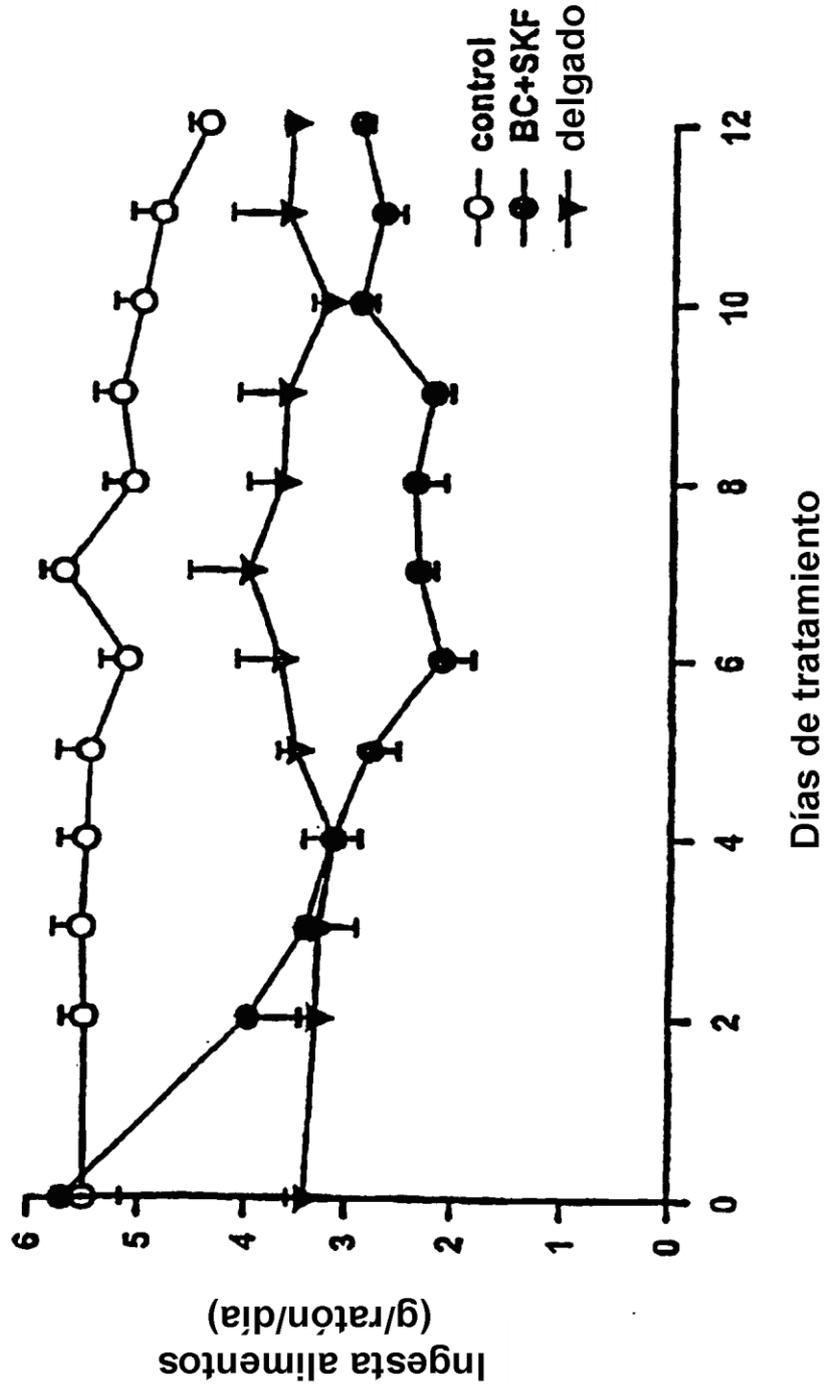


FIG. 2
El tratamiento con BC + SKF reduce notablemente la ingesta de alimento en ratones Ob/Ob

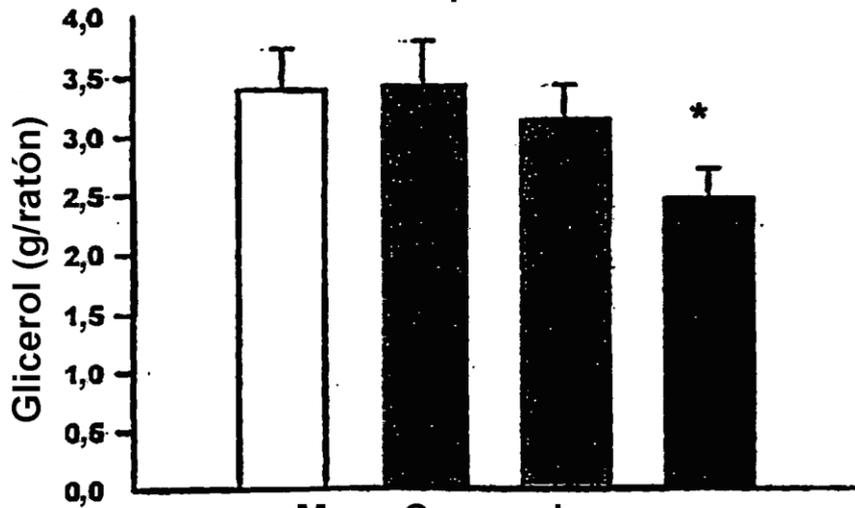


El tratamiento con BC + SKF reduce selectivamente la masa corporal grasa (27%) después de 2 semanas de tratamiento

