

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 672**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/11** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11725971 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2571511**

54 Título: **Nuevas utilizaciones de las moléculas del tipo de la oxitocina y los métodos relacionados**

30 Prioridad:

**18.05.2010 US 201061345616 P**

**28.02.2011 US 201161447103 P**

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

**14.01.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE GENÈVE (100.0%)**

**24 rue du Général-Dufour**

**1211 Genève 14, CH**

72 Inventor/es:

**ROHNER-JEANRENAUD, FRANÇOISE y**

**DEBLON, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

**ES 2 526 672 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

Nuevas utilizaciones de las moléculas del tipo de la oxitocina y los métodos relacionados.

5 **Ámbito de la invención**

La presente invención se refiere a las sustancias y a las composiciones de las mismas en el tratamiento de la obesidad y/ o resistencia a la insulina. En particular, la invención se refiere a las sustancias y composiciones de las mismas útiles en el tratamiento del síndrome metabólico.

10

**Antecedentes de la invención**

De acuerdo con una estimación mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2005, al menos 400 millones de adultos presentan exceso de peso corporal y la mayoría de ellos sufren de patologías relacionadas con este sobrepeso. La OMS estima que de aquí a 2015, 2300 millones de adultos van a sufrir de sobrepeso y que 700 millones de adultos van a ser obesos. La obesidad se asocia con los niveles aumentados de circulación en plasma de ácidos grasos libres y de triglicéridos que contribuyen a la resistencia a la insulina en tejidos periféricos tales como el músculo esquelético. En la obesidad, los tejidos adiposos se agrandan y presentan un perfil alterado de secreción de hormonas, tales como adipocinas como la leptina y adiponectina, que desempeñan un papel en el control del peso del cuerpo, la sensibilidad a la insulina, la inflamación, la angiogénesis y el metabolismo de los lípidos, en comparación con los individuos sanos.

Es conocido que ese exceso de peso corporal y en particular la adiposidad, está directamente relacionado con una reducción en la sensibilidad a la insulina, generalmente compensada por una estimulación adicional de la secreción de insulina pancreática para prevenir un aumento en los niveles de la glucosa en la sangre. Por lo tanto, la adiposidad aumentada, especialmente en la región abdominal, es conocida por ser un factor fuerte de riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina que puede entonces progresar en la diabetes de tipo 2. La aumentada resistencia periférica a la insulina, definida como una respuesta menos eficaz de los tejidos a la insulina en términos de absorción de la glucosa y la inhibición de la producción de glucosa hepática, conduce primero a que las  $\beta$ -células tengan un intento inicial de anular la demanda creciente de la insulina y entonces den como resultado en una alteración en su papel funcional y una disminución en su cantidad, una disfunción que conduce a la hiperglucemia y que caracteriza a la diabetes de tipo 2.

Además, la obesidad es uno de los principales componentes del síndrome metabólico, caracterizado como un clúster de síndromes incluyendo obesidad central además de por lo menos otras dos condiciones seleccionadas de los triglicéridos elevados en suero, bajos niveles de colesterol de alta densidad (HDL), presión arterial elevada y la glucosa en ayunas elevada debido a la resistencia a la insulina. Los pacientes con síndrome metabólico tienen el doble de probabilidades de morir y tres veces más probabilidades de tener un ataque al corazón o un infarto comparados con personas sin el síndrome. Adicionalmente, las personas con síndrome metabólico tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar la diabetes de tipo 2. Sobre el 60% de los pacientes con síndrome metabólico progresará a la diabetes de tipo II, un 50% desarrollará una enfermedad cardiovascular, más del 35% sufrirá un infarto agudo de miocardio y hasta un 20% va a sufrir un accidente cerebrovascular. Se estima que alrededor del 20-25% de la población adulta del mundo tiene el síndrome metabólico.

Además, la obesidad es también conocida por ser un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de otros trastornos, tales como algunos tipos de cáncer.

