

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 073**

21 Número de solicitud: 201131311

51 Int. Cl.:

**A61K 38/57** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.07.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.02.2013**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**NOGUEIRAS POZO, Rubén ;  
DIÉGUEZ GONZÁLEZ, Carlos ;  
VÁZQUEZ VILLAR, María Jesús ;  
WILLIAMS, Lynda ;  
MÜLLER, Michael y  
DE ROOS, Baukje**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **MÉTODO PARA INHIBIR EL APETITO.**

57 Resumen:

Método para inhibir el apetito.

La presente invención se relaciona con el empleo de agonistas del receptor nuclear Nur77, en particular, la proteína SerpinA3, para inhibir o reducir el apetito, siendo utilizada en la regulación de la ingesta de alimentos y en el tratamiento de la obesidad y enfermedades asociadas con la obesidad.

**ES 2 396 073 A1**

## DESCRIPCIÓN

Método para inhibir el apetito

### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el empleo de agonistas del receptor nuclear Nur77, en particular, la proteína SerpinA3, para inhibir o reducir el apetito, siendo utilizada en la regulación de la ingesta de alimentos y en el tratamiento de la obesidad y enfermedades asociadas con la obesidad.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

#### *Proteína SerpinA3*

La proteína  $\alpha$ 1-antiquimotripsina o SerpinA3 (también conocida por ACT, AACT, GIG24, GIG25, MGC88254) es un miembro de la familia de inhibidores de la serina proteasa que se sintetiza principalmente en el hígado. La SerpinA3 está involucrada en la respuesta inflamatoria (incrementado sus niveles durante la fase aguda), y en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, en donde el factor nuclear-kB, AP-1 y la señal del transductor y activador de la transcripción 3 (STAT3) regulan la expresión de SerpinA3 en astrocitos [Zhang S & Janciauskiene S (2002) J Alzheimer Dis 4, 115–122]. Otras investigaciones relacionan a la proteína SerpinA3 con la probabilidad de sufrir apendicitis aguda, sugiriendo el empleo de esta proteína como biomarcador para diagnosticar apendicitis sin necesidad de emplear procedimientos exploratorios invasivos (solicitud de patente WO2010/078411).

#### *Receptor nuclear Nur77*

El receptor nuclear Nur77 (también denominado NR4A1, TR3, NGFI-B, NAK1, HMR) es un miembro de la familia NR4A, involucrado en la proliferación celular, apoptosis, inflamación y el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, diversos autores han puesto de manifiesto la relación entre el receptor nuclear Nur77 y el metabolismo energético. Maxwel, M.A. *et al.*, (2005) [The Journal of Biological Chemistry, 280(13): 12573-12584] describen la interferencia entre las rutas de señalización de los receptores nucleares (por ejemplo, Nur77) y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR), sugiriendo que Nur77 modula la expresión de genes que son reguladores clave en la homeostasis energética y lipídica del músculo esquelético. Chao, L.C., *et al.* (2009) [Diabetes, 58:2788-96] describen la activación del neuropéptido anorexigénico POMC por el receptor nuclear Nur77, de forma que los ratones deficientes en este receptor cuando son alimentados con una dieta alta en grasas durante 3 meses, son más obesos y más resistentes a la insulina que los ratones normales.

*Regulación del peso corporal y la obesidad*

El sobrepeso y la obesidad representan el problema nutricional más habitual en los países desarrollados. Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en el mundo más de 300 millones de adultos son obesos. En general, la ingesta energética que sobrepasa al gasto de ésta durante un tiempo más prolongado, da lugar a una ganancia ponderal anormal, que conduce, en primer lugar, al sobrepeso, y a continuación, a la obesidad. En el caso de adultos, el sobrepeso se caracteriza por un índice de masa corporal de 25-30 kg/m<sup>2</sup>, mientras que un índice de masa corporal superior a 30 kg/m<sup>2</sup> indica obesidad.

Los problemas médicos causados por el sobrepeso y la obesidad son graves, y a menudo amenazan la vida e incluyen diabetes, falta de aire, enfermedad de la vesícula biliar, hipertensión, niveles elevados de colesterol en sangre, cáncer, artritis, otros problemas ortopédicos, esofagitis de reflujo (ardor), ronquidos, apnea del sueño, irregularidades menstruales, infertilidad y problemas de corazón. Por otra parte, la obesidad y el sobrepeso aumentan sustancialmente el riesgo de morbilidad a partir de hipertensión, dislipidemia, diabetes de tipo 2, enfermedad cardíaca coronaria, apoplejía, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis y cánceres de endometrio, mama, próstata, y de colon. Los pesos corporales elevados también están asociados con incrementos en la mortalidad por todas las causas. La mayoría o todos estos problemas son aliviados o mejorados por una pérdida de peso significativa permanente. La longevidad aumenta asimismo significativamente mediante una pérdida de peso significativa permanente.

Los tratamientos de pérdida de peso varían dependiendo, al menos en parte, del grado de pérdida de peso que se intenta obtener en un sujeto así como de la gravedad del sobrepeso u obesidad mostrados por el sujeto. Por ejemplo, los tratamientos tales como dietas con un bajo contenido de grasas y ejercicio regular son a menudo adecuados en los casos en los que un sujeto tiene solamente un sobrepeso suave. Tales tratamientos pueden ser intensificados mediante el uso controlado de supresores del apetito a la venta incluyendo cafeína, efedrina y fenilpropanolamina (Acutrim®, Dexatrim®). Por otra parte, las medicaciones prescritas que incluyen anfetamina, dietilpropion (Tenuato®), mazindol (Manazor® Sanorex®), fentermina (Fastin® o Ionamin®), fenmetrazina (Preludin®), fendimetrazina ( Bontrol® , Plegine®, Adipost®, Dital®, Dyrexan®, Melfiat®, Prelu-2®, Rexigen Forte®), benfetamina (Didrex®) y fluoxetina (Prozac®) se utilizan a menudo en el tratamiento de los sujetos o pacientes con sobrepeso y obesidad graves. La solicitud de patente WO2008/150191 describe un agente medicinal anorexigénico (tetrindol) o sus sales farmacéuticamente aceptables para controlar la masa corporal, así como la composición farmacéutica que lo contiene. No obstante, tales tratamientos, como mucho, producen solamente

una pérdida de peso de aproximadamente 5-10% (cuando se acompañan de dieta y ejercicio), aunque se ha demostrado que la mayoría de estos tratamientos son inadecuados debido a que son peligrosos, ineficaces o pierden rápidamente su efecto anoréxico.

