

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 741**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2002 E 02758573 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1427437**

54 Título: **Oxintomodulina para la prevención o el tratamiento del sobrepeso**

30 Prioridad:

07.09.2001 GB 0121709

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

03.04.2013

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
52 Prince's Gate, Exhibition Road
London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es:

**BLOOM, S. R.;
GHATEI, M. A.;
SMALL, C. J. y
DAKIN, C. L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 399 741 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

Oxintomodulina para la prevención o el tratamiento del sobrepeso

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

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

En la actualidad, en los Estados Unidos, se considera que el 25 % de la población adulta es clínicamente obesa. Se ha estimado que 45 mil millones de dólares de los costes de cuidados sanitarios de los Estados Unidos o el 8 % anual del gasto de cuidados sanitarios total, es un resultado directo de la obesidad. En Europa el problema está
10 creciendo. Se ha pronosticado que, sin nuevas estrategias, más del 20 % de la población del Reino Unido será clínicamente obesa en 2005. El hecho de que la obesidad sea una enfermedad metabólica lo está reconociendo de forma creciente la profesión médica y las autoridades sanitarias. Sin embargo, existe escasez de fármacos eficaces e ino cuos que puedan usarse junto con dieta y ejercicio para el control a largo plazo de la obesidad.

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

El preproglucagón es un polipéptido de 160 aminoácidos que, de una manera específica de tejido, escinde la prohormona convertasa 1 y 2 dando lugar a diversos productos con una diversidad de funciones tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en tejidos periféricos. Como se muestra en la Figura A, en el intestino y en el SNC, los principales productos postraduccionales de la escisión del preproglucagón son el péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), el péptido 2 similar a glucagón (GLP-2), la glicentina y la oxintomodulina (OXM). Hasta ahora no se ha
20 demostrado que la OXM realice alguna función en el SNC.

El documento EP 0 795 562 A2 se refiere al uso del péptido oxintomodulina para el tratamiento de la diabetes. El documento US 6.191.102 se refiere a la administración periférica del GLP-1 para reducir el peso corporal. Dakin y col., J. Endocrinology 24 (2000), resumen complementario P181, desvelan que la administración intracerebroventricular de la oxintomodulina en ratas produce una fuerte reducción y duradera en la ingesta de
25 alimento.

Aunque se ha demostrado que el GLP-1 y GLP2 inhiben la ingesta de alimento, dicha función no se ha demostrado para OXM, un péptido distinto. La importancia de la OXM, como péptido biológicamente activo, no se ha demostrado.

- 30 Sorprendentemente, se ha descubierto que, en contra de las expectativas, el péptido OXM puede inhibir la ingesta de alimento y reducir el peso.

Por consiguiente, la presente invención proporciona, de acuerdo con un primer aspecto, una composición que comprende OXM, para su uso en la prevención o el tratamiento del sobrepeso en un mamífero.

- 35 En este texto, el término "oxintomodulina" equivale a "OXM" y se refiere a cualquier composición que incluya una secuencia del péptido OXM o un análogo del mismo como se describe a continuación:

Las secuencias de la OXM son bien conocidas y están bien documentadas en la técnica. La presente invención se refiere a todas las secuencias indicadas en el presente documento incluyendo, en particular, la secuencia de la OXM humana (que es la misma que la secuencia de OXM de rata, hámster y bovina), como se describe a continuación:

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr
Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln
Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	Lys
Arg	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Ala,			

- 40 la secuencia de la OXM de lophiiformes como se describe a continuación:

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Asp	Tyr
Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Lys	Ala	Gln
Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Leu	Met	Asn	Asn	Lys
Arg	Ser	Gly	Val	Ala	Glu,				

y la secuencia de la OXM de la anguila como se describe a continuación:

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Asn	Asp	Tyr
Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Arg	Arg	Ala	Gln
Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Ser	Lys
Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Thr				

- El término OXM, usado en este texto, también incluye cualquier análogo de la secuencia de OXM anterior, en el que el resto de histidina en la posición 1 se conserva o se sustituye con un resto aromático que lleva una carga positiva o un derivado del mismo, preferentemente en el que el resto es un aminoácido, más preferentemente en el que es un derivado de histidina, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 del resto de aminoácidos en la secuencia de OXM anterior pueden sustituirse independientemente con cualquier otro aminoácido seleccionado independientemente, con la excepción de la histidina en la posición 1.
- En la secuencia, uno cualquiera o más (hasta 22) restos de alfa-aminoácidos adicionales pueden sustituirse independientemente con cualquier otro resto de alfa-aminoácido. Preferentemente, cualquier resto de aminoácido distinto de histidina se sustituye con una sustitución conservativa como se conoce bien en la técnica, es decir, sustituyendo un aminoácido con otro de un tipo químico similar tal como sustituyendo un aminoácido hidrófobo con otro.
- Como se ha indicado anteriormente, pueden sustituirse de 1 a 22 aminoácidos. Además de la opción de sustitución anterior, ésta puede ser una forma no esencial, modificada o isomérica, de un aminoácido. Por ejemplo, pueden sustituirse de 1 a 22 aminoácidos con una forma isomérica (por ejemplo un aminoácido D), o un aminoácido modificado, por ejemplo un nor- aminoácido (tal como norleucina o norvalina) o un aminoácido no esencial (tal como taurina). Adicionalmente, pueden sustituirse de 1 a 22 aminoácidos con un aminoácido correspondiente o diferente unido a través de su cadena lateral (por ejemplo ácido glutámico unido a gamma). Para cada una de las sustituciones indicadas anteriormente, el resto de histidina en la posición 1 no está modificado o se ha definido anteriormente.
- Adicionalmente, de la secuencia de la OXM pueden eliminarse 1, 2, 3, 4 ó 5 de los restos de aminoácidos con la excepción de la histidina en la posición 1 (o como se ha definido anteriormente). Los restos deletados pueden ser 2, 3, 4 ó 5 restos contiguos cualesquiera o restos completamente separados.

- El extremo C de la secuencia de la OXM puede modificarse para añadir restos de aminoácidos adicionales u otros restos. La OXM anterior puede proporcionarse como la sal correspondiente de la misma. Como ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de OXM y sus análogos se incluyen las derivadas de ácidos orgánicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y sulfúrico y similares, proporcionando metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, hidrocloreuro y sulfato y similares, respectivamente o las derivadas de bases tales como bases orgánicas e inorgánicas. Como ejemplos de bases inorgánicas adecuadas para la formación de sales de compuestos para la presente invención se incluyen los hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de amoníaco, litio, sodio, calcio, potasio, aluminio, hierro, magnesio, cinc y similares. También pueden formarse sales con bases orgánicas adecuadas. Dichas bases adecuadas para la formación de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con compuestos de la presente invención incluyen bases orgánicas que son no tóxicas y suficientemente fuertes para formar sales. Dichas bases orgánicas se conocen ya bien en la técnica y pueden incluir aminoácidos tales como arginina y lisina, mono, di, o trihidroxialquilaminas, tales como mono, di y trietanolamina, colina, mono, di, y trialquilaminas, tales como metilamina, dimetilamina y trimetilamina, guanidina; N-metilglucosamina; N-metilpiperazina; morfina; etilendiamina; N-bencil-fenilamina; tris(hidroximetil) aminometano; y similares.

Pueden prepararse sales de una manera convencional usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Pueden prepararse sales de adición de ácido de dichos compuestos básicos disolviendo los compuestos de base libre en solución acuosa o alcohólica acuosa u otros disolventes adecuados que contengan el ácido requerido. Cuando la OXM contiene una función ácida puede prepararse una sal básica de dicho compuesto haciendo reaccionar dicho

compuesto con una base adecuada. La sal ácida o básica puede separarse directamente u obtenerse por concentración de la solución, por ejemplo, por evaporación. La OXM también puede existir en formas solvatadas o hidratadas.

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

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

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

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

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

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

40 Generalmente, una formulación líquida consistirá en una suspensión o solución del compuesto o una sal fisiológicamente aceptable en un vehículo (o vehículos) líquido, acuoso o no acuoso, adecuado, por ejemplo, agua, etanol, glicerina, polietilenglicol o un aceite. La formulación también puede contener un agente de suspensión, un conservante, un saporífero o un agente colorante.

Puede prepararse una composición en forma de un comprimido usando cualquier vehículo (o vehículos) farmacéutico adecuado habitualmente usado para preparar formulaciones sólidas. Como ejemplos de dichos vehículos se incluye estearato de magnesio, almidón, lactosa, sacarosa y celulosa microcristalina.

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

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

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

- Las composiciones para administración nasal u oral pueden formularse de forma conveniente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones de aerosol normalmente comprenden una solución o una suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente, acuoso o no acuoso, fisiológicamente aceptable y normalmente se presentan en cantidades sencillas o multidosas en forma estéril en un envase herméticamente cerrado, que puede tener forma de cartucho o recarga para su uso con un dispositivo de atomización. Como alternativa, el envase herméticamente cerrado puede ser un dispositivo de dosificación unitario, tal como un inhalador nasal de dosis única o un dosificador de aerosol equipado con una válvula de medida que se pretende desechar una vez agotado el contenido del envase. Cuando la forma farmacéutica comprende un dosificador de aerosol, contendrá un propulsor farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas de aerosol también pueden tener forma de un atomizador de bomba.
- Las composiciones adecuadas para la administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar y grageas, en las que el principio activo se formula con un vehículo, tal como, azúcar y goma arábiga, tragacanto o gelatina y glicerina.
- Las composiciones para administración rectal o vaginal están, convenientemente, en forma de supositorios (que contienen una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao), pesarios, comprimidos vaginales, espumas o enemas.
- Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen pomadas, geles, parches e inyecciones que incluyen inyecciones de polvo.
- Convenientemente la composición está en forma farmacéutica unitaria, tal como un comprimido, cápsula o ampolla.
- La OXM puede usarse como profilaxis para prevenir el aumento de peso excesivo o puede usarse como un agente terapéutico para perder el sobrepeso.
- El sobrepeso es normalmente obesidad, aunque el mamífero no necesita estar diagnosticado como clínicamente obeso para padecer sobrepeso. La OXM puede estar en forma líquida, sólida o semisólida.
- En la sociedad actual, la prevención o el tratamiento del sobrepeso en un mamífero es una necesidad real. Preferentemente, el mamífero es un ser humano, aunque también pueden incluirse otros animales mamíferos, tales como caballos, animales caninos (en particular animales caninos domésticos), animales felinos (en particular animales felinos domésticos) así como mamíferos que se producen para carne, tales como animales porcinos, bovinos y ovinos. La presente invención puede usarse para prevenir el sobrepeso en dichos animales para maximizar la producción de carne magra.
- A lo largo de este texto, el término "prevención" significa cualquier efecto que mitigue cualquier sobrepeso, en cualquier grado. A lo largo de este texto, el término "tratamiento" significa alivio del sobrepeso, en cualquier grado.
- Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para el sobrepeso cosmético en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar a un mamífero una composición que comprende OXM. En este caso, la pérdida de peso es puramente para los fines de aspecto cosmético.
- Todas las características preferidas del primer aspecto también se aplican al segundo.
- Sin desear quedar vinculado con esta teoría, se entiende que la presente invención proporciona la prevención o el tratamiento del sobrepeso mediante la administración de OXM que actúa como un inhibidor de la ingesta de alimento al organismo de mamíferos. Dicha reducción de la ingesta de alimento da como resultado la prevención o el tratamiento del sobrepeso en un mamífero. En este texto, el término "alimento" incluye una sustancia que se ingiere y que tiene valor calórico.
- Un tercer aspecto en relación con la presente invención proporciona el uso de OXM en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de sobrepeso en un mamífero.
- Todas las características preferidas del primer y segundo aspecto, se aplican al tercero.
- Cuando la invención se refiere a medicamentos, el régimen de dosificación particular lo determinará finalmente el doctor tratante y se tendrán en cuenta factores tales como la OXM que vaya a usarse, el tipo de animal, la edad, el peso, la gravedad de los síntomas y/o la gravedad del tratamiento que vaya a aplicarse, el procedimiento de administración del medicamento, las reacciones adversas y/o contraindicaciones. Los intervalos de dosificación definidos específicos pueden determinarse mediante ensayos clínicos diseñados convencionales controlando a fondo la evolución y la recuperación del paciente.
- Dichos ensayos pueden utilizar un diseño de aumento de dosis utilizando, como dosis de partida en seres humanos, un porcentaje bajo de la dosis máxima tolerada en animales.
- A continuación se describe la presente invención solo a modo de ejemplo y con referencia a las siguientes figuras, en las que:

la Figura A es una representación gráfica del preproglucagón y sus partes componentes;