FIG. 3

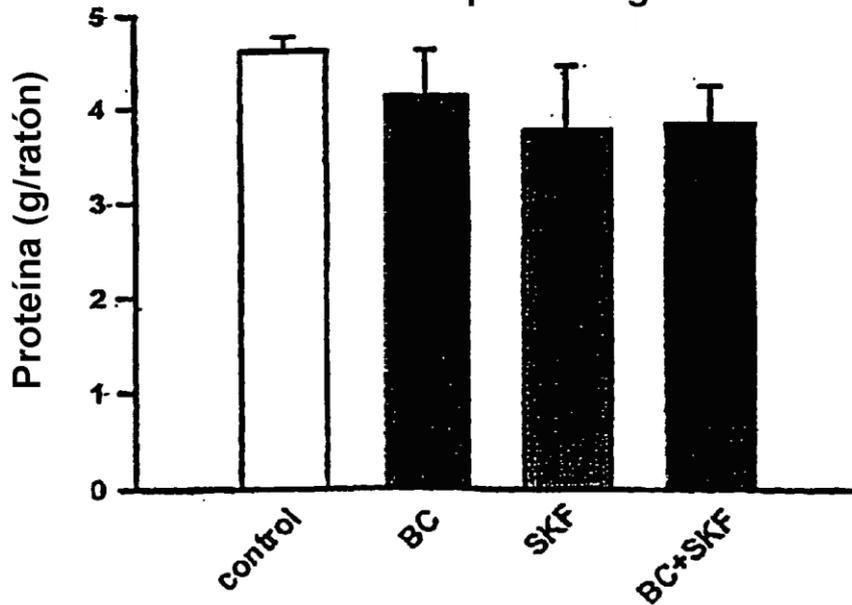
Masa Corporal Grasa

FIG. 3A



Masa Corporal magra

FIG. 3B



El tratamiento con BC + SKF reduce los niveles de glucosa en sangre e Insulina (40%)