Otros métodos de tratamiento van dirigidos a inhibir distintas proteínas y/o enzimas involucradas en el metabolismo de las grasas. La solicitud de patente WO2009/071601 describe inhibidores de enteropeptidasa y su empleo en el tratamiento de la obesidad, sobrepeso y/o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de las grasas.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos tratamientos para la pérdida de peso, más eficaces y que estén acompañados por menos efectos secundarios adversos o no deseados o menos efectos secundarios graves.

### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han descubierto que la proteína SerpinA3, actuando a través del receptor nuclear Nur77, tiene la capacidad de reducir o inhibir el apetito cuando es administrada a un individuo. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir o inhibir el apetito, de aquí en adelante método para inhibir o reducir el apetito de la invención, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agonista del receptor nuclear Nur77.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agonista del receptor nuclear Nur77 en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad, o de una enfermedad asociada con la obesidad, en un sujeto, en donde dicho agonista actúa reduciendo o inhibiendo el apetito de dicho sujeto.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una representación gráfica de la ingesta de alimentos (gramos) a lo largo del tiempo (horas) de ratones a los que se les ha administrado la proteína SerpinA3 a distintas dosis.

La **Figura 2** es una representación gráfica de la ingesta de alimentos (gramos) en ratones silvestres (*wild type*) y ratones deficientes para el receptor nuclear Nur77 (Nur77 KO), tras la administración de SerpinA3 (barras negras) o de suero salino (barras blancas). El efecto anorexigénico de la SerpinA3 desaparece en los ratones deficientes para Nur77.

La **Figura 3** muestra la fórmula química de agonistas del receptor nuclear Nur77; **A.**- 6-mercaptopurina; **B.**- prostaglandina A2; **C.**- Citosporona B; **D.**- derivados de 1,1-di(3'-indolil)-1-(p-fenil sustituido)metano; **E.**- derivados de isoxazolipiridiona, y **F.**- derivados de benzimidazoles.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Los inventores de la presente invención han descubierto que la proteína SerpinA3 tiene la capacidad de inhibir el apetito cuando es administrada a un individuo, es decir, tiene efecto anorexigénico, y que además ejerce su acción inhibidora a través del receptor nuclear Nur77, revelando la implicación de dicho receptor en la regulación de la ingesta de alimentos, función desconocida hasta este momento.

Para desarrollar la presente invención, los inventores inyectaron de manera intracerebroventricular la proteína SerpinA3 a ratones y midieron la dosis- y tiempo-respuesta (Ejemplo 1). Como resultado, observaron que la administración de la proteína SerpinA3 disminuye la ingesta de comida. Por otro lado, los inventores observaron que, cuando la proteína SerpinA3 es administrada a ratones deficientes para el receptor Nur77 (Ejemplo 2), el efecto de la proteína SerpinA3, es decir, la inhibición de la ingesta de alimentos, desaparece, indicando que la proteína SerpinA3 inhibe la ingesta a través de dicho receptor.

En base a este descubrimiento los inventores han desarrollado los siguientes aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

Método para reducir o inhibir el apetito

Los inventores de la presente invención han descubierto que la proteína SerpinA3, actuando a través del receptor nuclear Nur77, tiene la capacidad de reducir o inhibir el apetito cuando es administrada a un individuo. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir o inhibir el apetito, de aquí en adelante método para inhibir o reducir el apetito de la invención, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agonista del receptor nuclear Nur77.

En la presente invención se entiende por “reducción o inhibición del apetito” a la disminución de la gana de comer o del impulso instintivo de comer, disminuyendo así la cantidad de alimentos ingerida por un sujeto.

Los términos “sujeto” o “individuo” son sinónimos y pueden emplearse indistintamente a lo largo de la presente descripción. Dichos términos, tal como aquí se utilizan, hacen referencia a un miembro de cualquier especie animal, entre los que se incluyen, pero no se limita a, mamíferos, en particular, ganado vacuno (vacas, toros, bueyes, yaks, etc.), ganado ovino (ovejas, etc.), ganado porcino (cerdos, jabalíes, etc.), ganado caprino (cabras, etc.), ganado equino o caballar (caballos, yeguas, cebras, etc.), camélidos (camellos, llamas, alpacas, etc.), conejos, liebres, bisontes, búfalos, ciervos, renos, venados, caribús, perros, gatos, ratones, primates no humanos (chimpancés, gorilas,

orangutanes, macacos, gibones, etc.) y humanos. En una realización particular, el sujeto es un sujeto cuyo peso debe ser controlado. En otra realización particular, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza, preferiblemente, un ser humano que desee reducir su peso bien por problemas de salud, o bien que desee mantener su peso o reducirlo por necesidades estéticas o deportivas. En una realización más concreta, dicho sujeto, por ejemplo, un ser humano, es un sujeto sano.

En el contexto de la presente invención se entiende por “cantidad eficaz” a la cantidad de principio activo (e.i., agonista del receptor nuclear Nur77) necesaria para conseguir el efecto deseado, es decir, reducir o inhibir el apetito de un sujeto. La cantidad de dicho principio activo que puede usarse en el método para inhibir o reducir el apetito de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, la cantidad eficaz del principio activo a administrar dependerá, entre otros factores, del tipo de compuesto que va a ser administrado, del sujeto que va a ser tratado, de su edad, de su estado fisiológico, de la forma de administración elegida, de la vía y la frecuencia de administración del principio activo, etc.

La dosificación de los compuestos diaria eficaz para contener el apetito se encontrará normalmente entre 10  $\mu\text{g}$  y 30  $\mu\text{g}$  hasta 5 mg/día, preferentemente, desde entre 10  $\mu\text{g}$  y 30  $\mu\text{g}$  hasta 2 mg/día, y más preferentemente entre 10  $\mu\text{g}$  y 100  $\mu\text{g}$  hasta 1 mg/día, en el caso más preferente entre 30  $\mu\text{g}$  hasta 500  $\mu\text{g}$ /día por 70 kg de sujeto. La dosis exacta a administrar la determina el médico adjunto dependiendo de la eficacia, de dónde se encuentra el compuesto en particular dentro de los intervalos indicados anteriormente, de la edad, el peso o la condición del paciente. La administración ha de empezar cuando se desee contener la ingesta alimenticia o perder peso.

El receptor nuclear Nur77 (también denominado por las siglas NR4A1, TR3, NGFI-B, NAK1, HMR) es un miembro de la familia NR4A. El receptor nuclear Nur77 consiste en (i) una función 1 de transactivación del amino-terminal (AF1) cerca del amino-terminal; (ii) un dominio de unión al ADN del núcleo (DBD) localizado cerca del centro de la proteína, que contiene dos motivos de dedos de zinc altamente conservados y que se une a secuencias específicas de ADN; (iii) una región bisagra que proporciona flexibilidad a la proteína para permitir la dimerización del receptor y la unión al ADN; (iv) un dominio conservado de unión a ligando (LBD) cerca del extremo carboxilo terminal; y (v) una función 2 de activación carboxi-terminal (AF2) cerca del extremo carboxilo terminal que permite la activación de la transcripción dependiente de ligando. Como entiende el experto en la materia, dentro del término “receptor nuclear Nur77” o simplemente “Nur77” (empleados indistintamente en la presente invención) se incluyen todas las variantes funcionalmente equivalentes de Nur77 que se encuentran presentes en las distintas especies de animales.