la Figura 1 es una comparación de los efectos de la inyección intracerebroventricular (ICV) e inyección nuclear intraparaventricular (iPVN) de productos derivados de proglucagón y relacionados sobre la ingesta de alimento en ratas en ayunas. La Figura 1A ilustra la ingesta de alimento acumulativa (g) hasta 8 h después de la inyección ICV de GLP-1, OXM, glucagón o glicentina (todos a 3 nmol) en animales en ayunas. *, P<0,05 frente a control con solución salina. La Figura 1B ilustra la ingesta de alimento acumulativa (g) hasta 24 h después de la inyección iPVN aguda de GLP-1, OXM (ambos a 1 nmol) o exendina-4 (0,03 nmol) en animales en ayunas. *, P<0,01 frente a control con solución salina para todos los grupos a 1, 2 y 4 h. *, P<0,05 frente a control con solución salina para exendina-4 sólo a las 8 h;

la Figura 2 muestra dos gráficos de los efectos de ICV e iPVN de OXM sobre la ingesta de alimento en ratas en ayunas. Figura 2A, ingesta de alimento acumulativa (g) hasta 8 h después de una inyección ICV aguda de OXM (0,3, 1, 3 ó 10 nmol). Figura 2B, ingesta de alimento acumulativa (g) hasta 8 h después de una inyección iPVN aguda de OXM (0,1, 0,3 ó 1,0 nmol) en animales en ayunas. *, P<0,05 frente a control con solución salina;

la Figura 3 muestra dos gráficos de barras del efecto de ICV de OXM al inicio de la fase oscura. Ratas saciadas recibieron una inyección ICV de OXM, GLP-1 (3 nmol) o solución salina al inicio de la fase oscura. Se determinó la ingesta de alimento (gramos; A) y los comportamientos (B) 1 h después de la inyección. *, P<0,05 frente a control con solución salina;

la Figura 4 muestra dos gráficos de barras de la inhibición de OXM y efectos de GLP-1 sobre la ingesta de alimento por exendina-(9-39). Figura 4A, ingesta de alimento 1 h después de una inyección ICV aguda de GLP-1 (3 nmol), GLP-1 más exendina-(9-39) (30 nmol), OXM (3 nmol), OXM y exendina-(9-39) (30 nmol) o exendina-(9-39) en solitario (30 nmol). Figura 4B, ingesta de alimento después de una inyección iPVN aguda de GLP-1 (1 nmol), GLP-1 y exendina-(9-39) (10 nmol), OXM (1 nmol), OXM y exendina-(9-39) (10 nmol) o exendina-(9-39) en solitario (10 nmol) en animales en ayunas. **, P<0,005 frente a control con solución salina;

la Figura 5 es un gráfico de la competitividad de la unión de [¹²⁵I] GLP-1 por GLP-1 y OXM en membranas hipotalámicas de rata;

la Figura 6 ilustra el efecto de a) IP de OXM (30, 100 y 300 nmol/kg en 500 µl de solución salina) o solución salina sobre la ingesta de alimento acumulativa (g) en ratas en ayunas durante 24 horas inyectadas durante la fase oscura temprana (cuadrados en negrita = solución salina, círculos en blanco = OXM 30 nmol/kg, triángulos en negrita = OXM 100 nmol/kg, triángulos en blanco = OXM 300 nmol/kg); y b) IP de OXM (30 y 100 nmol/kg en 500 µl de solución salina) o solución salina sobre la ingesta de alimento acumulativa en ratas no en ayunas inyectadas antes del inicio de la fase oscura (cuadrados en negrita = solución salina, círculos en blanco = OXM 30 nmol/kg, triángulos en negrita = OXM 100 nmol/kg). *, P<0,05 frente a solución salina;

la Figura 7 ilustra el efecto de dos inyecciones IP diarias de OXM (50 nmol/kg) o solución salina durante siete días sobre a) ingesta de alimento acumulativa (g); y b) aumento de peso corporal (g). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,005 frente a solución salina;

la Figura 8 ilustra el efecto de inyección IP de OXM (50 nmol/kg), solución salina o un control positivo (1 hora = GLP-1 (50 nmol/kg); 2 horas = CCK (15 nmol/kg)) sobre el vaciado gástrico en ratas en ayunas durante 36 horas. Los contenidos (peso en seco) del estómago se expresaron como un porcentaje de la ingesta de alimento durante el periodo de alimentación de 30 minutos. **P<0,01 frente a solución salina;

la Figura 9 ilustra el efecto de dosis en aumento de la OXM (0,01 – 1,0 nmol) sobre la ingesta de alimento de 1 hora cuando se administró en el núcleo arqueado de ratas en ayunas durante 24 horas. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,05 frente a solución salina;

la Figura 10 ilustra el efecto de la administración iARC de exendina 9-39 (5 nmoles) o solución salina inyectada 15 minutos antes de la administración de inyección IP de OXM (30 nmol/kg), GLP-1 (30 nmol/kg) o solución salina sobre la ingesta de alimento (g) de 1 hora. (S = solución salina, G = GLP-1 (30 nmol/kg), Ox = OXM (30 nmol/kg), Ex = exendina 9-39 (5 nmoles));

la Figura 11a ilustra la expresión de la inmunoreactividad de tipo fos en respuesta a A) inyección IP con solución salina o B) inyección IP con OXM (50 nmol/kg) en el núcleo arqueado del hipotálamo (aumento 40x). ***P<0,005 frente a solución salina; y

la Figura 11b ilustra la expresión de la inmunoreactividad de tipo fos en respuesta a A) inyección IP con solución salina, B) inyección IP con OXM (50 nmol/kg) o C) inyección IP con CCK (15 nmol/kg) en el NTS y AP del tronco encefálico.

Ejemplos

A - La OXM produce una fuerte disminución en la realimentación inducida por ayuno cuando se inyecta tanto ICV

como iPVN

Péptidos y agentes químicos

El GLP-1, la glicentina, el glucagón y SP-1 se obtuvieron de Peninsula Laboratories, Inc. (St. Helens, RU). La OXM se obtuvo de IAF BioChem Pharma (Laval, Canadá). La exendina-4 y exendina-(9-39) se sintetizaron en el Consejo de Investigación Médica, Unidad de Hemostasis, Centro de Ciencias Clínicas, Hospital Hammersmith, Londres, RU usando química F-moc en un sintetizador peptídico 396 MPS (Advanced ChemTech, Inc.) y se purificó por HPLC de fase inversa en una columna C₈ (Phenomex, Macclesfield, RU). El peso molecular correcto se confirmó por espectroscopía de masas. Todos los agentes químicos se obtuvieron de Merck & Co. (Lutterworth, Leicester, RU) a menos que se indique otra cosa.

Animales

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

Canulación ICV e iPVN e infusiones de compuestos de ensayo

Los animales tenían cánulas guía de acero inoxidable permanentes (Plastics One, Roanoke, VA) implantadas de forma estereotáctica ICV o iPVN. Todos los estudios se realizaron en la fase de luz temprana, entre las 09:00 y 11:00 h, después de un ayuno de 24 h, y la ingesta de alimento se midió 1, 2, 4, 8 y 24 h después de la inyección.

Protocolos de estudio de alimentación

Comparación del efecto de productos derivados de proglucagón y péptidos relacionados sobre la ingesta de alimento.

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

En todos los estudios, se usó la OXM humana con la siguiente secuencia:

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr
Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln
Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	Lys
Arg	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Ala			

Se usó el GLP-1 humano con la siguiente secuencia:

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val
Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys
Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg

En el estudio 1b, las ratas recibieron una inyección iPVN de solución salina 1 µl, GLP-1 (1,0 nmol), OXM (1,0 nmol), glicentina (1,0 nmol), glucagón (1,0 nmol) o SP-1 (3,0 nmol; n = 12-15/grupo). Cuando la exendina-4 se inyectó ICV, inhibió la ingesta de alimento de forma más potente que el GLP-1. Por lo tanto, la exendina-4 se inyectó por vía iPVN a una dosis de 0,03 nmol.

Investigación del efecto de dosis en aumento de OXM en la ingesta de alimento

En el estudio 2a, las ratas recibieron una inyección ICV de solución salina, GLP-1 (3 nmol) u OXM (0,3, 1, 3 ó 10 nmol; n = 8/grupo). En el estudio 2b, las ratas recibieron una inyección iPVN de solución salina, GLP-1 (1,0 nmol) u OXM (0,1, 0,3 ó 1,0 nmol; n = 12-15/grupo). Para evaluar si la OXM actuaba mediante el receptor de GLP-1, se realizó un estudio utilizando el antagonista del receptor de GLP-1, exendina-(9-39).

Alimentación nocturna y análisis de comportamiento.

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

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

Ensayos de unión al receptor. Estudio 5.

Se realizaron ensayos de unión al receptor en un volumen final de 0,5 ml de membranas hipotalámicas de rata (proteína 200 µg), 500 Bq (100 pM) [¹²⁵I]GLP-1 y péptidos competidores no marcados (GLP-1 y OXM) como se especifica. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min. La radioactividad unida y libre se separó por centrifugación (2 min, 4 °C). Las membranas sedimentadas se lavaron con tampón de ensayo (0,5 ml, helado) y las membranas se centrifugaron como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante se retiró y se contó la radiactividad en el sedimento usando un contador γ. La unión específica (saturable) se calculó como la diferencia entre la cantidad de [¹²⁵I]GLP-1 unido en ausencia (unión total) y presencia de GLP-1 u OXM 1 µM (unión no saturable). Todas las curvas se construyeron con puntos por triplicado. Los valores CI₅₀ se calcularon usando el programa Prism 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Datos estadísticos

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

Resultados

Comparación de los efectos de productos derivados de proglucagón y péptidos relacionados sobre la ingesta de alimento.

Administración ICV

En el estudio 1a, la OXM y el GLP-1 (3 nmol) redujeron significativamente la realimentación. Esta inhibición de ingesta de alimento duró hasta 4 h después de la inyección (Fig. 1A). El glucagón y la glicentina (3 nmol) no afectaron a la ingesta de alimento en ningún punto temporal (Fig. 1A).

Administración iPVN

En el estudio 1b, la OXM, el GLP-1 (3 nmol) y la exendina-4 (0,03 nmol) también inhibieron la alimentación cuando se inyectaron por vía iPVN. Esta inhibición duró al menos 8 h después de la inyección, más que cuando se inyectó por vía ICV (Fig. 1B). La glicentina, el glucagón (1 nmol) y el SP-1 (3 nmol) no afectaron a la ingesta de alimento en ningún punto temporal cuando se inyectaron por vía iPVN.

Efectos de aumentar las dosis de OXM en la ingesta de alimento

Administración ICV

En el estudio 2a, cuando la OXM se inyectó por vía ICV, redujo la realimentación de una manera dependiente de la dosis, alcanzando un efecto máximo a una dosis de 3 nmol, 1, 2 y 4 h después de la inyección (Fig. 2A).

Administración iPVN.

En el estudio 2b, el GLP-1 y la OXM inyectados por vía iPVN (ambos 1 nmol) redujeron significativamente la ingesta de alimento hasta 8 h después de la inyección (Fig. 2B).

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

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

Efecto de la OXM sobre la ingesta de alimento.

En el estudio 3a, cuando se inyectaron en la fase oscura temprana, tanto el GLP-1 como la OXM (3 nmol) redujeron significativamente la ingesta de alimento en comparación con la de los animales tratados con solución salina 1 h después de la inyección [Fig. 3A].

5 Observación del comportamiento después de inyección ICV de OXM.

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

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

Administración ICV. Estudio 4.

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

Administración iPVN.

De manera similar, cuando se inyecta por vía iPVN, los efectos anorexígenos tanto del GLP-1 como de la OXM se bloquearon cuando se coinyectaron con exendina-(9-39) [Fig. 4B].

Ensayos de unión al receptor. Estudio 5.

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

Discusión.

25 La OXM produce una fuerte disminución en la realimentación inducida por ayuno cuando se inyecta por vía tanto ICV como iPVN. El efecto se mantuvo hasta las 8 h (iPVN) o 4 h (ICV) después de la inyección. El efecto de la OXM es aproximadamente de la misma magnitud y ciclo temporal que el de GLP-1 cuando se administra por vía ICV e iPVN a dosis equimolares. Además, la OXM inhibe la ingesta de alimento en ratas no en ayunas al inicio de la fase oscura y en ese momento no mostraron indicios de comportamiento aversivo.

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

40 La exendina-(9-39), un fragmento del agonista del GLP-1R, exendina-4, es un antagonista fuerte y selectivo en el GLP-1R. Cuando el GLP-1 y la exendina-(9-39) se coinyectan, las acciones anorexigénicas del GLP-1 se bloquean. Cuando la OXM se coinyecta con la exendina-(9-39), los efectos anorexígenos de la OXM también se bloquean por completo. Esto reforzaría el argumento de que la OXM media sus efectos a través del GLP-1R.