FIG. 4

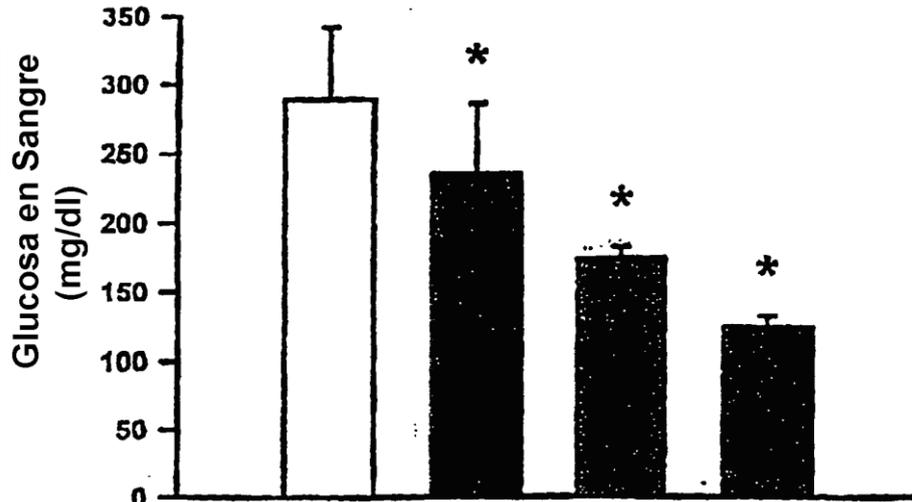


FIG. 4A

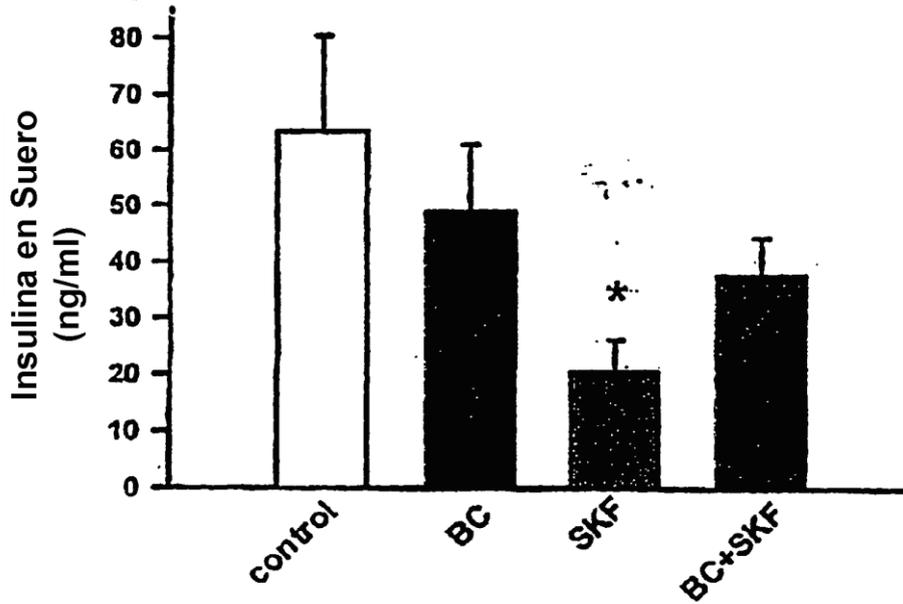
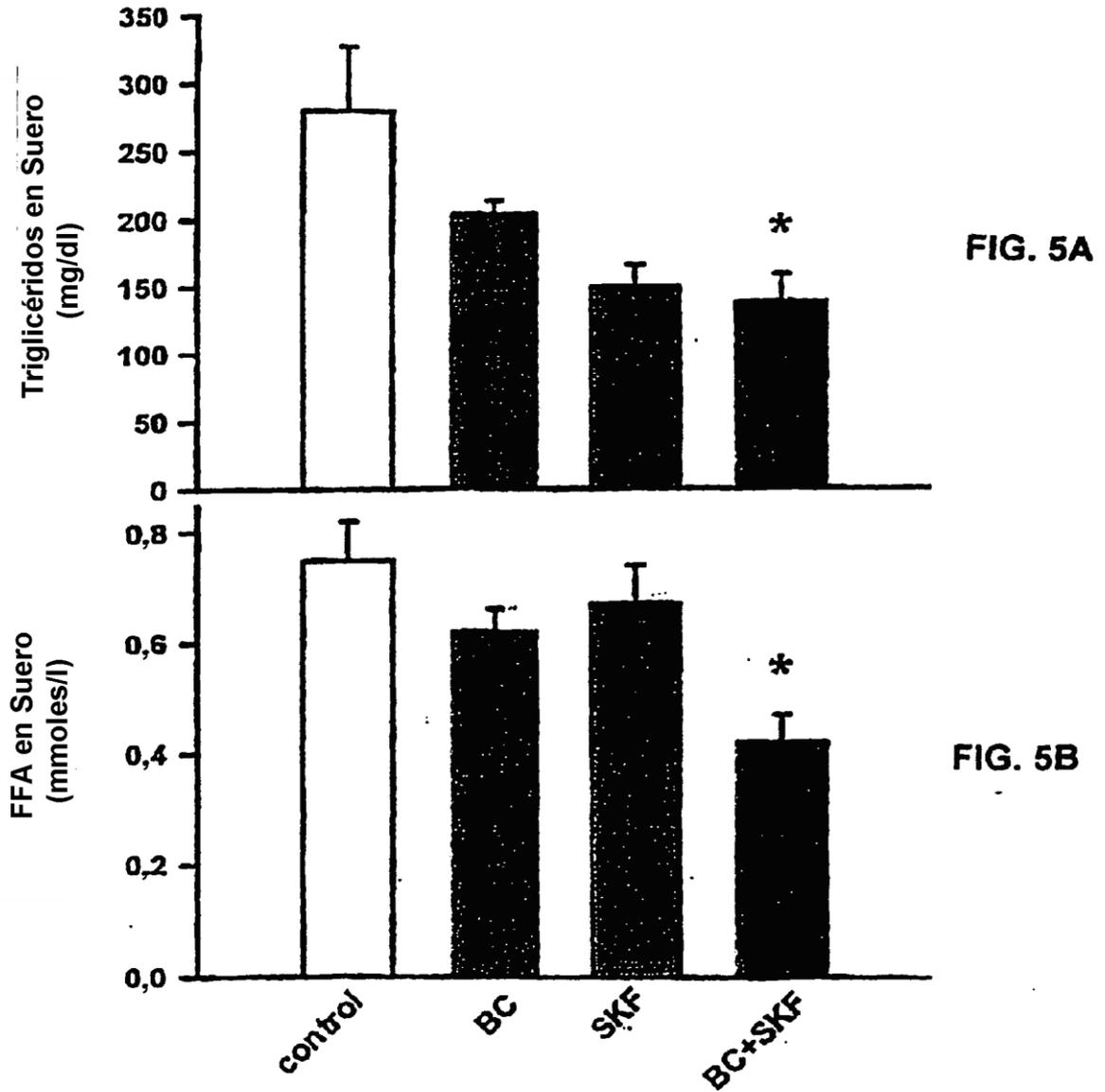