Preferiblemente, dicho término hace referencia al receptor nuclear Nur77 humano (hNur77) con número de acceso a GenBank (NCBI): NP\_775180.

GenBank NP\_775180 (hNur77) [SEQ ID NO: 1]

```

5  MPCIQAQYGT PAPSPGPRDH LASDPLTPEF IKPTMDLASP EAAPAAPTAL PSFSTFMDGY
   TGEFDTFLYQ LPGTVQPCSS ASSSASTSS SSATSPASAS FKFEDFQVYG CYPGPLSGPV
   DEALSSSGSD YYGSPCSAPS PSTPSFQPPQ LSPWDGSGFH FSPSQTYEGL RAWTEQLPKA
   SGPPQPPAFF SFSPTGPSP SLAQSPKLF PSQATHQLGE GESYSMPTAF PGLAPTSPHL
   EGGILDTPV TSTKARSGAP GGSEGRCAVC GDNASCQHYG VRTCEGCKGF FKRTVQKNAK
10 YICLANKDCP VDKRRRNRCQ FCRFQKCLAV GMVKEVVRTD SLKGRRRLP SKPKQPPDAS
   PANLLTSLVR AHLDSGPSTA KLDYSKFQEL VLPFHFKEDA GDVQQFYDLL SGSLEVIRKW
   AEKIPGFAEL SPADQDLLE SAFLELFILR LAYRSKPGEG KLIFCSGLVL HRLQCARGFG
   DWIDSILAFS RSLHSLLDV PAFACLSALV LITDRHGLQE PRRVEELQNR IASCLKEHVA
   AVAGEQPAS CLSRLLGKLP ELRTLCTQGL QRIFYLKLED LVPPPPIIDK IFMDTLPF

```

15 En la presente invención se entiende por “variante funcionalmente equivalente de Nur77”, una proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de Nur77 (SEQ ID NO: 1) y (ii) realiza la/s misma/s función/es que Nur77. La similitud funcional de una proteína con otra concreta puede determinarse mediante ensayos de interferencia con la expresión del gen que codifica la proteína concreta que, al reducir la expresión,

20 reducirían la actividad de esa proteína, y la posterior recuperación de la actividad mediante expresión de la secuencia de la otra proteína. Estos experimentos se realizan utilizando secuencias de ARNs de interferencia específicas y complementarias para la secuencia del ARNm de la proteína concreta, y vectores de expresión que incorporen la secuencia específica de la otra proteína regulada por un promotor inducible o no.

25 Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos

30 secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10].

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de Nur77 que

35 dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la

funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes también caen dentro del contexto de la presente invención, así como aquellas variantes funcionalmente equivalentes de Nur77 que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a Nur77 y conserven, además, las mismas funciones que Nur77. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, dentro del término “variante funcionalmente equivalente de Nur77” también se incluyen fragmentos de la proteína Nur77 que conservan al menos una de las funciones desempeñadas por Nur77. Ensayos adecuados para determinar si una proteína es una variante funcionalmente equivalente del receptor nuclear Nur77 incluyen, pero no se limitan a, ensayos de transactivación en líneas celulares de cáncer, en los que agonistas de la variante del receptor nuclear Nur77 se unen a dicha variante e inducen la expresión de TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) y la escisión de PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) (Chintharlapalli, S. *et al.* 2005. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26): 24903-24914; Cho, S. *et al.* 2007. *Cancer Research*, 67(2): 674-683).

#### 15 *Agonistas del receptor nuclear Nur77*

El término “agonista”, según se emplea en la presente invención, se refiere a cualquier molécula que promueve, facilita o aumenta la actividad o función de una entidad biológica. Por lo tanto, “un agonista del receptor nuclear Nur77” se refiere a cualquier molécula que promueve, facilita o aumenta la actividad o función del receptor nuclear Nur77, es decir, inhibe el apetito de un sujeto cuando es administrado a dicho sujeto. Existe una amplia variedad de ensayos disponibles para detectar la actividad de agonistas del receptor nuclear Nur77, como por ejemplo, ensayos de transactivación en líneas celulares de cáncer, en los que agonistas del receptor nuclear Nur77 se unen a dicho receptor e inducen la expresión de TRAIL y la escisión de PARP (Chintharlapalli, S. *et al.* 2005, citado *ad supra*; Cho, S. *et al.* 2007, citado *ad supra*).

25 En el contexto de la presente invención, las moléculas que promueven, facilitan o aumentan la actividad o función del receptor nuclear Nur77 pueden ser un ligando o un no-ligando del receptor nuclear Nur77. El término “ligando” significa cualquier compuesto o molécula capaz de unirse específicamente al receptor nuclear Nur77, y que al unirse promueve, facilita o aumenta la actividad o función del receptor nuclear Nur77 e incluye, pero no se limita a, péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, lípidos, azúcares, carbohidratos, moléculas asociadas o unidas a membrana, o complejos de los mismos, así como moléculas pequeñas. El término “no-ligando” hace referencia a un compuesto que no se une específicamente al receptor nuclear Nur77 pero que aumenta la



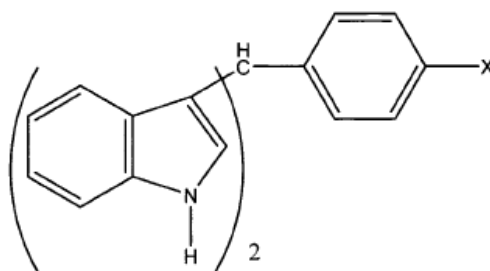
actividad biológica del mismo mediante un incremento de los niveles celulares del receptor nuclear Nur77 o una activación del receptor nuclear Nur77 a través de una modificación covalente, como por ejemplo, una fosforilación.

En la presente invención, “Moléculas pequeñas” se define como una molécula con un peso molecular que es inferior a 10 KDa, habitualmente inferior a 2 KDa, y preferiblemente inferior a 1 KDa. Entre las moléculas pequeñas se incluyen, pero no se limitan a, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radioactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptido y miméticos de anticuerpos.