45 Los autores de la invención investigaron los efectos de la glicentina y glucagón después de una inyección ICV aguda en ratas en ayunas. Después de la administración de estos péptidos no se observó ningún efecto sobre la ingesta de alimento inducida por el ayuno. Además, no hubo efecto de estos péptidos cuando se administraron por vía iPVN. Cuando SP-1, la supuesta estructura activa mínima de la OXM, se inyectó por vía iPVN, no se observó inhibición de ingesta de alimento. Por lo tanto el efecto observado con la OXM es específico.

B – La administración periférica de la OXM también reduce la ingesta de alimento y el aumento de peso corporal

Péptidos y agentes químicos

50 La OXM se obtuvo de IAF BioChem Pharma (Laval, Canadá). El GLP-1 se obtuvo de Peninsula Laboratories Inc. (St. Helens, RU). La exendina 9-39 se sintetizó en el Consejo de Investigación Médica, Unidad de Hemostasis, Centro de Ciencias Clínicas, Hospital Hammersmith, Londres, RU usando química F-moc en un sintetizador peptídico 396 MPS (Advanced ChemTech, Inc.) y se purificó por HPLC de fase inversa en una columna C₈ (Phenomex,

Macclesfield, RU), usando un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 %. El peso molecular correcto se confirmó por espectrometría de masas. Todos los agentes químicos se obtuvieron de Merck Eurolab Ltd. (Lutterworth, Leicestershire, RU), a menos que se especifique otra cosa.

Animales

- 5 Ratas Wistar macho adultas (180 – 200 g) se mantuvieron en jaulas individuales en condiciones controladas de temperatura (21-23 °C) y luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) con acceso a voluntad a pienso de rata convencional (dieta RM1, Special Diet Services RU Ltd., Witham, Essex, RU) y agua. Todos los procedimientos realizados se aprobaron por el British Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Licencias de Proyecto: 90/1077, 70/5281 y 70/5516).

- 10 Canulación de núcleo intra-arqueado

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

- 15 Inyecciones intraperitoneales (IP)

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

- 20 En estos estudios, se usaron las secuencias de la OXM humana y del GLP-1 humano proporcionadas en la página 7 de este documento

Protocolos *in vivo*

1. Investigación del efecto de la respuesta a dosis de administración periférica de la OXM en la ingesta de alimento en animales en ayunas:

- 25 Antes del estudio los animales se sometieron a ayuno durante 24 horas. Durante la fase de luz temprana (09.00 - 10.00 h), se proporcionó a las ratas una inyección IP sencilla de solución salina, GLP-1 (30 nmol/kg de peso corporal como control positivo) u OXM (10 – 300 nmol/kg de peso corporal) (n = 12 por grupo) en un volumen de 500 µl. Después de la inyección, los animales se devolvieron a sus jaulas y se les proporcionó una cantidad de pienso previamente pesada. La ingesta de alimento se midió 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección.

- 30 2. Investigación del efecto de administración periférica de la OXM en la ingesta de alimento en animales no en ayunas durante la fase oscura:

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

3. El efecto de inyecciones IP repetidas de OXM

- 40 Se seleccionó aleatoriamente a 45 animales por peso en tres grupos (n = 15 por grupo): 1) Tratados con solución salina con acceso a voluntad al alimento, 2) Tratados con OXM (50 nmol/kg de peso corporal por inyección – una dosis basada en el experimento de respuesta a dosis previo) con acceso a voluntad a alimento, 3) tratados con solución salina, pero con alimentos restringidos a la media de ingesta de alimento de fase luminosa y oscura del grupo tratado con OXM. Los animales recibieron inyecciones dos veces al día (7.00 y 18.00 h) durante siete días. Diariamente se midió, la ingesta de alimento (g), el peso corporal (g) y la ingesta de agua (ml). El octavo día, los animales se sacrificaron por decapitación. Se extirpó el tejido adiposo blanco (TAB) del epidídimo y el tejido adiposo marrón (TAM) interescapular y se pesaron como una evaluación de adiposidad corporal.

- 45 4. Investigación del efecto de administración periférica de OXM en vaciado gástrico

- 50 Los animales se sometieron a ayunas durante 36 horas para garantizar que el estómago estaba vacío. Durante la fase de luz temprana (09:00-10:00), se permitió acceso a voluntad a una cantidad de pienso de ratas convencional previamente pesada durante 30 minutos. Después de ese tiempo, el alimento se retiró y se volvió a pesar. Después, por vía IP, a los animales se les inyectó solución salina, OXM (50 nmol/kg peso corporal) o CCK-8 (15 nmol/kg peso corporal). Después se sacrificó a las ratas en los mismos momentos a los utilizados en los estudios de alimentación previos: 1, 2, 4 u 8 horas después de la alimentación (n = 12 por grupo por punto temporal). El grupo CCK-8 se usó como un control positivo para el experimento solamente en el punto temporal de dos horas. Los animales se sacrificaron por asfixia con dióxido de carbono. Se realizó rápidamente una laparotomía y se expuso el estómago.

Se ligó el punto de unión pilórico (2.0 Mersilk, Johnson & Johnson, Bélgica), seguido de ligamiento del punto de unión gastroesofágico y se extirpo el estómago. Después, los contenidos gástricos se eliminaron, se colocaron en una bandeja de peso previamente pesada y se dejaron secar al aire durante 48 horas. Una vez secos, los contenidos se pesaron y después se calculó el porcentaje del pienso ingerido durante el periodo de realimentación de media hora que permaneció en el estómago por rata usando la siguiente fórmula:

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

5. Investigación del efecto de dosis en aumento de OXM intra-arqueado

Se seleccionaron aleatoriamente ratas con cánulas intra-arqueadas (Intra AEC (iARC) (n = 12-15 por grupo) por peso en 6 grupos. Durante la fase de luz temprana (09:00 – 10:00), ratas en ayunas durante 24 horas recibieron una inyección iARC de solución salina, OXM (0,01, 0,03, 0,1 0,3 ó 1,0 nmoles). La ingesta de alimento se midió 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección.

6. Investigación de si la OXM administrada de forma periférica está actuando directamente mediante receptores de GLP-1 de núcleo arqueado.

Se seleccionaron aleatoriamente ratas con cánulas en el núcleo arqueado en 6 grupos (n = 10-12 por grupo). Durante la fase de luz temprana (09:00- 10:00) las ratas en ayunas durante 24 horas recibieron una inyección iARC de solución salina o exendina 9-39 (5 nmoles) seguido de una inyección IP de solución salina, OXM (30 nmoles/kg peso corporal) o GLP-1 (30 nmoles/kg peso corporal) 15 minutos después. Los detalles de las inyecciones se describen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

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

Inmunohistoquímica

Noventa (90) minutos después de una inyección IP de OXM (50 nmol/kg), CCK (15 nmol/kg) o solución salina, se anestesió a las ratas de forma terminal, se perfundió por vía transcardiaca solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M seguido de PB-formalina (PBF) al 4 %. Los cerebros se extirparon y posteriormente se fijaron durante una noche en PBF y después se transfirieron a PB-sacarosa (20 % p/v) durante una noche. Se cortaron secciones coronales de 40 µm del cerebro y del tronco encefálico en un microtomo de congelación y se tiñeron para detectar la inmunorreactividad de tipo fos (FLI) mediante el procedimiento de avitina-biotina-peroxidasa. Después las secciones se montaron en portaobjetos revestidos con poli-L-lisina, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (50 – 100 %), se deslipidaron en xileno y se colocó un cubreobjetos usando un soporte DPX. Los portaobjetos se examinaron para detectar núcleos positivos para FLI usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E-800) y las imágenes se capturaron usando un microformador de imágenes (Xillix Microlmager). Un miembro independiente del equipo de investigación, que desconocía los grupos experimentales, contó el número de núcleos positivos para FLI en el hipotálamo y tronco encefálico. Se calculó el número medio de núcleos positivos para FLI por sección y se expresó como un número entero para cada animal.

Incubación estática de explante hipotalámico

Se usó un sistema de incubación estático. Se sacrificaron ratas Wistar macho por decapitación y se extirpó el cerebro completo inmediatamente. El cerebro se montó con la superficie ventral hacia arriba y se colocó en un microtomo de vibración (Microfield Scientific Ltd., Dartmouth, RU). Se tomó un corte de 1,7 mm desde el hipotálamo basal, se bloqueó lateral al Círculo de Willis y se incubó en cámaras que contenían 1 ml de líquido cefalorraquídeo artificial que se equilibró con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 %. El corte hipotalámico abarcaba el área preóptica media, el PVN (núcleo hipotalámico paraventricular), el núcleo dorsomedial, el núcleo ventromedial, el hipotálamo lateral y el ARC. Los tubos se colocaron en una plataforma en un baño de agua mantenido a 37 °C. Después de un periodo de equilibrio inicial de 2 horas, cada explante se incubó durante 45 minutos en 600 µl aCSF (periodo basal) antes de exponerse a un periodo de ensayo. Se usó OXM 100 nM como una dosis que representa una concentración diez veces la de su Cl₅₀ para el receptor del GLP-1. La viabilidad del tejido se confirmó mediante una exposición final de

45 minutos a aCSF que contenía KCl 56 mM. Al final de cada periodo experimental, el aCSF se retiró y se conservó a -20 °C hasta la medición de la inmunorreactividad a α -MSH por radioinmunoensayo.

Radioinmunoensayo para medir α MSH-1R

La α -MSH se midió usando un radioinmunoensayo interno, desarrollado usando un anticuerpo de Chemicon International Inc.

Análisis estadístico

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

Resultados

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

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

2. El efecto de la administración periférica de OXM en animales no en ayunas sobre la ingesta de alimento en la fase oscura:

La OXM, 3 y 10 nmol/kg, no influyó en la ingesta de alimento en ningún momento investigado en ratas que se alimentaban de forma nocturna inyectadas inmediatamente antes de la fase oscura. Sin embargo, la OXM, 30 nmol/kg, inhibió significativamente la ingesta de alimento hasta 2 horas después de la inyección (2 horas: OXM, 30 nmol/kg, $4,5 \pm 0,4$ g frente a solución salina, $5,8 \pm 0,4$ g; $P < 0,05$). La ingesta de alimento se redujo 4 horas después de la inyección, pero esto no fue significativo. La OXM, 100 nmol/kg, inhibió significativamente la ingesta de alimento durante la fase oscura (8 horas: OXM, 100 nmol/kg, $14,1 \pm 0,8$ g frente a solución salina, $16,9 \pm 0,5$ g; $P < 0,05$) (Figura 6b).

3. El efecto de la administración IP repetida de OXM

Inyecciones IP dos veces al día de OXM (50 nmol/kg) durante siete días provocaron una disminución significativa en la ingesta de alimento diaria acumulativa, en comparación con animales de control tratados con solución salina (Ingesta de alimento acumulativa día 7: OXM, 50 nmol/kg, $168 \pm 4,6$ g frente a solución salina, $180 \pm 4,3$ g; $P < 0,01$) (Figura 7a). Adicionalmente, los animales tratados con OXM ganaron peso de forma significativamente más lenta que los controles de solución salina (aumento de peso acumulativo día 7: OXM, 50 nmol/kg, $21,0 \pm 1,5$ g frente a solución salina, $37,6 \pm 1,9$ g; $P < 0,005$). Además, los animales "alimentados en paralelo" con alimento restringido no ganaron tan lentamente como los animales tratados con OXM, a pesar de recibir la misma ingesta de alimento (Día 7: alimentación en paralelo, $33,5 \pm 2,0$ g; $P = \text{NS}$ frente a solución salina (alimentación a voluntad), $P < 0,05$ frente OXM) (Figura 7b). Además, la OXM crónica produjo una disminución en la adiposidad que no se observó en los animales alimentados en paralelo con inyección de solución salina (Tabla 2). La ingesta de agua se redujo significativamente en animales tratados con OXM los días 1 y 2 del experimento (Día 1: OXM, $24,1 \pm 1,28$ ml frente a solución salina, $28,1 \pm 1,33$ ml; $P < 0,05$). Los días posteriores, hubo un aumento en la ingesta de agua diaria en comparación con los animales tratados con solución salina (días 3-6). Sin embargo, el día 7, no hubo diferencias en la ingesta de agua entre los grupos tratados con solución salina y OXM (no mostrado).