FIG. 4B

Dos semanas de tratamiento con BC+SKF reducen significativamente los niveles de Triglicéridos (50%) y Ácidos Grasos Libres (44%)

FIG. 5



4 horas después del inicio de la iluminación (pico de lipólisis en ratón) la reducción de glucosa en sangre, los triglicéridos y los ácido grasos es más pronunciada

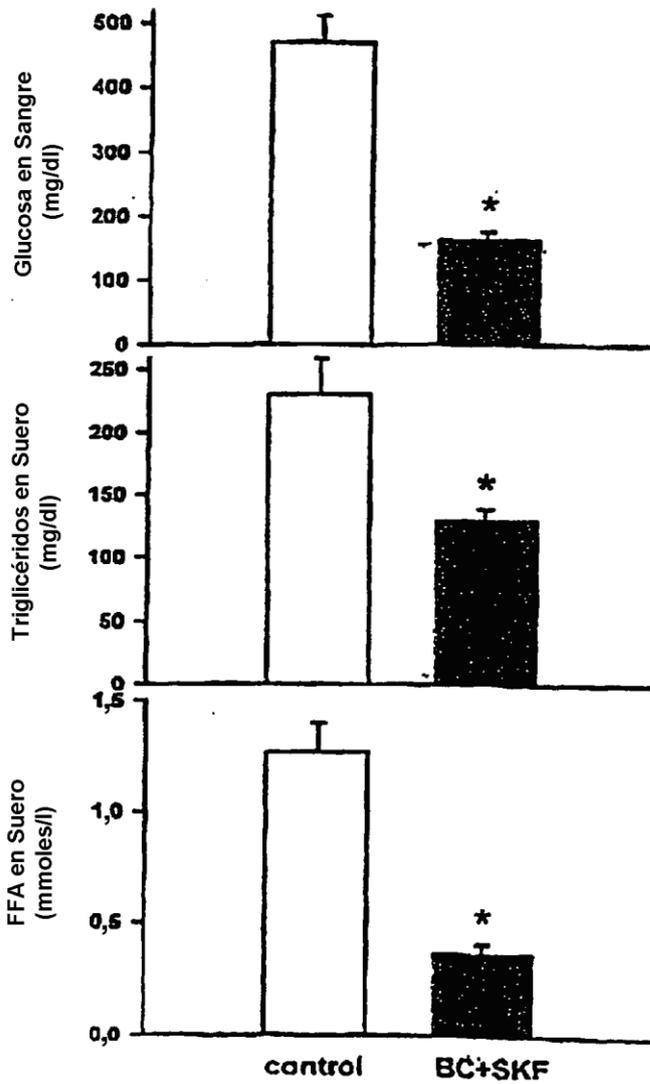


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

El tratamiento con BC + SKF reduce la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la producción de glucosa en el hígado