10 Compuestos agonistas del receptor nuclear Nur77 incluyen (Figura 3), pero no se limitan a:

- Compuestos  $\beta$ -adrenérgicos, tal como isoprenalina y norepinefrina;
- Prostaglandina A2;
- Derivados de benzimidazoles;
- Derivados de isoxazolopiridona;

15 - Diindolilmetanos (WO2006023891), tal como diindolilmetanos metilen-sustituidos; 1,1-bis (3'-indolil)-1-(fenil p-sustituido) metanos que contienen sustituyentes trifluorometil, hidrógeno y metoxi, como por ejemplo, DIMS [Fórmula I], en donde X es hidrógeno, trifluorometoxi o metoxi.



[Fórmula I]

20

- 6 mercaptopurina (6-MP) (Pires, N.M. *et al.*, 2007. *Circulation*, 115:493-500)
- Citosporona B (Csn-B o cytosporone B) (Zhan, Y. *et al.* 2008. *Nat Chem Biol*, 4(9): 548-56) (Pearen MA & Muscat GE, 2010. *Mol Endocrinol*, 24:1891-903)
- Proteínas de unión a Nur77, como la proteína SerpinA3, anticuerpos agonistas del receptor nuclear Nur77, etc.

25

En las solicitudes de patente WO03/088812 y US2006/0223123 se describen métodos útiles en la identificación de agonistas del receptor nuclear Nur77.

*Anticuerpos agonistas del receptor nuclear Nur77*

Un agonista del receptor nuclear Nur77 para su uso en la presente invención puede ser un anticuerpo agonista del receptor nuclear Nur77. En la presente invención, se entiende por “anticuerpo agonista del receptor nuclear Nur77” todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al receptor nuclear Nur77, en particular, al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir la activación del mismo. Ensayos para detectar agonistas del receptor nuclear Nur77 han sido descritos en párrafos anteriores. Así, en una realización particular, el agonista del receptor nuclear Nur77 es un anticuerpo anti-receptor nuclear Nur77, el cuál puede ser de cualquier clase o subclase de inmunoglobulinas, tales como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

En la presente invención, el término “anticuerpo” ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos [F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFv, etc.], siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es decir, que sean capaces de unirse específicamente al receptor nuclear Nur77 o al dominio extracelular de dicho receptor. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitarse a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, por ejemplo en Köhler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and Lane [“Using Antibodies. A Laboratory Manual” de E. Harlow y D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante  
5 bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención con el receptor nuclear Nur77). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas  
10 presentadas en bibliotecas de fagos (*phage display*) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (*display*) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de  
15 las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR. Así, en una realización particular de la composición de la invención, al menos, un anticuerpo agonista anti-receptor nuclear Nur77 es un anticuerpo humanizado.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, dentro del término “anticuerpo” también se  
20 incluyen variantes con un patrón de glucosilación alterado, así como fragmentos de anticuerpos, obtenidos a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, glicosilados o no glicosilados, que pueden consistir (i) en zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), (ii) en la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), (iii)  
25 nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o (iv) cualquier modificación que se haga de los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que tengan capacidad de producir la activación del receptor nuclear Nur77.

Los anticuerpos agonistas del receptor nuclear Nur77 descritos en la presente invención pueden  
30 obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o recombinante, de producción de anticuerpos, de extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos, o por cualquier otra técnica convencional para la obtención de proteínas y anticuerpos las cuales, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Cuando los agonistas del receptor nuclear

Nur77 son anticuerpos, para su producción pueden utilizarse, sin que esto suponga limitación alguna, entre otras: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o “display” (*phage display*, *ribosome display*, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

- “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);
- “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

Métodos sobre cómo obtener anticuerpos específicos para el receptor nuclear Nur77 se describen en la solicitud de patente US2006/0223123.

### *Proteína SerpinA3*

La proteína SerpinA3 (también conocida por las siglas ACT, AACT, GIG24, GIG25 o MGC88254) es un miembro de la familia de inhibidores de la serina proteasa. Como entiende el experto en la materia, dentro del término “proteína SerpinA3” o “SerpinA3” se incluyen todas las variantes funcionalmente equivalentes de SerpinA3 que se encuentran presentes en las distintas especies de animales.

Por lo tanto, en una realización particular de la invención, el agonista de Nur77 se selecciona de entre la proteína SerpinA3 (en adelante, SerpinA3) o una variante funcionalmente equivalente de dicha SerpinA3, y un polinucleótido que codifica dicha SerpinA3 o dicha variante funcionalmente equivalente. Preferiblemente, dicho término hace referencia a la SerpinA3 humana (hSerpinA3) con número de acceso a GenBank (NCBI): AAH13189.1.

- SerpinA3 (*Homo sapiens*)

Secuencia aminoácidos:

GenBank: AAH13189.1 [SEQ ID NO: 2] serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3

```

5  SRFYLSKKKW VMVPMMSLHH LTIPYFRDEE LSCTVVELKY TGNASALFIL PDQDKMEEVE
  AMLLPETLKR WRDSLEFREI GELYLPKFSI SRDYNLNDIL LQLGIEEAFI SKADLSGITG
  ARNLAVSQVV HKAVLDVFEE GTEASAATAV KITLLSALVE TRTIVRFNRP FLMIIVPTDT
  QNIFFMASKVT NPKQA

```

Secuencia de nucleótidos:

10 GenBank: BC013189.1 [SEQ ID NO: 3] serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3

```

15  gtcaagggtc tacttgagca agaaaaagtg ggtaatggtg cccatgatga gtttgcata
  cctgactata ccttacttcc gggacgagga gctgtcctgc accgtggtgg agctgaagta
  cacaggcaat gccagcgcac tcttcatcct ccctgatcaa gacaagatgg aggaagtgga
  agccatgctg ctcccagaga ccctgaagcg gtggagagac tctctggagt tcagagagat
  aggtgagctc tacctgcca aagtttccat ctcgaggac tataacctga acgacatact
  tctccagctg ggcattgag aagccttcac cagcaaggct gacctgtcag ggatcacagg
  20  ggccaggaac cttagcagtct cccagggtgt ccataaggct gtgcttgatg tatttgagga
  gggcacagaa gcatctgctg ccacagcagt caaaatcacc ctctttctg cattagtgga
  gacaaggacc attgtgctgt tcaacaggcc cttcctgatg atcattgtcc ctacagacac
  ccagaacatc ttcttcatga gcaaagtcac caatccaag caagcctaga gcttgccatc
  aagcagtggg gctctcagta aggaacttgg aatgcaagct ggatgcctgg gtctctgggc
  acagcctggc cctgtgcac cgagtggcca tggcatgtgt ggccctgtct gcttatcctt
  25  ggaagggtgac agcgattccc tgtgtagctc tcacatgcac aggggccc atggactcttca
  gtctggaggg tctggggcct cctgacagca ataaataatt tcgttggaaa aaaaaaaaaa
  aa

```

En la presente invención se entiende por “variante funcionalmente equivalente de SerpinA3”, una  
30 proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de SerpinA3 (SEQ ID NO: 2) y (ii) realiza la/s misma/s función/es que SerpinA3, como por ejemplo, inhibir y/o reducir el apetito. Métodos adecuados para determinar la similitud entre dos proteínas y medir el grado de homología ya han sido descritos en párrafos anteriores, y ensayos para averiguar si una proteína dada realiza la misma función que la SerpinA3 incluyen, por  
35 ejemplo, ensayos de inhibición de serina proteasas como los descritos en Rubin H., 1990 (Journal biological Chemistry, 265(2): 1199-1207), o el ensayo realizado en el Ejemplo 1 de la presente solicitud, que consiste en administrar el compuesto a probar en un ratón y observar la reducción de la ingesta de alimentos.