Tabla 2: El efecto de la administración IP dos veces al día de solución salina u OXM (50 nmol/kg) durante siete días sobre el peso de TAB del epidídimo y TAM interescapular en ratas alimentadas a voluntad y con alimentación restringida

<u>Tejido/hormona</u>	<u>Solución salina</u>	<u>OXM</u>	<u>Alimentado en paralelo</u>
TAB	<u>$0,69 \pm 0,02$</u>	<u>$0,51 \pm 0,01^a$</u>	<u>$0,61 \pm 0,02^b$</u>
TAM	<u>$0,16 \pm 0,01$</u>	<u>$0,12 \pm 0,01^a$</u>	<u>$0,15 \pm 0,01^b$</u>

4. La función de vaciamiento gástrico retardado sobre efecto anoréxico de la OXM:

Una hora después se presentó alimento a las ratas en ayunas durante 36 horas, el peso seco de los contenidos de los estómagos (como un porcentaje del alimento consumido durante el periodo de alimentación de 30 minutos) de los animales tratados con GLP-1 fue significativamente mayor que el de los animales tratados con solución salina (1 hora: GLP-1, 50 nmol/kg, $76,9 \pm 2,7$ g frente a solución salina, $65,8 \pm 1,6$ g; $P < 0,01$), lo que sugiere que GLP-1 provocó una disminución significativa en el vaciado gástrico. Los contenidos de los estómagos de los animales tratados con OXM fueron mayores que los de los controles tratados con solución salina, aunque esto no fue estadísticamente significativo (1 hora: OXM, 50 nmol/kg, $72,0 \pm 1,4$ g frente a solución salina, $65,8 \pm 1,6$ g; $P = 0,07$). Dos horas después de la alimentación, la OXM no afectó a los contenidos del estómago, en comparación con los animales tratados con solución salina. Sin embargo, los animales a los que se les inyectó el control positivo para este punto temporal, CCK (15 nmol/kg), tuvieron un contenido en el estómago significativamente mayor (2 horas: CCK, 15 nmol/kg, $64,7 \pm 6,4$ g frente a solución salina, 38,5 g; $P < 0,01$), lo que sugiere que CCK provocó una disminución significativa en la velocidad del vaciado gástrico. No hubo efecto de la OXM sobre los contenidos del estómago, en comparación con los animales tratados con solución salina, a las 4 u 8 horas después de la alimentación (Figura 8).

5. Investigación del efecto de dosis en aumento de OXM inyectadas en el núcleo intra-arqueado

Todas las dosis (excepto la de 0,01 nmoles) de OXM, administrada iARC durante la primera hora de realimentación después de un ayuno de 24 horas (1 hora: OXM 0,03 nmoles, $6,1 \pm 0,5$ g ($P < 0,05$); 0,1 nmoles, $5,6 \pm 0,4$ g ($P < 0,05$); 0,3 nmoles, $5,1 \pm 0,6$ g ($P < 0,01$); 1,0 nmol, $3,6 \pm 0,5$ g ($P < 0,005$) todos frente a solución salina, $7,7 \pm 0,2$ g) (Figura 9) inhibieron significativamente la ingesta de alimento. La OXM 0,3 y 1,0 nmoles continuó inhibiendo significativamente la ingesta de alimento hasta 8 horas después de la inyección. Veinticuatro horas después de la inyección, la ingesta de alimento se inhibió por OXM, 1,0 nmoles, aunque esto no fue significativo (24 horas: OXM, 1,0 nmol, $37,8 \pm 3,0$ g frente a solución salina, $40,8 \pm 1,6$ g; $P = \text{NS}$).

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

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

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

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

7. Mapeo de la expresión de FLI en el hipotálamo en respuesta de OXM IP:

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

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

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

La incubación de OXM (100 nM) con explantes hipotalámicos produjo un aumento significativo en la liberación de α -

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

Discusión

5 La administración periférica de OXM produce una reducción en la ingesta de alimento en ratas. Esto se observó después de un ayuno en la fase de luz y durante la fase de alimentación nocturna. El efecto anorexogénico fue fuerte y prolongado durante periodos de hasta 24 horas. Dos administraciones diarias IP de OXM durante siete días produjeron una reducción en la ingesta de alimento diaria en comparación con los tratados con solución salina, sin taquifilaxia. Los animales tratados con OXM ganaron significativamente menos peso que los animales alimentados en paralelo, a pesar de que los dos grupos recibieron una ingesta calórica diaria idéntica. La administración intraperitoneal de OXM redujo de manera transitoria la ingesta de agua aunque esto no fue prolongado, lo que sugiere que la reducción en la tasa de aumento de peso corporal no se debió a deshidratación.

10 Al concluir el estudio crónico, el TAB del epidídimo y el TAM interescapular se extirparon y se pesaron. Se descubrió que hubo una reducción en los pesos de todas las almohadillas adiposas en los animales tratados con OXM en comparación con los animales alimentados en paralelo, a pesar de una ingesta de alimento idéntica. Por lo tanto parece que la administración periférica de OXM también afecta a otros parámetros metabólicos.

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

20 Los autores de la invención indican en este documento que la administración periférica de OXM aumenta la FLI casi exclusivamente en el ARC. Además, los autores de la invención descubrieron que incubar el explante hipotalámico con OXM produjo un aumento significativo en la liberación del producto derivado de POMC (pro-opiomelanocortina), α -MSH de explantes hipotalámicos. La OXM IP no afectó a la expresión de FLI en las áreas NTS y AP – que se sabe que son importantes en la integración de la información mediada por el nervio vago, reforzando adicionalmente la noción de que la OXM no está actuando mediante estas rutas.

25 Se piensa que los núcleos en el tronco encefálico son el sitio principal de acción de GLP-1, y se envía información posteriormente al PVN hipotalámico, en el que se median sus efectos anorexigénicos. La inyección directa de OXM en el ARC, incluso a dosis muy bajas, produjo una inhibición fuerte y prolongada de la ingesta de alimento, apoyando adicionalmente la hipótesis de que el ARN es el sitio de las acciones de la OXM. Los efectos anorexigénicos producidos por la administración periférica de OXM se bloquearon por administración previa de exendina ⁹⁻³⁹ en el ARC. Sin embargo, resulta interesante observar que las acciones anorexigénicas del GLP-1 administrado periféricamente no se bloquearon. Este hallazgo indica firmemente que la OXM actúa mediante receptores de GLP-1 en el ARC. Además, ha identificado rutas específicas que median las acciones de GLP-1 y OXM.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Imperial College Innovations Limited Bloom, Stephen Robert Ghatei, Mohammad Ali Small, Caroline Jane Dakin, Catherine Louise
<120> Agente para la inhibición de alimento
<130> P32981WO/TJF
<140> PCT/GB02/04082
55 <141> 09-09-2002

<150> GB0121709.0

<151> 07-07-2001

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Lys Asn Asn Ile Ala
35

10

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Lophius sp.

15

<400> 2

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

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

Gly Val Ala Glu
35

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> Anguilla sp.

20

<400> 3

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

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

Gly Gly Pro Thr
35

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

25

ES 2 399 741 T3

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una oxintomodulina para su uso en la prevención o el tratamiento de sobrepeso en un mamífero, en donde la oxintomodulina se administra por vía oral, parenteral, de la mucosa, rectal, subcutánea o transdérmica.
2. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sobrepeso es obesidad.
- 5 3. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la oxintomodulina es oxintomodulina humana.
4. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la oxintomodulina es un análogo de la misma en el que el resto de histidina en la posición 1 se conserva o se sustituye con un resto aromático que lleva una carga positiva o por un derivado de histidina y en el que
- 10 (i) uno cualquiera o más de hasta 22 restos de alfa aminoácido adicionales se sustituyen independientemente con cualquier otro resto de alfa aminoácido, formas modificadas o isoméricas de un aminoácido, un aminoácido correspondiente o diferente unido mediante su cadena lateral; y/o
- (ii) 1, 2, 3, 4 ó 5 de los restos de aminoácidos se eliminan de la secuencia de la oxintomodulina; y/o
- (iii) el extremo C de la secuencia de la oxintomodulina se modifica para añadir restos de aminoácidos
- 15 adicionales u otros restos.
5. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la oxintomodulina está en forma de una sal, o está conjugada con uno o más grupos, está químicamente modificada o se proporciona en presencia de un metal.
6. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la oxintomodulina está conjugada con
- 20 un lípido, con un polímero de polietilenglicol, de polivinilpirrolidona o de alcohol polivinílico o con un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno.
7. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la oxintomodulina está en una forma adecuada para la administración por inhalación, o para administración bucal, sublingual o nasal.
- 25 8. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el metal es calcio, hierro, magnesio, manganeso o cinc.
9. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el metal es cinc.
10. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la oxintomodulina está en forma líquida, sólida o semisólida.
- 30 11. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha oxintomodulina está acilada o amidada.
12. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la oxintomodulina está en una forma adecuada para administración intraperitoneal.
- 35 13. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que uno o más de hasta 16 de los restos de aminoácidos distintos de histidina en la posición 1 se sustituyen independientemente con otro resto de aminoácido.
14. La oxintomodulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la oxintomodulina se proporciona en combinación con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 40 15. Una composición farmacéutica que comprende la oxintomodulina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 14 para su uso en el tratamiento o la prevención de sobrepeso en un ser humano, en donde la composición se administra por vía oral, parenteral, de la mucosa, rectal, subcutánea o transdérmica.
16. Un procedimiento no terapéutico para la prevención o el tratamiento de sobrepeso en un mamífero que comprende la administración de oxintomodulina, en el que la oxintomodulina se administra por vía oral, parenteral, de la mucosa, rectal, subcutánea o transdérmica.
- 45 17. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 16, en el que se consigue pérdida de peso cosmética.
18. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 17, en el que la pérdida de peso cosmética se consigue como resultado de una ingesta de alimento reducida.