Por lo tanto, hay un enorme páramo y unas necesidades económicas para el desarrollo de nuevos tratamientos con la finalidad de gestionar la obesidad y/o la resistencia a la insulina. Existe también una necesidad para el desarrollo de tratamientos para el síndrome metabólico debido a que actualmente no hay un tratamiento disponible para este síndrome multi componente y este síndrome es la fuente de trastornos adicionales tales como severas complicaciones cardiovasculares y diabéticas.

La oxitocina (OT) es una hormona nonapéptido neuro hipofiseal (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly (ID SEC. Numero: 1)) (cisteína-tirosina-isoleucina-glutamina-asparagina-cisteína- prolina-leucina-glicina) sintetizada tanto centralmente como periféricamente y que ejerce diversos efectos fisiológicos. Dentro del sistema nervioso central (SNC), el gen OT está expresado en las neuronas del paraventricular hipotalámico (PVN) y el núcleo supraóptico (SON). Las neuronas magnocelulares OT en estos núcleos proyectan a la neurohipófisis y son la mayor fuente de OT liberada sistémicamente, mientras que las neuronas OT parvocelulares del PVN proyectan centralmente. La OT es sintetizada periferalmente en varios órganos, tales como el ovario, los testículos, el timo, el riñón y el corazón. Hasta ahora, ha sido clonada una sola OT receptora (OTR), que está expresada en varios tejidos, incluyendo el tejido adiposo. De acuerdo con una distribución tan amplia en su producción y centros de unión, ha sido demostrado que la OT está implicada en varios procesos centrales y periféricos (Gimpl et al., 2001, *Physiol. Rev.*, 81, 629-683). La OT es utilizada actualmente para la estimulación de la contracción uterina con el fin de inducir el parto, para el control de la hemorragia posparto después del parto de la placenta y para la estimulación de la lactancia (Pitocin<sup>®</sup>, Parke-Davis, Morris Plains, N.J. y Syntocinon<sup>®</sup>, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ).

65

La administración de OT ha sido divulgada también para aumentar la respuesta sexual femenina y para ser beneficiosa en el tratamiento de la disfunción sexual masculina (Pfaus, 2009, J. Sex. Med. Jun., 6, 1506-33).

Muchmore et al., 1981, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 256 (1), 365-372 se refiere a una existencia hipotética de dos clases distintas de receptor OT para explicar el mecanismo de acción dual observado de la OT, que ha sido completamente abandonado desde entonces.

Hanif et al., 1982, MOLECULAR PHARMACOLOGY, 22 (2) 381-388, *divulga la inducción in vitro por oxitocina de resistencia a la insulina en los adipocitos de rata aislados.*

Fabian et al., 1977, ACTA UNIVERSITATIS CAROLINAE. MEDICA. MONOGRAPHIA, nº 77 Pt 1, 141-145 *muestra una reducción de ácidos grasos no esterificados de plasma (AGNE) en presencia de oxitocina.*

El documento de patente WO 2008/008357 se refiere a los métodos que utilizan factores de saciedad para el tratamiento de los trastornos asociados con un no deseable nivel de factor de saciedad.

CAMERINO, 2009, OBESITY, 17(5), 980-984 se refiere a un ratón genéticamente diseñado (*knock out mouse*) mediante la OT (OT KO) (Oxt -/-).

KATSUHIKO ET AL., New aspects of oxytocin receptor function revealed by knockout mice: sociosexual behavior and control of energy balance, Section V (*Nuevos aspectos de la función del receptor de oxitocina revelado por ratones knockout: comportamiento sociosexual y control de balance energético, Sección V,*) PROGRESS IN BRAIN RESEARCH, ELSEVIER AMSTERDAM, NL, 170, 79-9 describe un ratón KO receptor de OT (OTR KO) (Oxtr-/-).

## Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con el hallazgo inesperado de que la administración periférica de la OT en un modelo de obesidad inducida mediante una dieta alta en grasa induce una disminución, dependiente de la dosis, de aumento de peso corporal debida al metabolismo mejorado de los lípidos, en particular el aumento de lipólisis y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo, acompañada por mejoras en la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, independientemente de la ingesta de alimentos.

Un primer aspecto de la invención proporciona un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para la represión o el tratamiento de un trastorno seleccionado de la obesidad y de resistencia a la insulina, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o agonista de la oxitocina es para ser administrado periféricamente.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un uso de un derivado seleccionado de oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno seleccionado de obesidad y de resistencia a la insulina, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o agonista de la oxitocina es para ser administrada periféricamente.

Un tercer aspecto de acuerdo con la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un derivado seleccionado de oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina combinados con por lo menos un co-agente útil en el tratamiento una enfermedad o un trastorno seleccionado de la obesidad y la resistencia a la insulina y por lo menos un portador aceptable farmacéuticamente.

## Descripción de las figuras

**La figura 1** muestra el efecto de la administración central de la OT en la ganancia de peso corporal en un modelo de rata inducida a la obesidad mediante una dieta alta en grasas tal como se describe en el Ejemplo 1. **A:** Ganancia acumulativa de peso corporal durante el período de tratamiento de 14 días (semanas 5 a 7 de dieta alta en grasas, 45%) de (●) controles de ratas con infusión de solución salina y (◇) con infusión de OT (1,6 nmol/d). **B:** Ganancia delta de peso corporal y **C:** ingesta de alimentos acumulada durante el período de tratamiento de 14 días de controles de ratas con la infusión de solución salina (barras negras) y con la infusión de OT (1,6 nmol/d) (barras blancas). **D:** la eficiencia alimentaria (ratio de ganancia de peso corporal con relación a la ingesta de alimentos acumulada durante el período experimental de 14 días).

**La figura 2** muestra el efecto de la administración central de la OT sobre el metabolismo de lípidos en un modelo de rata inducida a la obesidad mediante una dieta alta en grasas tal como se describe en el Ejemplo 1. **A:** La expresión del ácido ribonucleico mensajero ARNm de las enzimas implicadas en la absorción de los triglicéridos, la lipogénesis y la lipólisis en el tejido adiposo blanco epididimal (TABe) de los controles de ratas con infusión de solución salina (barras negras) y con infusión de OT (1,6 nmol / d) (barras blancas). **B:** la expresión del ARNm de PPAR-alfa y de enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco epididimal (TABe) de las ratas con controles de infusión de solución salina (barras negras) y con infusión de OT- (1.6 nmol/d) (barras blancas).

**La figura 3** muestra el efecto de la administración central de la OT contra la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas tal como está descrito en el Ejemplo 1. **A:** delta glucosa y **B:** los

niveles de insulina delta medidos durante el Test de Tolerancia a la Glucosa TTG intraperitoneal (1,5 g/kg) antes del tratamiento (A) (3 semanas de dieta alta en grasas, 45%; n = 16 ratas), al final del tratamiento (7 semanas de dieta alta en grasas, 45%; n = 6 para cada tratamiento) para (●) controles de ratas con infusión de solución salina y (◇) con infusión de OT (1,6 nmol/d). **C:** Ratio de infusión de glucosa (RIG) durante clamps euglucémico hiperinsulinémico en los controles de ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasas (DAG) con infusión de solución salina (barra negra) y con infusión de OT (barra blanca) (infusión de de OT intracerebroventricular (i.c.v.) durante 14 días (1,6 nmol/d)). **D y E:** Índice de utilización de insulina estimulada por glucosa medido durante clamps euglucémicos hiperinsulinémicos en diferentes tipos de músculos (D): cuádriceps rojo (QR) cuádriceps blanco (QB), gastrocnemio rojo (GR), gastrocnemio blanco (GB), sóleo (S), tibial (Tib) (14 días de infusión de OT i.c.v. (1,6 nmol/d)) y en diferentes tipos de depósitos de tejido adiposo (E): tejido adiposo blanco inguinal (TABi) y epididimal (TABe) de controles de ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasas (DAG) con infusión de solución salina (barras negras) y con infusión de OT (barras blancas).