Igualmente, el experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de  
40 SerpinA3 que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes también caen dentro del ámbito de la presente invención, así como aquellas variantes funcionalmente equivalentes de SerpinA3 que presenten sustituciones, inserciones, deleciones o modificaciones (glicosilaciones, fosforilaciones,

etc.) de uno o más aminoácidos respecto a SerpinA3 (SEQ ID NO: 2) y conserven, además, al menos una función de las funciones de SerpinA3. Por lo tanto, dentro del término “variante funcionalmente equivalente” también están incluidos fragmentos de SerpinA3 que conserven, además, al menos una función de las funciones de SerpinA3.

- 5 En el contexto de la presente invención, un agonista del receptor nuclear Nur77 también incluye un polinucleótido que codifica la SerpinA3 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Como entiende el experto en la materia, el polinucleótido que codifica dicha SerpinA3 puede estar incluido dentro de una construcción génica o dentro de un vector de expresión. En general, un vector de expresión comprende, además del polinucleótido que codifica la SerpinA3, un promotor
- 10 que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*tl2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (*enhancers*),
- 15 silenciadores transcripcionales (*silencers*), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (ADN o ARN), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la
- 20 célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por ejemplo, dicho vector puede ser un vector viral (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) o no viral (pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI) [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores pueden ser administrados directamente al
- 25 sujeto por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto receptor dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte
- 30 adversamente a la viabilidad de dichas células. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas – transformación química, electroporación, microinyección, etc. – descritos

en diversos manuales [Sambrook, J., *et al.* citado *ad supra*]. Una estrategia podría ser la de utilizar lentivirus para infectar las células diana, tal y como ya está siendo intentado en otro tipo de terapias (Ralph GS, *et al.* (2006) Clin Sci (Lond) 110: 37-46).

#### Uso de los agonistas del receptor nuclear Nur77 en el tratamiento de la obesidad

5 Tal como se ha indicado previamente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que la proteína SerpinA3 tiene la capacidad de inhibir el apetito cuando es administrada a un individuo y que además ejerce su acción inhibitoria a través del receptor nuclear Nur77, revelando la implicación de dicho receptor en la regulación de la ingesta de alimentos, y proporcionando una nueva ventana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y enfermedades asociadas a la misma.

10 No obstante, el experto en la materia entiende que la presente invención no sólo va dirigida a seres humanos que necesiten reducir el peso por problemas de salud, sino a todas aquellas personas que bien por necesidades estéticas o deportivas deseen o necesiten bajar su peso.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agonista del receptor nuclear Nur77 en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad, o de una enfermedad asociada con la obesidad, en un sujeto, en donde dicho agonista actúa reduciendo o  
15 inhibiendo el apetito de dicho sujeto.

Los términos “agonista”, “sujeto” y “receptor nuclear Nur77” ya han sido definidos previamente en relación con el método para reducir o inhibir el apetito de la invención, y son aplicables al presente aspecto inventivo.

20 Como entiende el experto en la materia, en el contexto de la presente invención, la composición farmacéutica puede comprender, además del agonista del receptor nuclear Nur77 en una cantidad terapéuticamente efectiva, uno o más adyuvantes y/o vehículo farmacéuticamente aceptables. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados  
25 habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. Opcionalmente, la composición farmacéutica también puede comprender otros compuestos o fármacos útiles en la reducción del peso y/o tratamiento de la obesidad distintos de un agonista del receptor nuclear Nur77.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agonista del receptor nuclear Nur77 capaz de reducir o inhibir el apetito,  
30 calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

A la hora de elaborar la composición farmacéutica, ésta puede prepararse en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Entre las distintas vías de administración se incluyen, pero no se limitan a, vía parenteral, vía oral, vía intraperitoneal y vía subcutánea. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

10 En la presente invención, se entiende por “obesidad” a la enfermedad en la cual las reservas naturales de energía, almacenadas en el tejido adiposo de los humanos y otros mamíferos, se incrementa hasta un punto donde está asociado con ciertas condiciones de salud o un incremento de la mortalidad. La obesidad puede medirse mediante:

el índice de masa corporal o IMC, en el que un IMC aumentado es aquel mayor o igual a  $24 \text{ kg/m}^2$ .

15 El índice de masa corporal es un método simple y ampliamente usado para estimar la proporción de grasa corporal. Éste es calculado dividiendo el peso del sujeto (en kilogramos) por el cuadrado de su altura (en metros), por lo tanto es expresado en  $\text{kg/m}^2$ . Un hombre con más del 25% de grasa corporal y una mujer con más de 30% de grasa corporal son considerados obesos. En un marco clínico, los médicos toman en cuenta la raza, la etnia, la masa magra (muscularidad), edad, sexo y otros factores los cuales pueden afectar la interpretación del índice de masa corporal. El IMC sobreestima la grasa corporal en personas muy musculosas y la grasa corporal puede ser subestimada en personas que han perdido masa corporal.

20 - el perímetro abdominal, en el que un perímetro abdominal aumentado en hombres es aquel mayor o igual a 102 centímetros (cm) y en mujeres mayor o igual a 88 cm.

El IMC no tiene en cuenta las diferencias entre los tejidos adiposo y magro; tampoco distingue entre las diferentes formas de adiposidad, algunas de las cuales pueden estar asociadas de forma más estrecha con el riesgo cardiovascular. El mejor conocimiento de la biología del tejido adiposo ha mostrado que la grasa visceral u obesidad central (obesidad tipo masculina o tipo manzana) tiene una vinculación con la enfermedad cardiovascular. La circunferencia de cintura absoluta ( $>102 \text{ cm}$  en hombres y  $>88 \text{ cm}$  en mujeres) o el índice cintura-cadera ( $>0,9$  para hombres y  $>0,85$  para mujeres) son usados como medidas de obesidad central.