Figura A

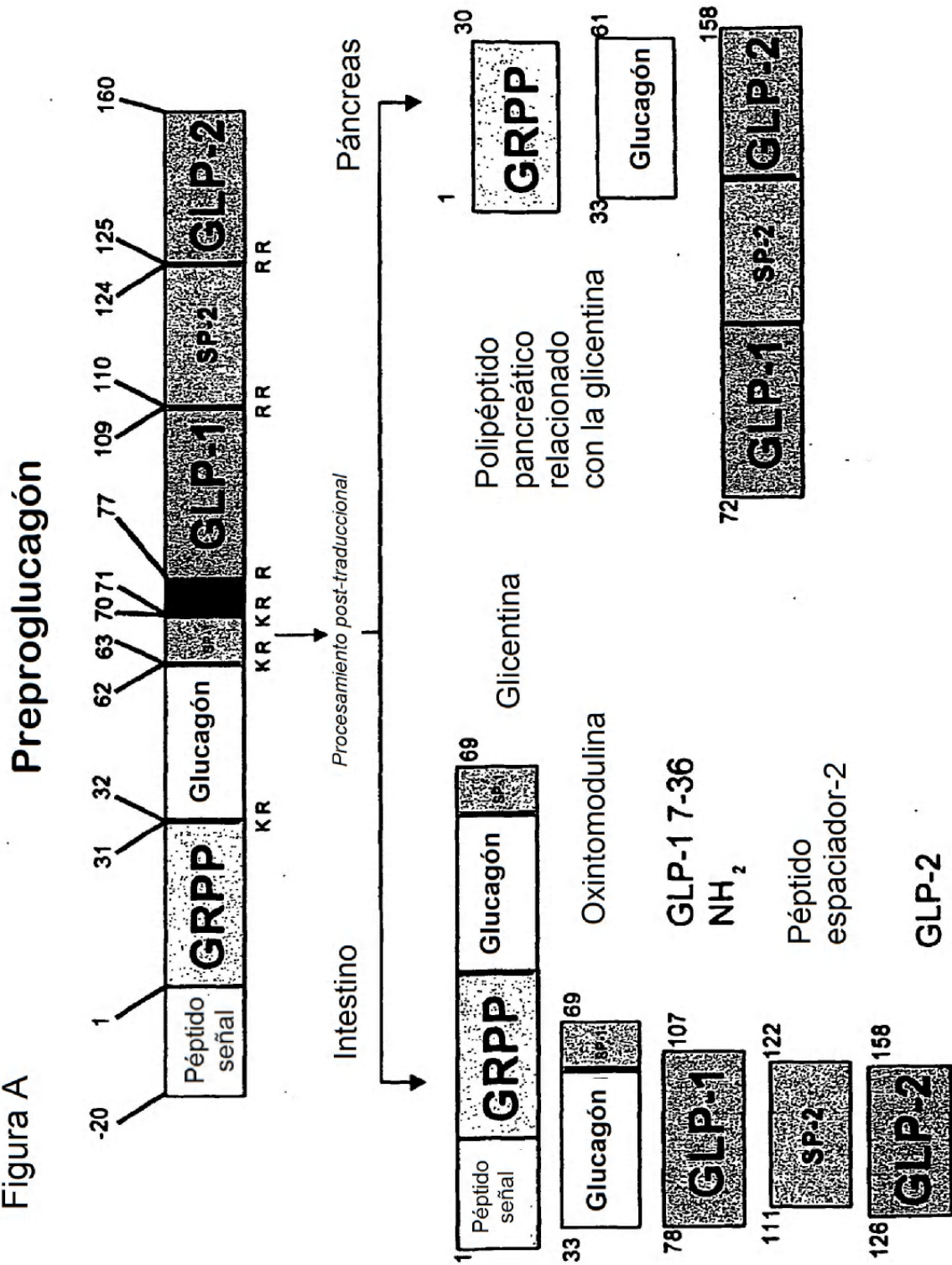


Figura 1A

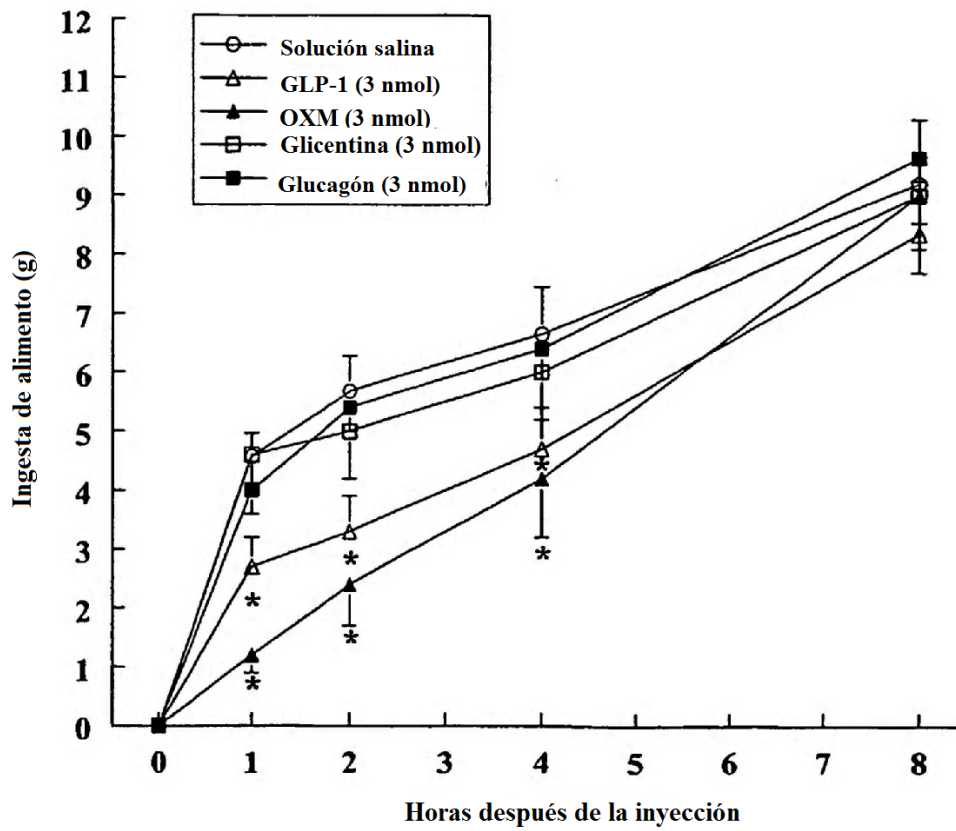


Figura 1B

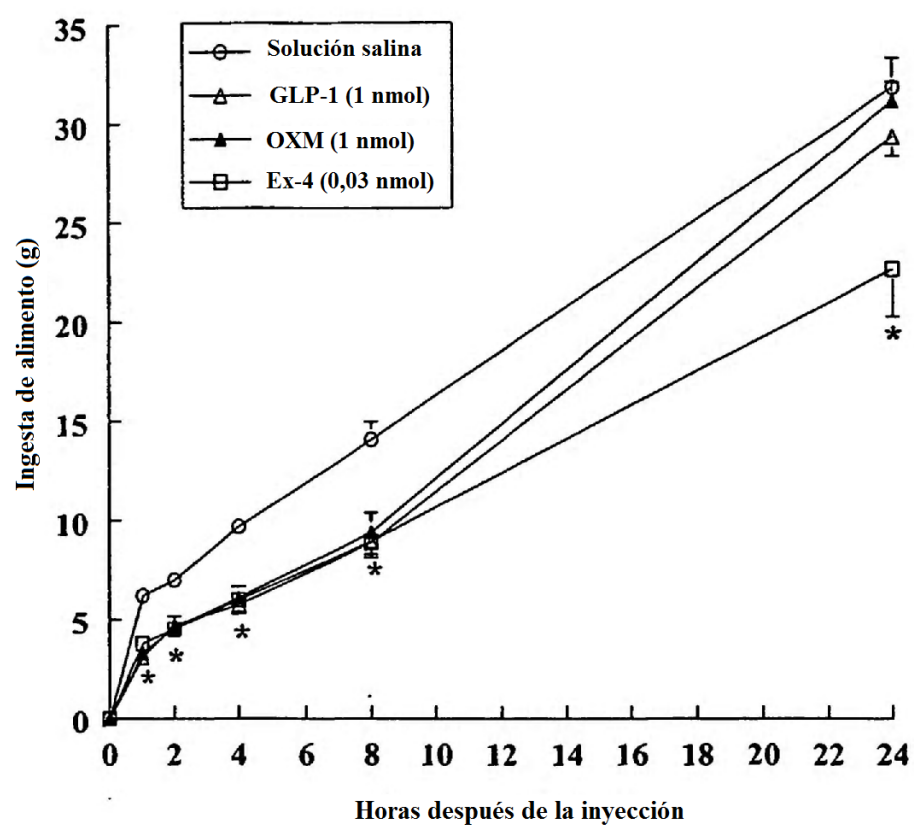


Figura 2A

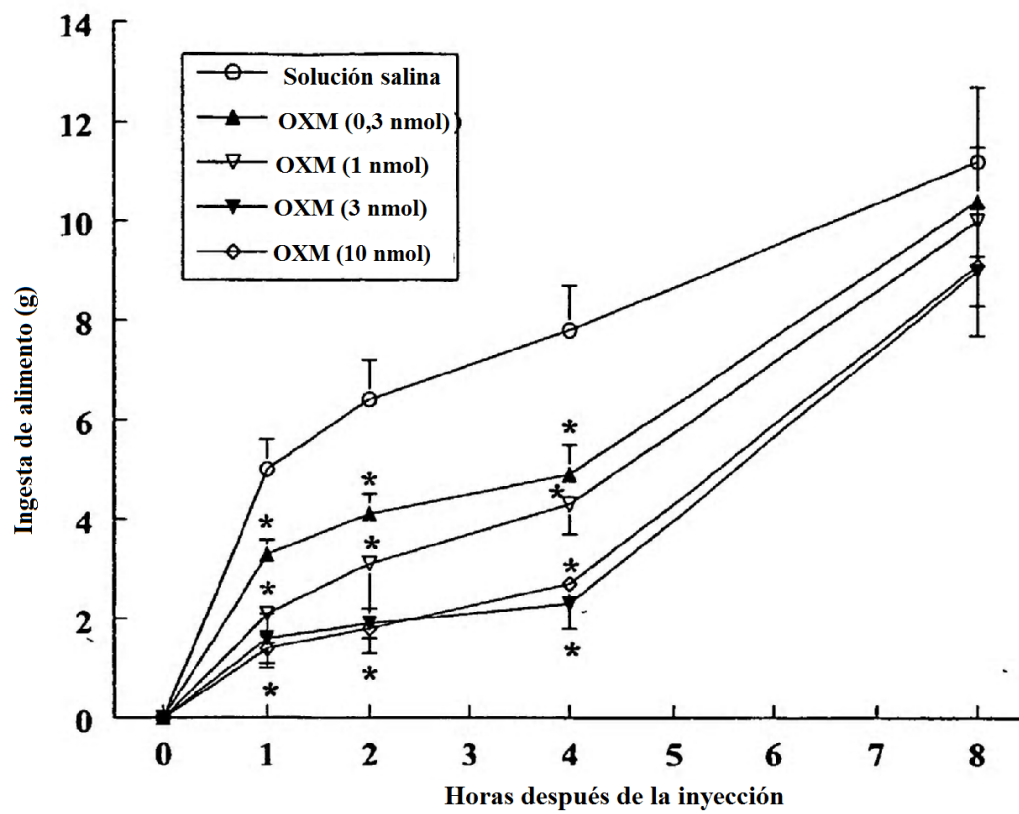