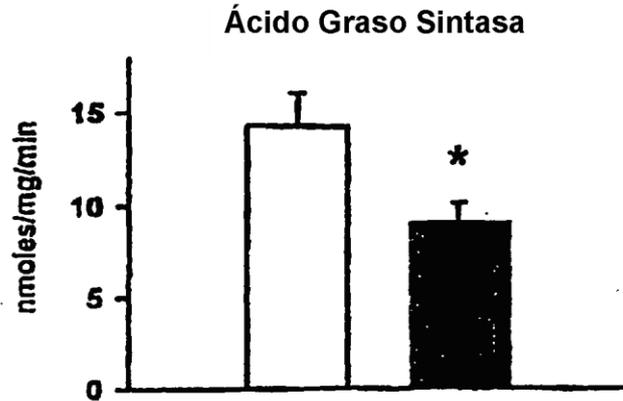


FIG. 7A

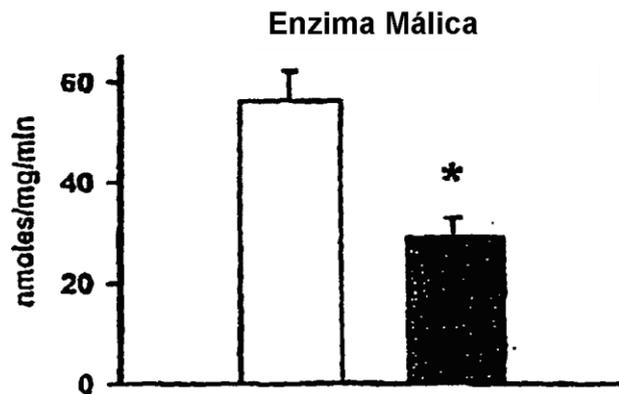


FIG. 7B

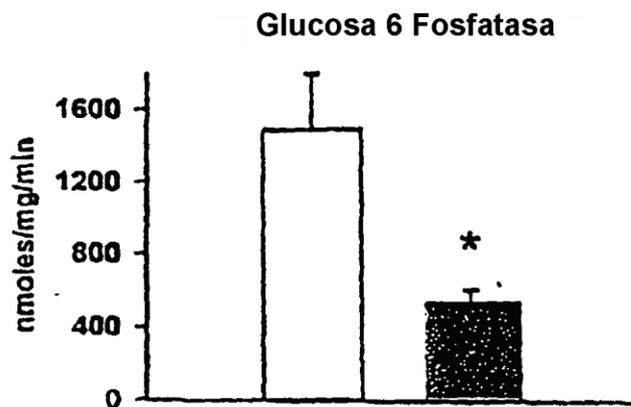
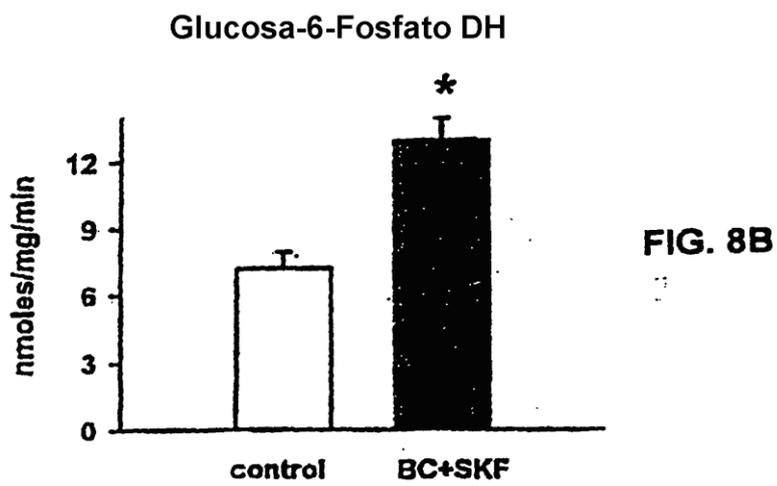
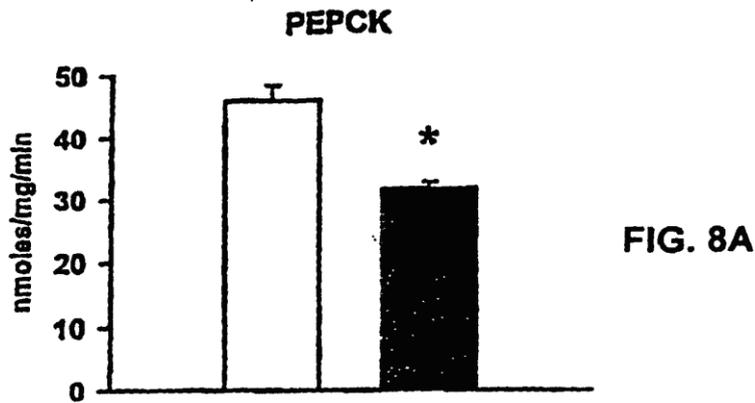


FIG. 7C

Reducción por BC + SKF de la actividad enzimática en el hígado



El tratamiento con BC + SKF reduce la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo

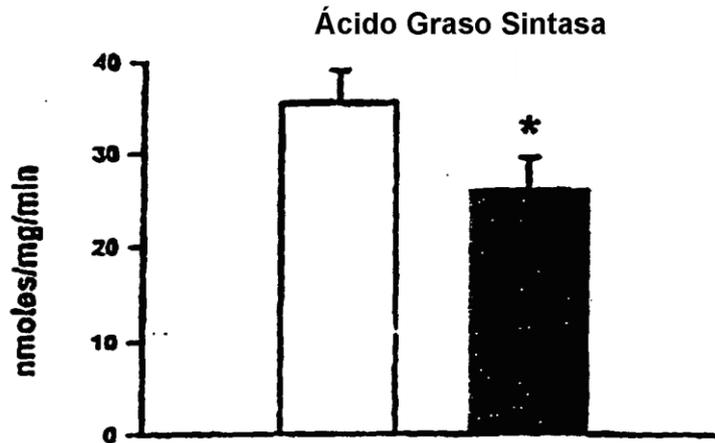


FIG. 9A

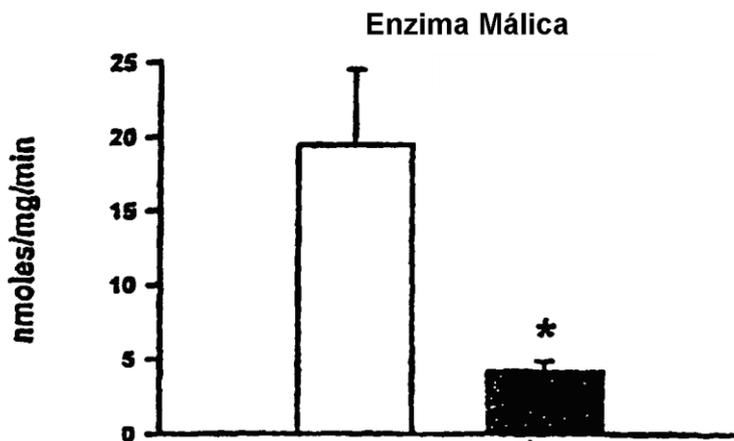


FIG. 9B

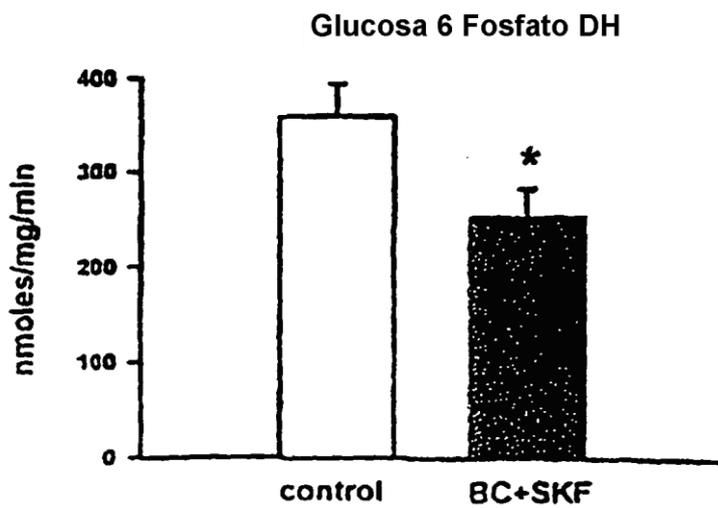


FIG. 9C

El tratamiento con BC + SKF no altera el transporte de glucosa ni su oxidación a CO₂ en adipocitos aislados

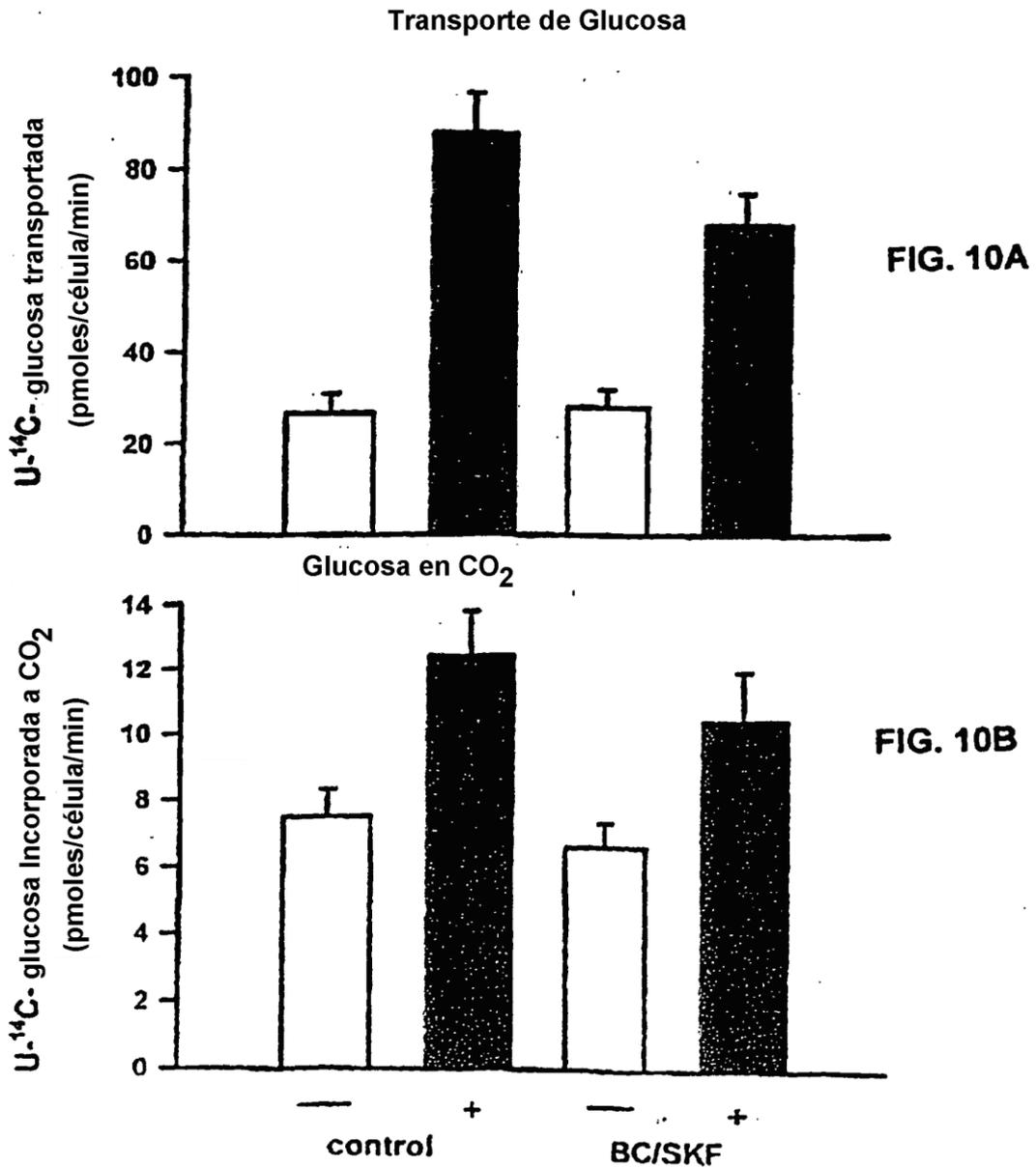
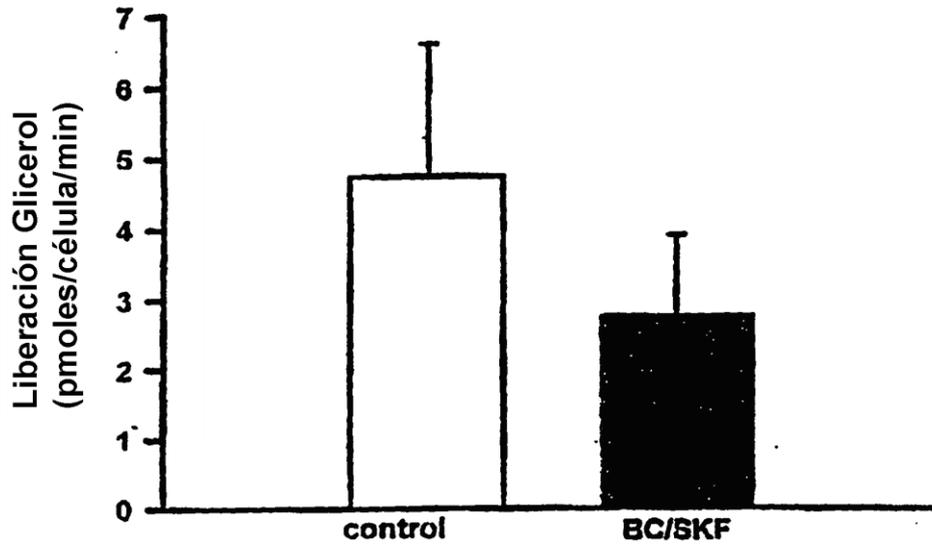