En la presente invención se entiende por “enfermedad asociada a la obesidad” a aquella enfermedad en la que la obesidad del individuo es un factor de riesgo para padecer dicha enfermedad. Entre las enfermedades asociadas a la obesidad se incluyen, pero no se limitan a, resistencia a insulina y diabetes tipo II, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, aumentos de lípidos (colesterol y triglicéridos), problemas respiratorios (en particular, insuficiencia respiratoria, apnea, etc.), alteraciones hepáticas, enfermedades respiratorias, hiperuricemia, gota, insuficiencia venosa periférica, accidente cerebrovascular, artrosis/artropatía degenerativa, y distintos tipos de cáncer entre los que se incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama (las mujeres posmenopáusicas con obesidad tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer), cáncer de esófago, cáncer colorrectal y cáncer de endometrio.

En otra realización particular, la enfermedad asociada con la obesidad se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo II, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, problemas respiratorios, alteraciones hepáticas, enfermedades respiratorias, hiperuricemia, gota, insuficiencia venosa periférica, accidente cerebrovascular, artrosis/artropatía degenerativa, y cáncer.

15 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

### **EJEMPLOS**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

##### *Modelos animales*

En estos experimentos se utilizaron ratones silvestres o *wild type* (WT), que fueron alojados en habitaciones con condiciones estables de temperatura (22-24°C) bajo un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad y alimentados con una dieta estándar. Los animales fueron tratados y sacrificados a las 10-12 semanas de edad. Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con los estándares aprobados por el Comité de Animales de la Universidad de Santiago de Compostela.

##### *Solución anestésica*

25 I.-KETAMINA: 42.5 % ketolar, parke-Davius, Morris Plańis N. J. (USA) 50mg/ml

II.-XILAZINA 20% Rompun, Bayer Leverkusen, Alemania. 2 mg/ml.

III.-solución salina fisiológica 37.5 %

##### *Canulación intracerebroventricular ( i.c.v.)*

Esta operación debe realizarse aproximadamente unos 4 días antes del experimento. El objetivo de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral. Se utilizaron cánulas de polietileno (PE-20, PE-50, Clay Adams, Becton-Dickinson, New Jersey USA) de calibre fino (1,09 mm de diámetro externo y 0,38 mm de diámetro interno); en uno de los extremos de la cánula se pone un

tope y se corta en bisel a unos  $\frac{3}{4}$  mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce al cerebro y la que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se selló hasta el día del experimento. Una vez anestesiados los animales se realizó un corte en la piel de la cabeza a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con la ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localizó el bregma, que separa los huesos frontales de los occipitales y que se utilizó como punto de referencia para realizar un orificio (1,2 mm mediolateral y 1 mm posterior) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente se añadió cianoacrilato para que la cánula quedara perfectamente fija y se selló toda la zona abierta. Para comprobar que la cánula ha quedado en posición correcta se inyectó protamina 2 %, disuelto en agua con acetato sódico, lo cual claramente tiñe el 10 ventrículo lateral, demostrando así que la cánula ha sido colocada correctamente.

*Administración intracerebroventricular (i.c.v.) de SerpinA3 en ratones*

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- 10 ratones *wild type* control tratados con vehículo (3  $\mu$ l suero fisiológico)
- 15 - 10 ratones *wild type* control tratados con SerpinA3 (0,5 $\mu$ g/3  $\mu$ l)
- 10 ratones *wild type* control tratados con SerpinA3 (1 $\mu$ g/3  $\mu$ l)
- 10 ratones *wild type* control tratados con SerpinA3 (2 $\mu$ g/3  $\mu$ l)

La SerpinA3 se administró de manera intracerebroventricular a través de una cánula de polietileno. A los animales se les puso una cantidad de comida pesada y se midió la ingesta a 1, 2, 4 y 6 horas tras la administración de la SerpinA3.

Por otro lado se realizó otro experimento con los siguientes grupos:

- 10 ratones *wild type* control tratados con vehículo (3  $\mu$ l suero fisiológico)
- 10 ratones Nur77 KO tratados con vehículo (3  $\mu$ l suero fisiológico)
- 10 ratones Nur77 KO tratados con SerpinA3 (1 $\mu$ g/3  $\mu$ l)
- 25 La SerpinA3 se administró de manera intracerebroventricular a través de una cánula de polietileno. A los animales se les puso una cantidad de comida pesada y se midió la ingesta a las 6 horas tras la administración de la SerpinA3.

**EJEMPLO 1**

**Efecto anorexigénico de la SerpinA3**

30 Se realizó una dosis- y un tiempo-respuesta de la SerpinA3 inyectada de manera intracerebroventricular en ratones (Figura 1). Las dosis utilizadas fueron 0,5, 1 y 2  $\mu$ g/ratón. Los tiempos a los que se midió la ingesta fueron 1, 2, 4 y 6 horas tras la inyección (Figura 1). Se observó que la administración central de la SerpinA3 (Recombinant Mouse Serpin A3N, R&D

Systems, Inc; número de catálogo: 4709-PI-010) disminuye la ingesta de comida a varias dosis tras 2, 4 y 6 horas de su administración.

El número de acceso en Swiss-Prot (versión 76, a fecha 26 de julio de 2011) para la secuencia usada para el desarrollo de la proteína SerpinA3 es Q91WP6 [SEQ ID NO: 4]. La secuencia empleada  
5 corresponde al fragmento Phe21 a Lys418, derivada de una línea celular de mieloma murina, es decir, desde la posición 21 a la 418, comprendiendo además un extremo C terminal 6 His tag.