Figura 2B

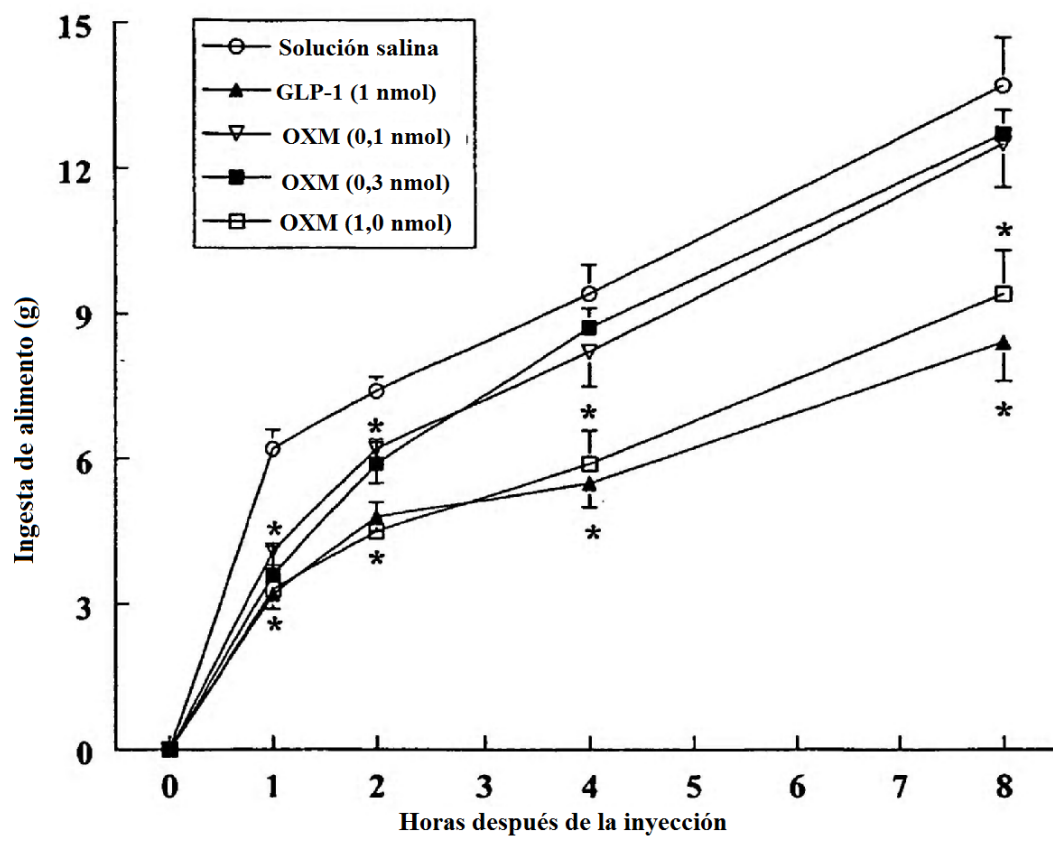


Figura 3A

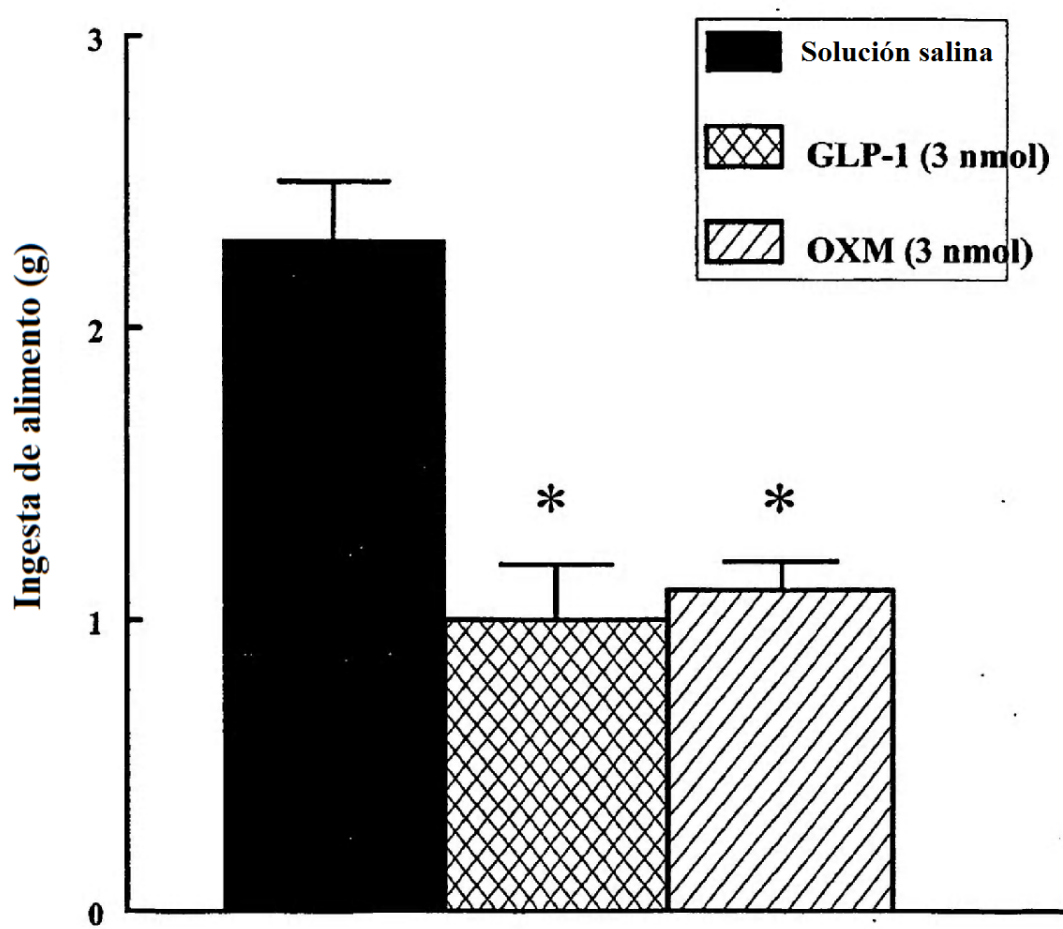
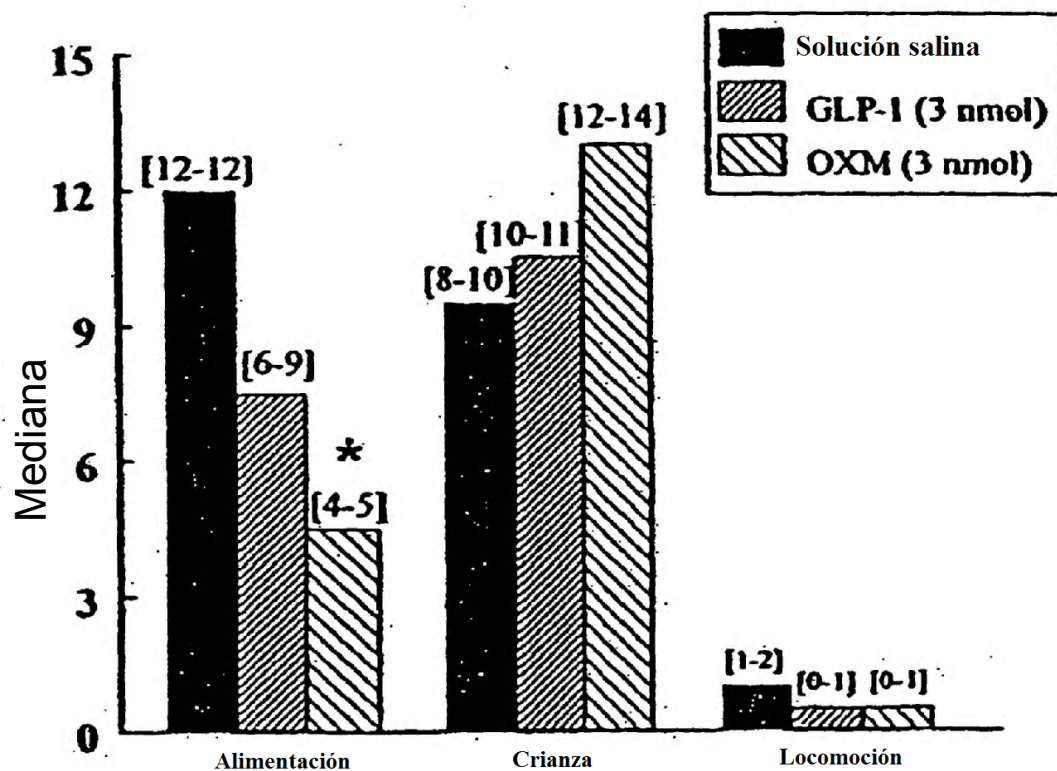
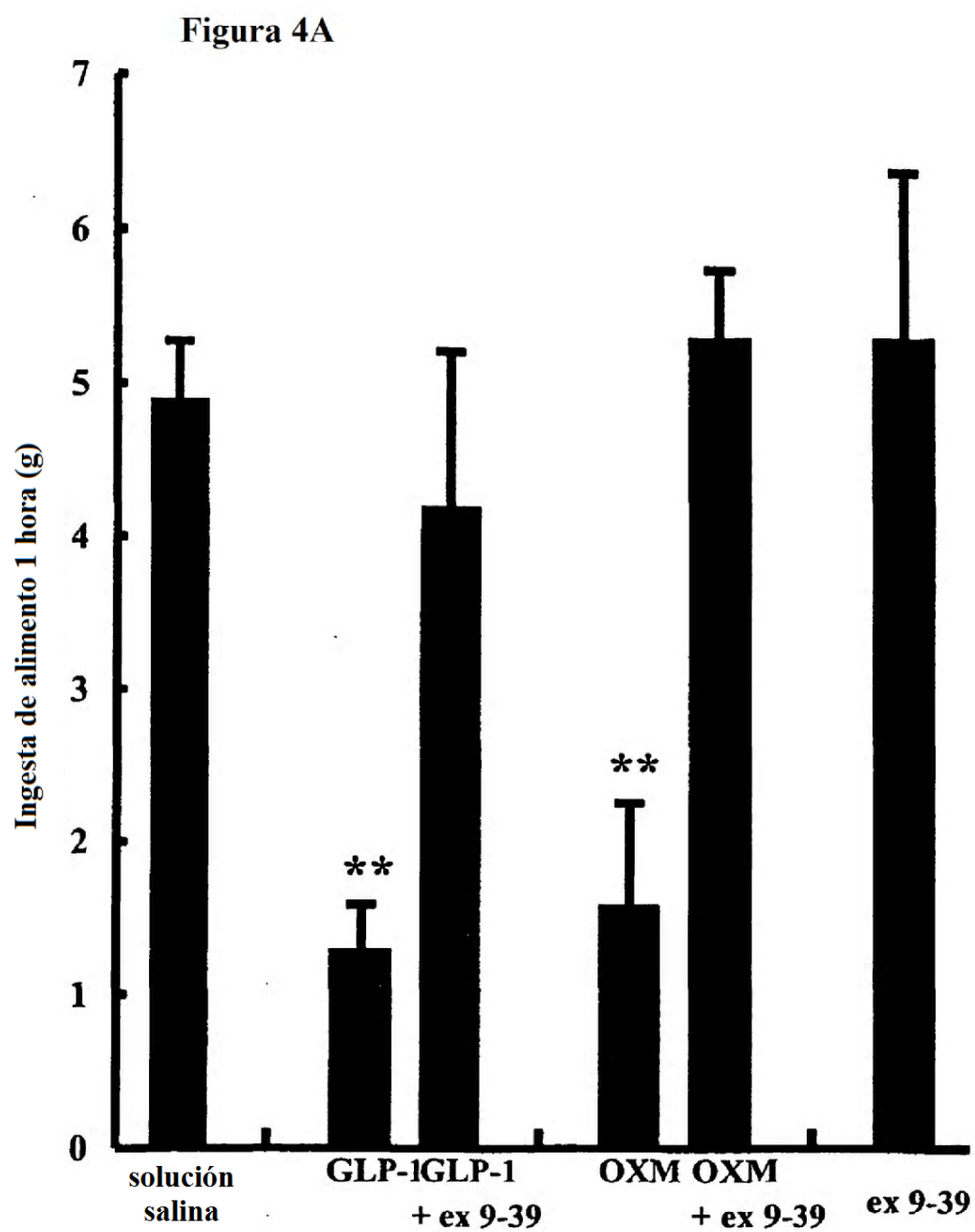