FIG. 11
El tratamiento con BC + SKF disminuye la lipólisis
en adipocitos aislados



El tratamiento con BC + SKF bloquea el pico nocturno en la lipogénesis adiposa

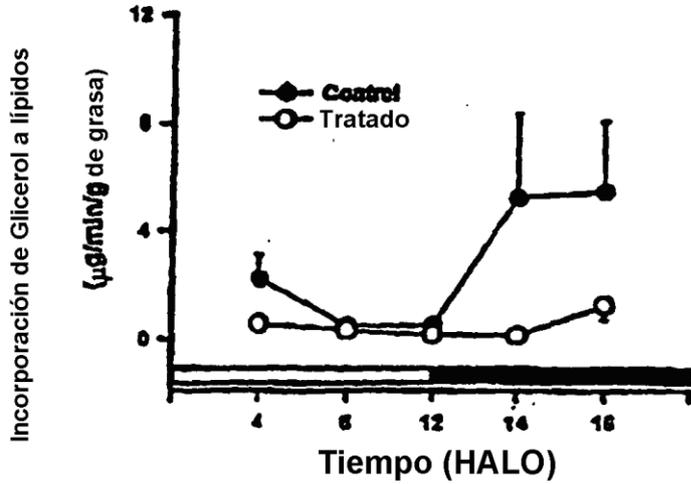


FIG. 12A

El tratamiento con BC + SKF reduce la actividad LPL en tejido adiposo

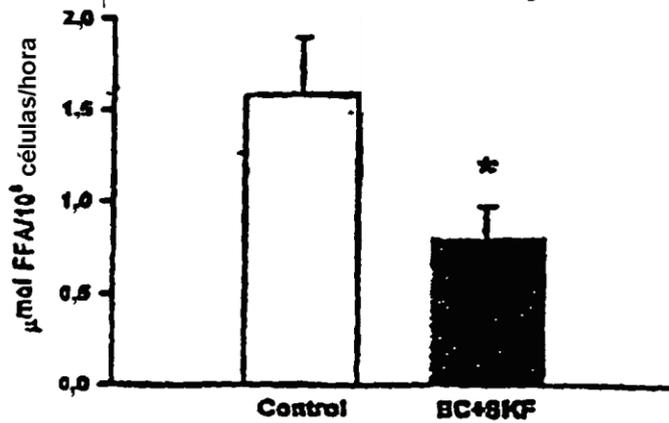


FIG. 12B

Reducción Significativa en las Dimensiones de los Adipocitos tras el Tratamiento con SC+SKF FIG. 13