Las figuras 1-3: Los valores son medios  $\pm$  ESM (error estándar de la media) de 6 a 7 animales por grupo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 comparado con controles.

**La figura 4** muestra el efecto directo de la OT en el metabolismo de los lípidos en los adipocitos *in vitro* tal y como se describe en el Ejemplo 2. **A:** La expresión de ARNm de las enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico en los adipocitos diferenciados 3T3-L1 después de 24 h de incubación con solución salina (barras negras) ó 5  $\mu$ M de OT (barras blancas) (tres experimentos independientes realizados en diferentes series de adipocitos cultivados 3T3 L1) **B:** El contenido de oleiletanolamida (OEA) en adipocitos diferenciados 3T3 L1 después de 24 h de incubación con solución salina (barra negra) ó 5  $\mu$ M de OT (barra blanca) (dos experimentos independientes realizados en diferentes series de adipocitos cultivados 3T3 L1).

**La figura 5** muestra el efecto de la administración periférica de la OT en un modelo de rata inducida a la obesidad mediante una dieta alta en grasas tal y como se describe en el Ejemplo 3. **A:** Ganancia de peso corporal acumulado durante el periodo de tratamiento de 14 días (semana 5 a 7 de la dieta alta en grasas, 45%) de (●) controles de ratas con infusión de solución salina, (◇) y con infusión de OT (50 nmol/d) y controles (A) de la alimentación pareada (pair-fed) (AP). **B:** La ingesta alimentaria acumulada durante el período de experimento de 14 días de controles de ratas con infusión de solución salina (barra negra) y con infusión de OT (50 nmol/d, barra blanca) y controles de AP (barras grises). **C:** Los parámetros de la composición corporal (masas adiposa y magra) durante un período de tratamiento de 10 días (D10) de controles de las ratas con infusión de solución salina (barra negra), y de infusión con OT (50 nmol/d, barra blanca) y controles de AP (barra gris). **D:** Los parámetros de composición corporal delta entre el comienzo (D0) y el final (D10) de un periodo de tratamiento de 10 días. **E:** La relación de diferentes pesos de almohadillas de grasas (tejido adiposo blanco inguinal (TABi); tejido adiposo blanco epididimal (TABe) sobre el peso corporal de los controles de las ratas con infusión de solución salina (barra negra), y con infusión de OT (50 nmol/d, barra blanca) y controles de AP (barras grises). Los valores son medios  $\pm$  ESM (error estándar de la media) de 7 a 8 animales por grupo. \* P < 0,05 en comparación con los controles. **F:** Las fotografías de tejido adiposo blanco epididimal (TABe) recién diseccionado y de almohadillas de grasa de tejido adiposo blanco mesentérico (TABm) de controles de ratas con infusión de solución salina, con infusión de OT (50 nmol/d) y controles de AP.

**La figura 6** muestra el efecto de la administración periférica de la OT en la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasas (DAG) tal y como se describe en el Ejemplo 4. **A:** El modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina (MHO-RI) de controles de ratas con infusión de solución salina (barra negra), con infusión de OT (50 nmol/día) (barra blanca) y controles de la alimentación pareada (AP) (barra gris). **B:** El ratio de infusión de glucosa (RIG) durante clamps euglucémico hiperinsulinémico en controles de ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasas con infusión de solución salina (barra negra), con infusión de la OT (50 nmol/día) (barra blanca) y controles de la AP (barras grises). Los valores son medios  $\pm$  ESM (Error Standard de la Media) de 7 a 9 animales por grupo. \* P < 0,05 en comparación con los controles.