Figura 3B





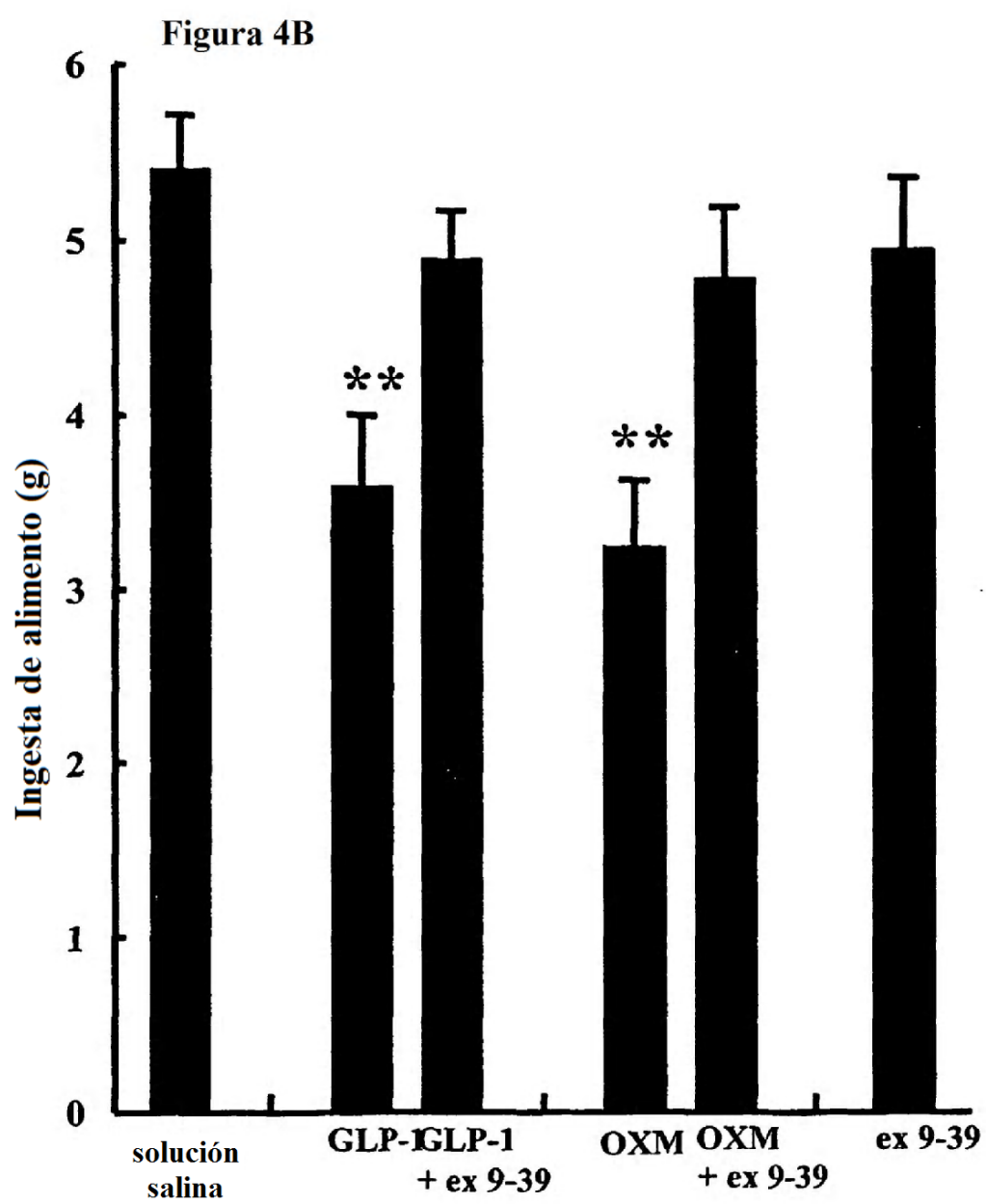


Figura 5

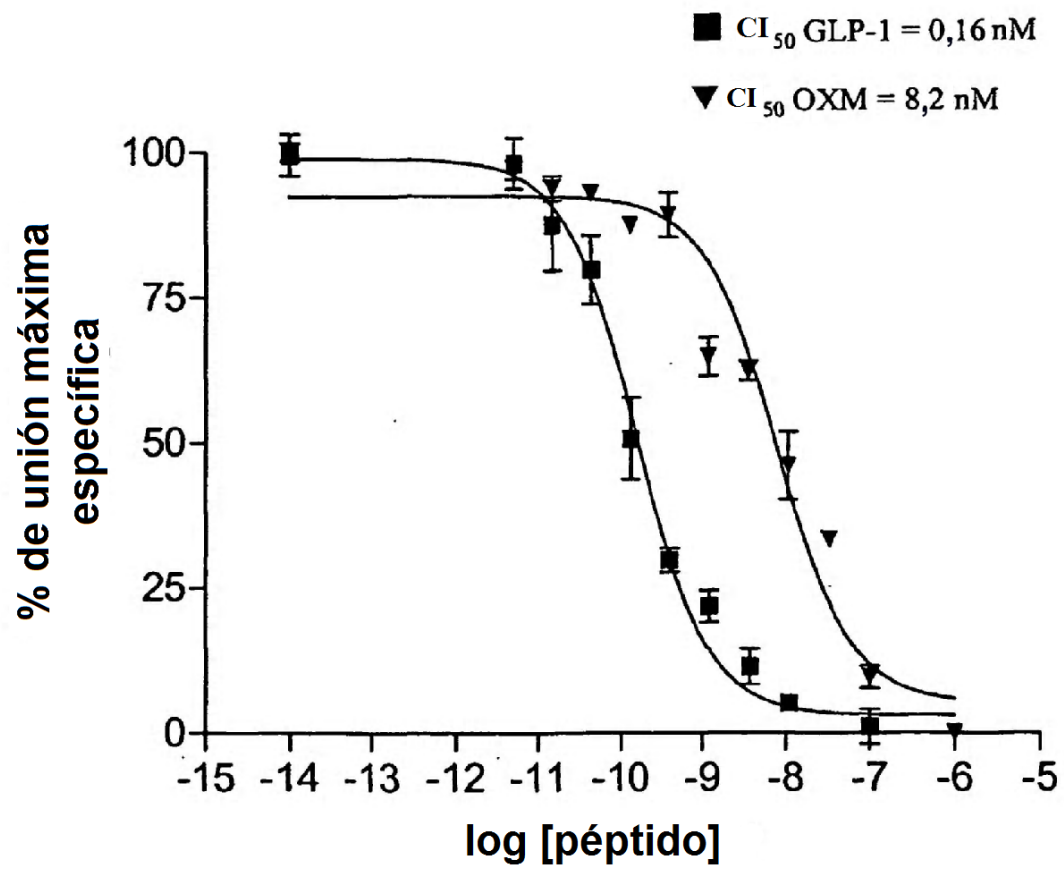


Figura 6a

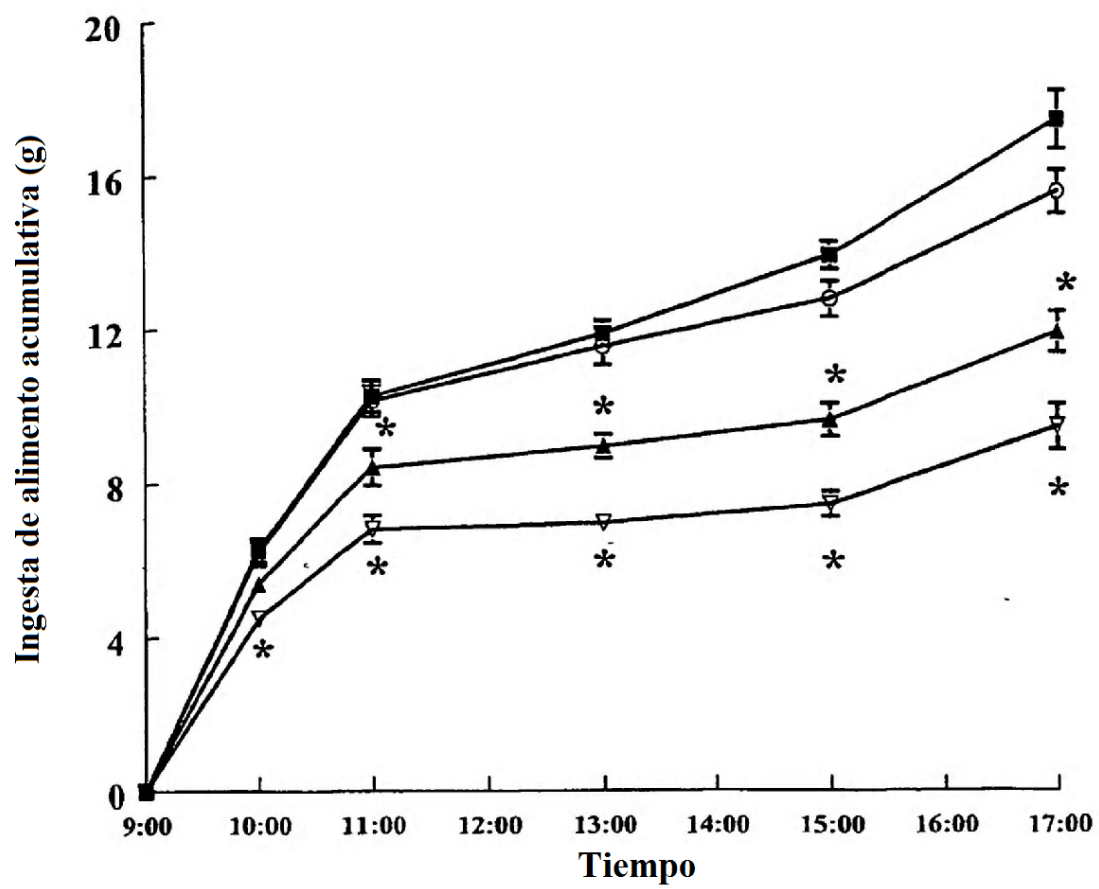


Figura 6b

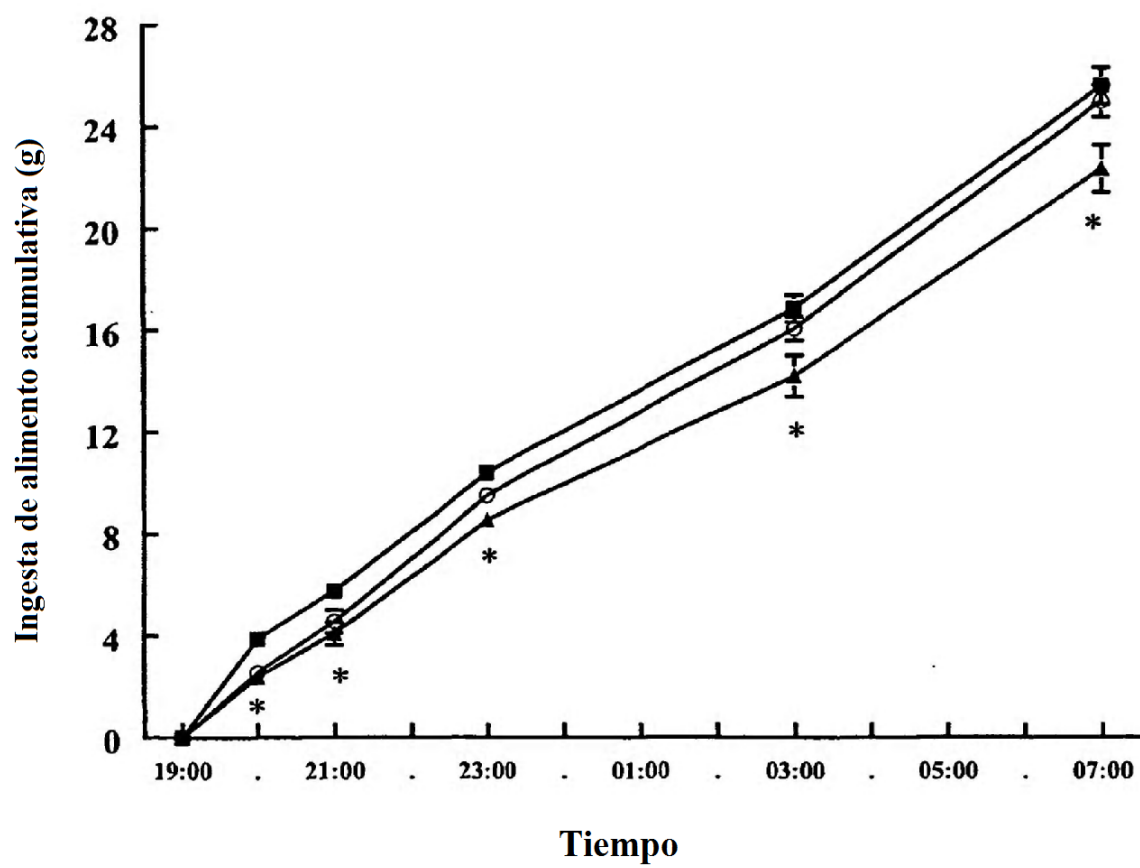


Figura 7a

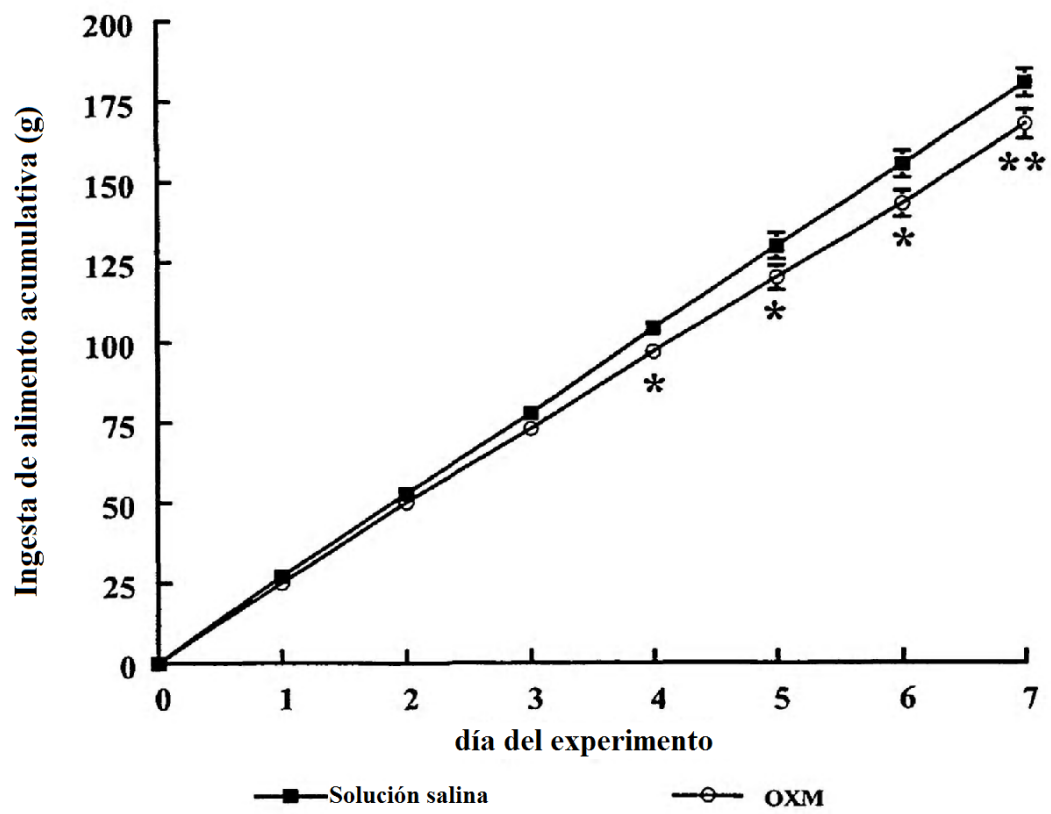


Figura 7b

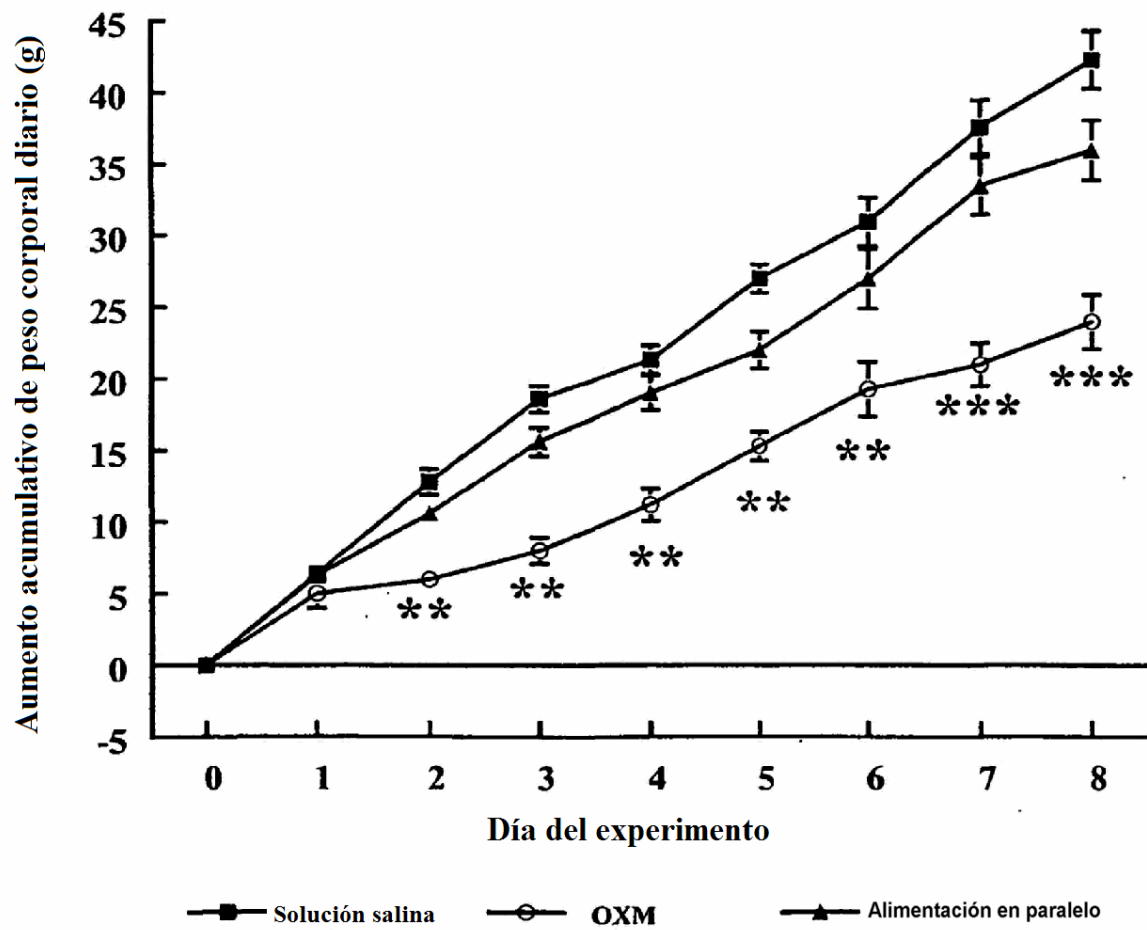