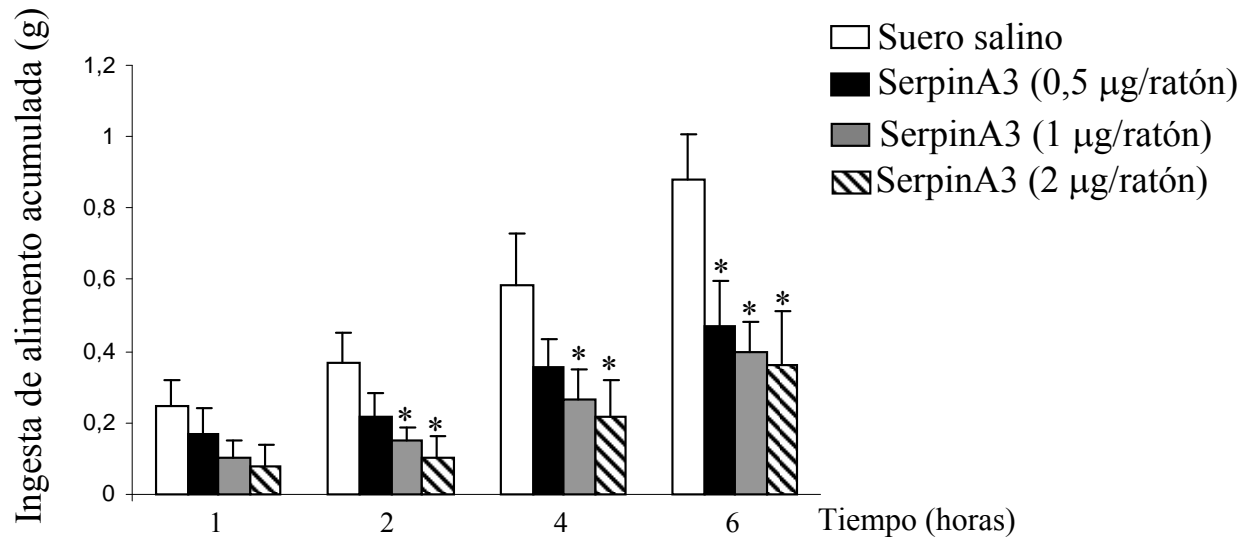
## **EJEMPLO 2**

### **Regulación de la acción de SerpinA3**

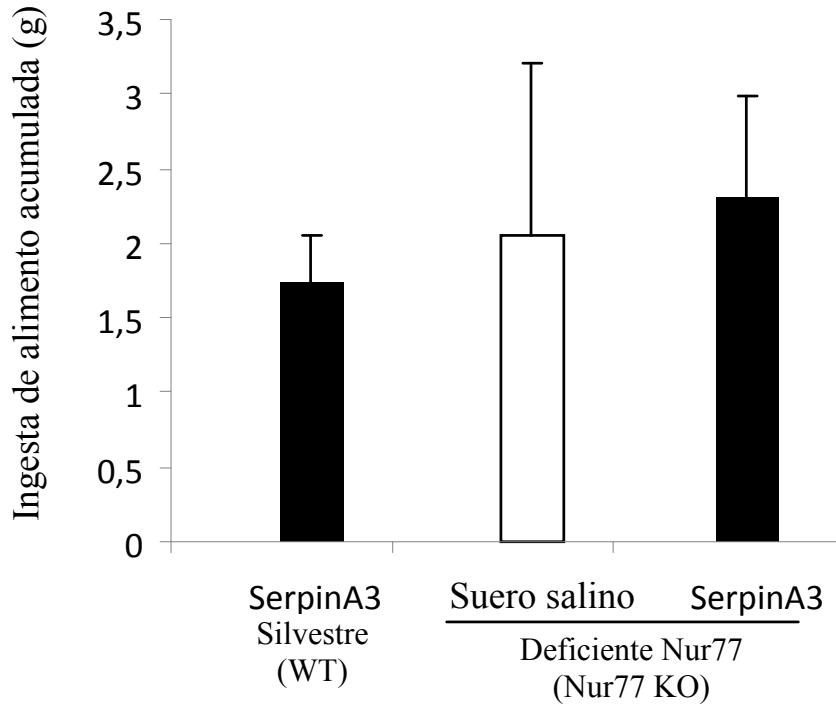
Dado que el receptor Nur77 parece regular la acción de la SerpinA3, se inyectó de manera  
10 intracerebroventricular la SerpinA3 en ratones deficientes para el receptor Nur77 (Figura 2). Después de 6 horas de tratamiento, se encontró que el efecto anorexigénico de la SerpinA3 desaparece en los ratones deficientes para este receptor, indicando que la SerpinA3 inhibe la ingesta a través del receptor Nur77.

### REIVINDICACIONES

1. Método para reducir o inhibir el apetito que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agonista del receptor nuclear Nur77.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, en el que el agonista del receptor nuclear Nur77 se selecciona de entre la proteína SerpinA3 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y un polinucleótido que codifica dicha proteína SerpinA3 o dicha variante funcionalmente equivalente de la misma.
3. Uso de un agonista del receptor nuclear Nur77 en la elaboración de una composición  
10 farmacéutica para el tratamiento de la obesidad, o de una enfermedad asociada con la obesidad, en un sujeto, en donde dicho agonista actúa reduciendo o inhibiendo el apetito de dicho sujeto.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que el agonista del receptor nuclear Nur77 se selecciona del grupo que consiste en la proteína SerpinA3 o una variante funcionalmente equivalente de la misma, un polinucleótido que codifica dicha proteína SerpinA3, y un polinucleótido que codifica  
15 dicha variante funcionalmente equivalente de la proteína SerpinA3.
5. Uso según la reivindicación 3 ó 4, en el que la enfermedad asociada con la obesidad se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo II, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, problemas respiratorios (insuficiencia respiratoria, apnea), alteraciones hepáticas, enfermedades respiratorias, hiperuricemia, gota, insuficiencia venosa periférica,  
20 accidente cerebrovascular, artrosis/artropatía degenerativa, y cáncer.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal y cáncer de endometrio.
7. Uso según la reivindicación 5, en el que los problemas respiratorios son insuficiencia respiratoria y apnea.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