**La figura 7** muestra el efecto de la administración de la OT (A) central y (B) periférica en los niveles de glicerol en plasma en un modelo de rata de obesidad inducida por dieta alta en grasas tal y como se describe en los Ejemplos 1 y 5. **A:** Los niveles de glicerol en plasma de controles de ratas con infusión de solución salina (barra negra) y de infusión con la OT (1,6 nmol / día) (barra blanca). **B:** Los niveles de glicerol en plasma de controles de ratas con infusión de solución salina (barra negra) y de infusión con la OT (50 nmol/día) (barra blanca) y controles de la AP (barras grises). Los valores son medios  $\pm$  ESM (Error Standard de la Media) de 6 a 8 animales por grupo.

**La figura 8** muestra el efecto de la administración periférica de carbetocina en un modelo de rata de obesidad inducida por una dieta alta en grasas tal y como está descrito en el Ejemplo 6. **A:** La ganancia peso corporal acumulativo durante el período de tratamiento de 14 días (semana 5 a 7 de dieta alta en grasas, 45%) de (●) los controles de ratas con infusión de solución salina las ratas ( $\Delta$ ) infusión de carbetocina (5 nmol/d) y controles asociados (A) de alimentación pareada (AP), (◇) ratas con infusión de carbetocina (50 nmol/d) y controles asociados de AP (◆). **B:** La ingesta de alimentos acumulada durante el período de experimento de 14 días de controles ratas con infusión de solución salina (barra negra), ratas con infusión de carbetocina (5 nmol/d, barra blanca) y controles de la AP asociados (barra gris), infusión de carbetocina en ratas (50 nmol/d, barra blanca rayada) y con controles AP asociados (barra rayada gris). **C:** Cambios porcentuales en la grasa corporal durante un período de tratamiento de 10 días en controles de ratas con infusión de solución salina (barra negra), con infusión de carbetocina (5 nmol/d, barra blanca) y

con controles de la AP asociados (barra gris), con infusión de carbetocina (50 nmol/d, barra blanca rayada) y controles de la AP asociados (barra rayada gris). Los valores son medios  $\pm$  ESM (Error Standard de la Media) de 7 a 8 animales por grupo \*  $P < 0,05$  en comparación con los controles.

La figura 9 representa las secuencias de cebador utilizadas para la PCR cuantitativa (en tiempo real) tal y como está descrito en el Ejemplo 1.

### Descripción detallada

El término "derivado de la oxitocina" tal como se menciona en este documento, incluye fragmentos de péptido, análogos del péptido y derivados químicamente modificados o sales de péptidos, naturales o sintéticos, terapéuticos o profilácticamente activos, presentando actividad similar a la actividad o reteniendo sustancialmente la actividad de la molécula parental de la oxitocina. Por ejemplo, los derivados de la oxitocina incluyen la oxitocina o análogos de péptido de oxitocina que son químicamente modificados, por ejemplo, por amidación del terminal carboxilo (-NH<sub>2</sub>), el uso de aminoácidos D en la secuencia peptídica, la incorporación de fracciones pequeñas no-peptidil, así como la modificación de los propios aminoácidos (es decir, la alquilación o esterificación de la cadena lateral grupos R) (peptidomiméticos). En particular, el término derivado de oxitocina incluye "análogos de la oxitocina" que significa polipéptidos sustancialmente homólogos a la oxitocina humana nativa, respectivamente, pero que tienen una diferente secuencia de aminoácidos diferente a la de la oxitocina humana nativa debido a uno o más supresiones, inserciones o sustituciones. Sustancialmente, homólogos significa una secuencia de aminoácidos variante, eso es, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% idéntico a las secuencias de aminoácidos nativas, de acuerdo con lo establecido anteriormente. La identidad porcentual de dos aminoácidos o dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse por inspección visual y/o cálculo matemático o más fácilmente mediante la comparación de la información de la secuencia mediante un programa informático conocido utilizado para la comparación de la secuencia tal como el paquete Clustal versión 1.83. Los análogos de la oxitocina pueden abarcar una secuencia que tiene por lo menos un aminoácido sustituido conservativamente, lo que significa que un residuo de un aminoácido dado es sustituido por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los derivados de la oxitocina pueden incluir, pero no están limitados a los que se describen en el documento de patente WO 2008/042452 ó EP 1928484, cuyos contenidos están incorporados en este documento en su totalidad como referencia, tal como 4-treonina-1-hidroxidoaminoxitocina, 4-serina, 8-isoleucina-oxitocina, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina y su análogo deamino, (2, 4-diisoleucina)-oxitocina, análogo deamino oxitocina, una larga activa oxitocina análoga, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tir(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina (Núm. ID. SEC: 2: Butiril-i(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicina-oxitocina (TG-OT), (1-acido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-1-carboxitocina, Ile-conopresina, atosiban, oxyipresina, deamino-6-carba-oxitóxino (dC60), desmopresina y 1-deamino-oxitocina en la que está reemplazado el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 por un tioéter.