Figura 8

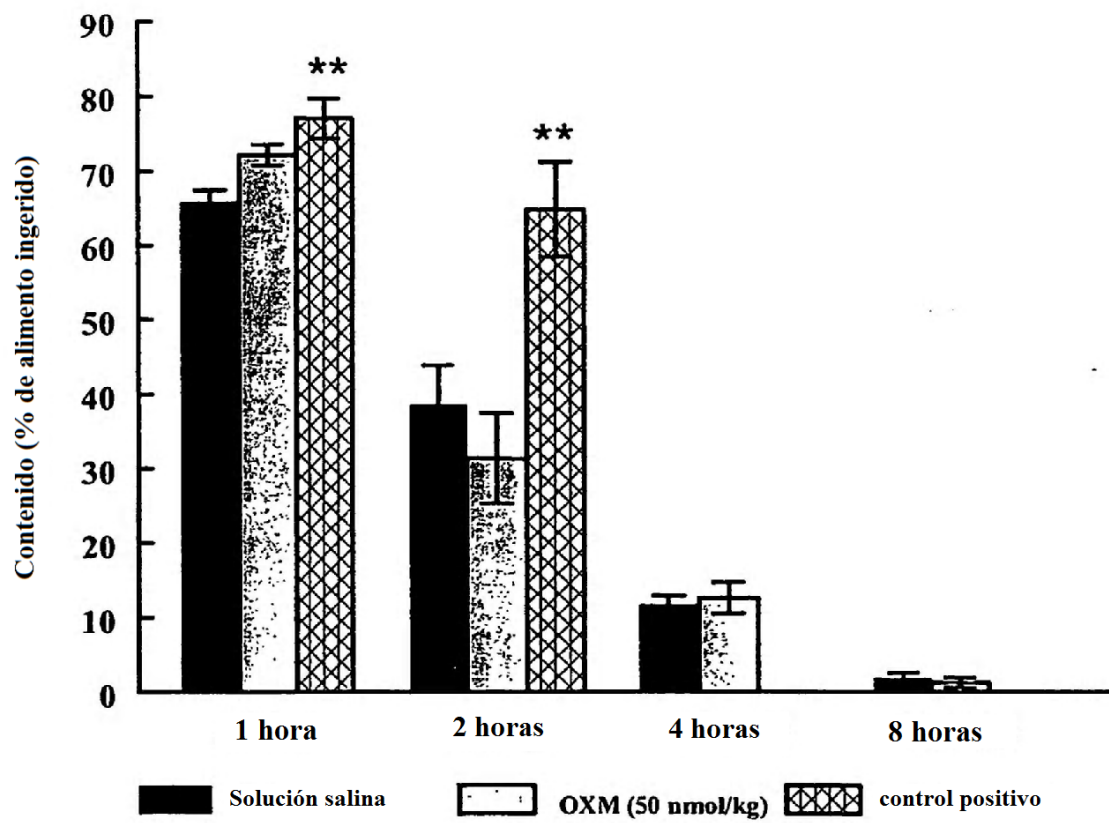


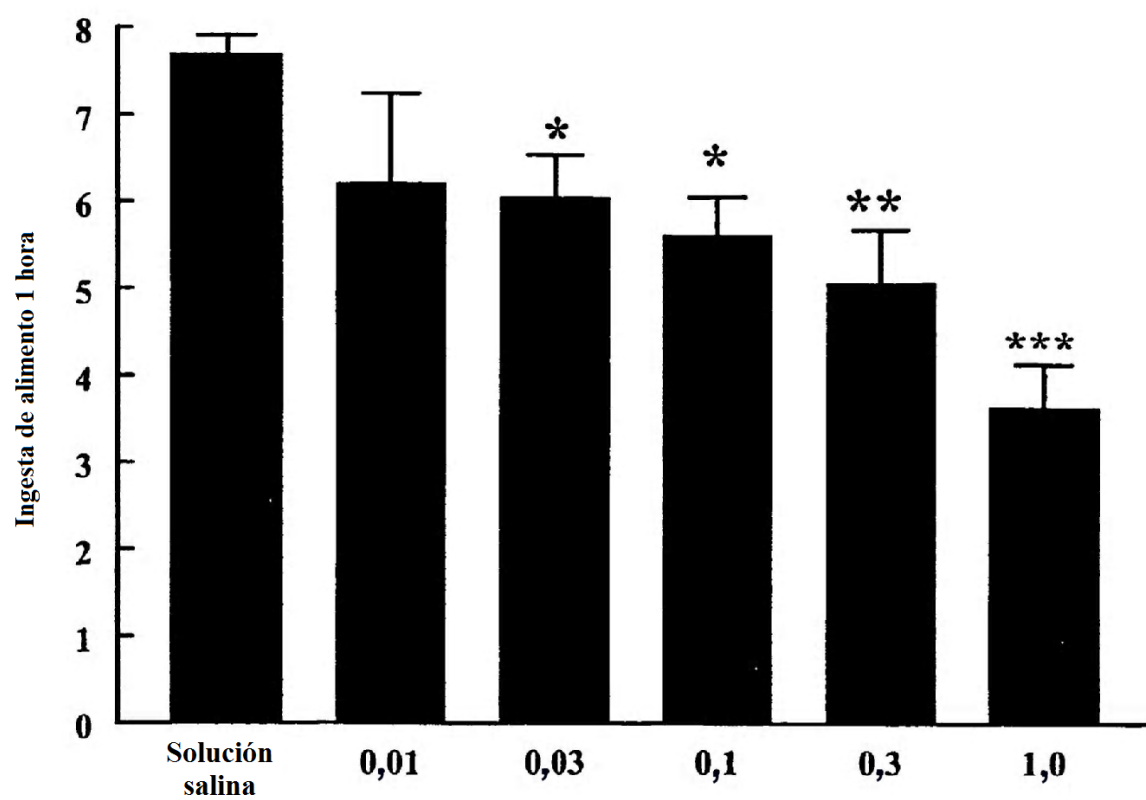
Figura 9

Figura 10

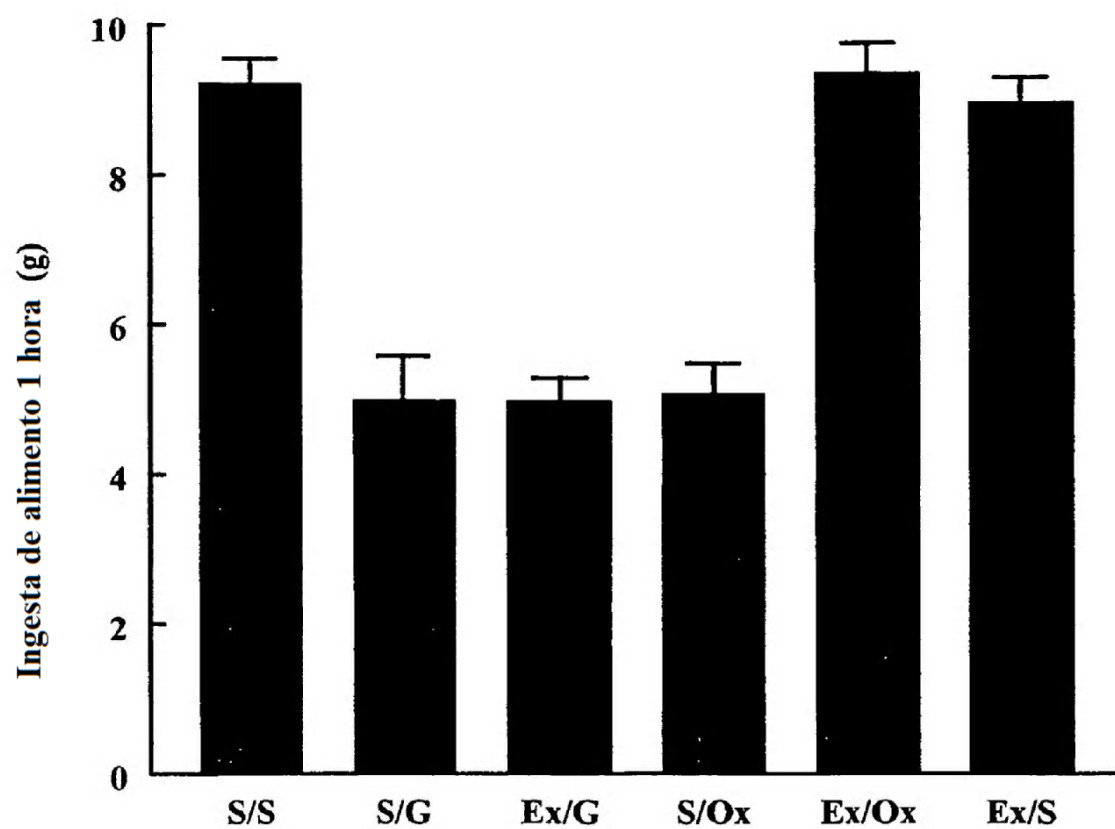
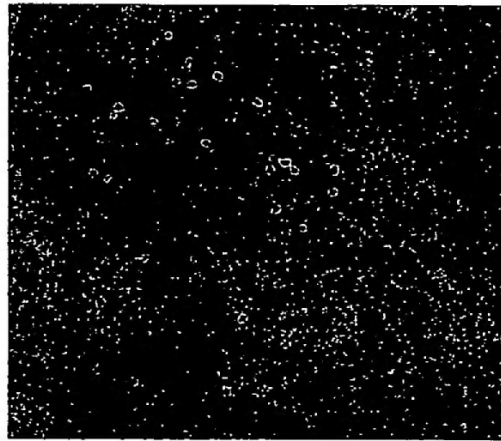
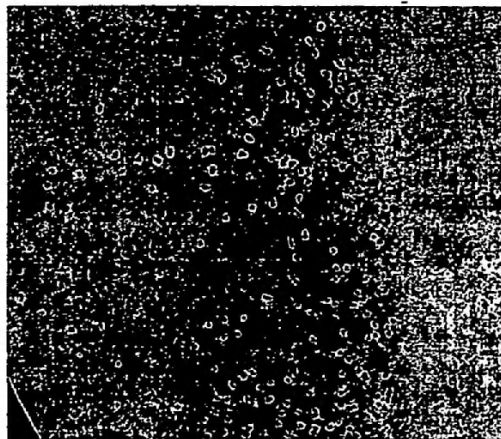


Figura 11a

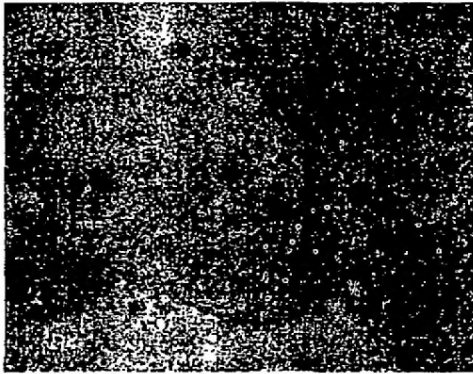


A



B

Figura 11b



A)



B)



C)