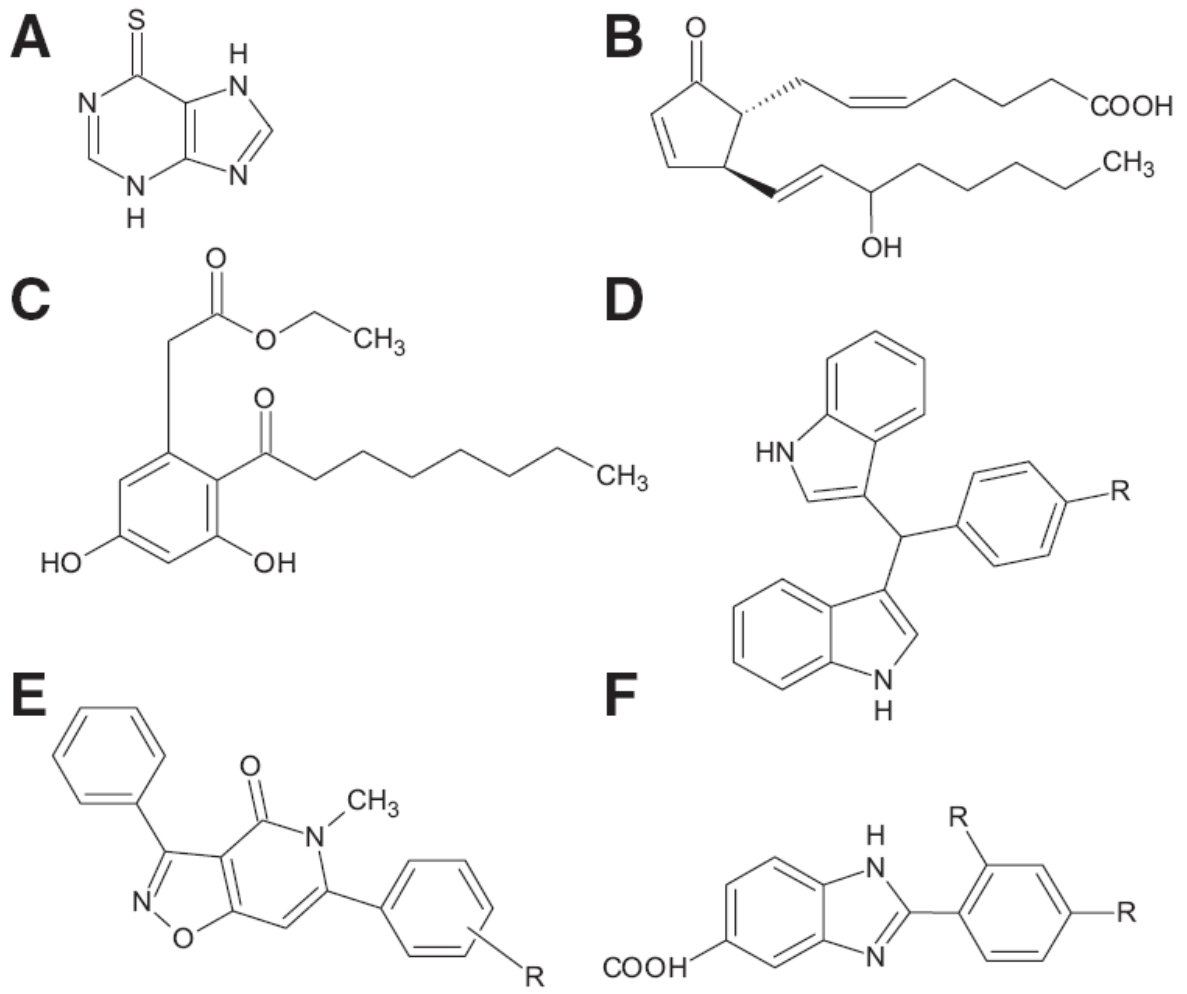


FIG. 3



②① N.º solicitud: 201131311

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K38/57** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KANZLEITER T. Overexpression of the orphan receptor Nur77 alters glucose metabolism in rat muscle cells and rat muscle in vivo. Diabetologia. JUN 2010. Vol. 53, Nº 6, páginas 1174-1183. ISSN 0012-186X.	1,3,5,6,7
A		2,4
X	CHAO L C. Insulin resistance and altered systemic glucose metabolism in mice lacking Nur77. Diabetes. 2009. Vol. 58. Nº. 12; páginas 2788-2796.	1,3,5,6,7
X	KANZLEITER T. Regulation of the nuclear hormone receptor nur77 in muscle: Influence of exercise-activated pathways in vitro and obesity in vivo. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE. 01.08.2009. Vol. 1792, Nº 8, páginas 777-782.	1,3,5,6,7
X	WO 2011006994 A1 (INST NAT SANTE RECH) 20.01.2011	5
A	ZHAO Y. Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. FEBS Journal. MAR 2008. Vol. 275, Nº 5, páginas 1025-1038.	1-7
A	SWIATKOWSKA-STODULSKA R. Assessment of [alpha]1-antitrypsin and [alpha]2-macroglobulin levels in obese patients. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. 2008. Vol. 118, Nº 12, páginas 713-718.	1-7
A	WO 2007006858 A2 (JURILAB LTD OY) 18.01.2007	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.11.2012

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4



Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, GENECARDS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 3, 5, 6, 7	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 3, 5, 6, 7	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KANZLEITER T. Overexpression of the orphan receptor Nur77 alters glucose metabolism in rat muscle cells and rat muscle in vivo. Diabetologia. JUN 2010. Vol. 53, Nº 6, páginas 1174-1183. ISSN 0012-186X.	
D02	CHAO L C. Insulin resistance and altered systemic glucose metabolism in mice lacking Nur77. Diabetes. 2009. Vol. 58. Nº. 12; páginas 2788-2796.	
D03	KANZLEITER T. Regulation of the nuclear hormone receptor nur77 in muscle: Influence of exercise-activated pathways in vitro and obesity in vivo. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE. 01.08.2009. Vol. 1792, Nº 8, páginas 777-782.	
D04	WO 2011006994 A1 (INST NAT SANTE RECH)	20.01.2011
D05	ZHAO Y. Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. FEBS Journal. MAR 2008. Vol. 275, Nº 5, páginas 1025-1038.	
D06	SWIATKOWSKA-STODULSKA R. Assessment of [alpha]1-antitrypsin and [alpha]2- macroglobulin levels in obese patients. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. 2008. Vol. 118, Nº 12, páginas 713-718.	
D07	WO 2007006858 A2 (JURILAB LTD OY)	18.01.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga el efecto anorexigénico de la proteína SerpinA3 cuando es inyectada en ratones de laboratorio. El objeto de la invención consiste en la elaboración de una composición para reducir o inhibir el apetito y, por extensión, para el tratamiento de la obesidad.

Las reivindicaciones 1, 3, 5, 6, 7 se relacionan con un método para regular una condición metabólica, por ejemplo, la ingesta de alimentos, o para tratar una enfermedad, basada en la administración de un compuesto que carece de una definición estructural. Dado que no se suministran características técnicas que definan estructuralmente la composición farmacéutica que se reivindica en las reivindicaciones 1, 3, estas reivindicaciones carecerían de novedad y actividad inventiva, puesto que es de sobre conocido en el estado de la técnica las implicaciones del receptor Nur77 en el metabolismo de los hidratos de carbono y de las grasas y la utilidad de Nur77 como diana para el tratamiento de condiciones relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono. Por tanto, la mera formulación del problema, el tratamiento de la obesidad o el control de la ingesta, y la solución aportada, es decir, la administración de una agonista del receptor de Nur77, no cumplirían con el requisito de novedad y actividad inventiva tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la ley 11/1986. Además, se considera que las reivindicaciones 5-7 carecen de actividad inventiva puesto que la mera extensión del uso de un agonista de Nur77 a toda una lista de enfermedades que pudieran tener su origen en una condición metabólica relacionada con la ingesta de alimentos sería algo obvio para el experto en la materia, por lo que no cumplirían con lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan expresamente el uso de la proteína SerpinA3 para reducir o inhibir el apetito, ni para tratar la obesidad, ni se puede deducir de manera obvia a partir de los documentos del estado de la técnica, tomados solos o en combinación, por lo que las reivindicaciones 2 y 4 sí que cumplirían con el requisito de novedad y actividad inventiva tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la ley 11/1986.