control



FIG. 13A

μg lípido/célula

1,17 \pm 0.05

BC+SKF

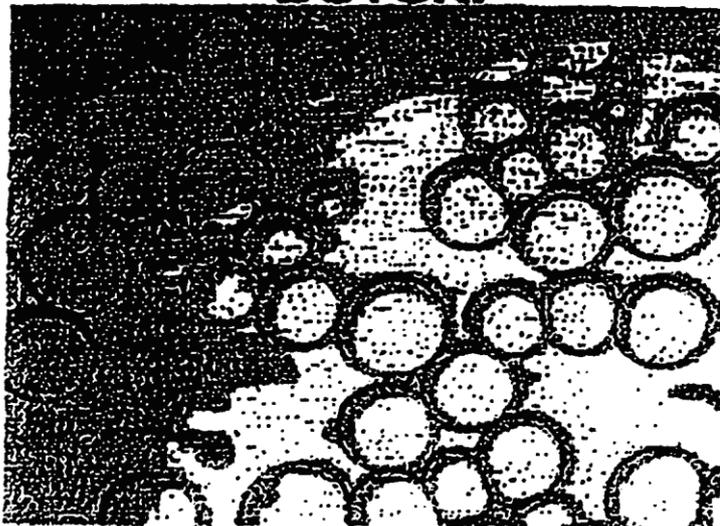


FIG. 13B

0,74 \pm 0.03

FIG. 14

Hibridación *in situ* para ARNm de NPY
en los Núcleos Arqueados

Ob/Ob Control



FIG. 14A

Ob/Ob BC+SKF



FIG. 14B

Control C57BL/6J Delgado



FIG. 14C

FIG. 15

Los niveles de ARNm de NPY en el núcleo arqueado de ratones obesos disminuyó 31% tras el tratamiento con BC + SKF pero todavía fueron 2 veces superiores en comparación con los controles delgados

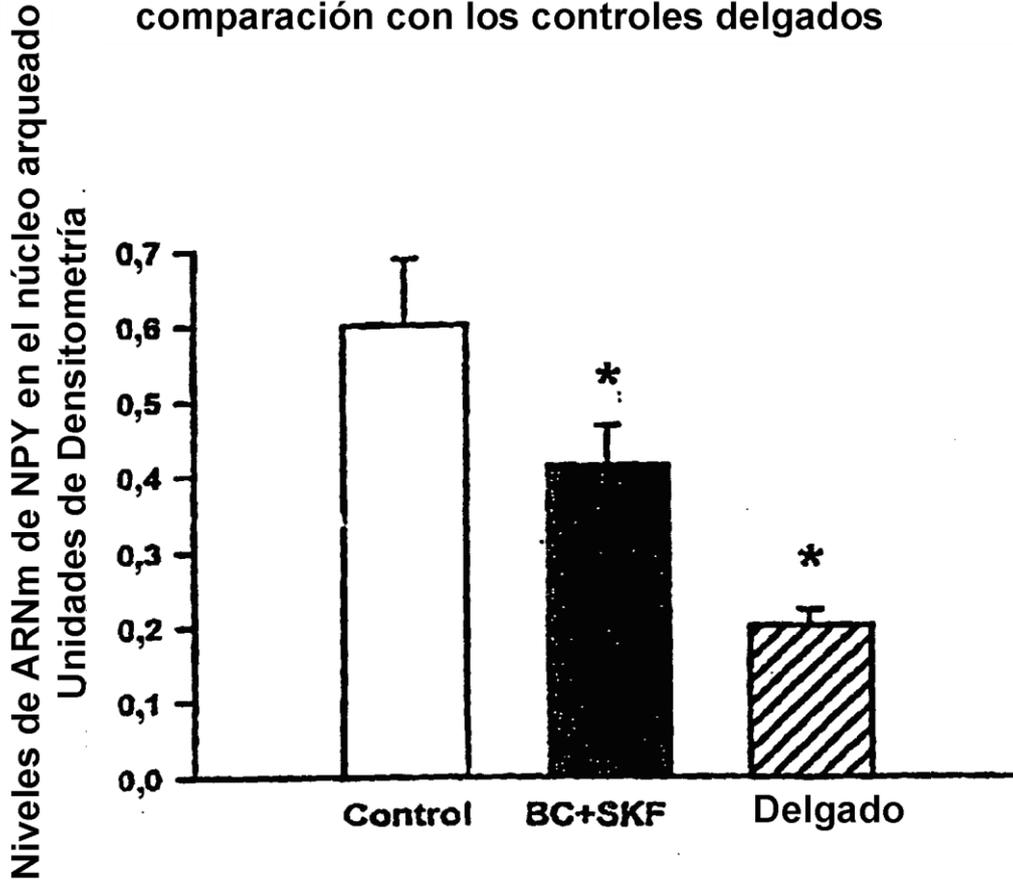


FIG. 16