El término "agonista de la oxitocina" incluye las sustancias que son capaces de interactuar con los receptores de oxitocina (OTR) y/o mimetizar la actividad biológica de la oxitocina, en particular a través de su interacción con el OTR: Por ejemplo, los agonistas de la oxitocina incluyen aquellos descritos en los documentos de patente WO 2007/050353, WO 2005/023812, WO 2004/072083 y WO 03/016316, los contenidos de los cuales están incorporados en este documento en su totalidad como referencia. Los agonistas de la oxitocina incluyen péptidos, peptidomiméticos y moléculas pequeñas. En particular, incluyen WAY-267.464 (4-(3,5-dihidroxi-bencil)-N-(2-metil-4-[(1-metil-4,10-dihidropirazolo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-5(1H)-il)carbonil]benzil)piperazina-1-carboxamida), decomoton y 4,-(3,5-Dihidroxi-bencil)-piperazina-1-ácido carboxílico 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetra-aza-benzo[f]azuleno-9-carbonilo)-dipéptido.

El término "peptidomiméticos" está definido como un análogo de péptido que contiene elementos estructurales no peptídicos, en los que el péptido es capaz de mimetizar o agonizar la(s) acción(es) biológica(s) de un péptido parental natural.

Otras formas útiles de derivados de la oxitocina, análogos de la oxitocina o agonistas de la oxitocina en el contexto de la invención incluyen otras sales activas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, así como los isómeros activos, enantiómeros, polimorfos, solvatos, hidratos y/o pro medicamentos de dichos compuestos.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador compuesto de un material que no es biológicamente o de cualquier otra manera indeseable.

El término "portador" se refiere a cualquier componente presente en una formulación farmacéutica que sean diferentes de los agentes activos y de esta manera incluye los diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, llenadores, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, conservantes y los similares.

El término "obesidad" incluye una enfermedad o trastorno que incluye tener una alta cantidad de grasa corporal. Por lo general, los humanos obesos tienen un índice de masa corporal (IMC) (peso corporal de un individuo dividido por el cuadrado de su altura) de alrededor de 30 kg/m<sup>2</sup> o mayor. La obesidad es conocida por estar acompañada de riesgos mayores para varias comorbilidades tales como la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la enfermedad cardiovascular y la artritis.

El término "resistencia a la insulina" se refiere a los niveles elevados de glucosa en la sangre (los niveles de glucosa en ayunas de 110-126 mg/dL; niveles de glucosa de más de 140 mg/dL a las 2 horas después de la administración de 75 g de glucosa).

El término "síndrome metabólico" se refiere a un grupo de síndromes incluyendo la obesidad central (exceso de grasa en la abdomen medido en la circunferencia de la cintura, normalmente igual o superior a 80 cm en las mujeres

e igual o superior a 90 cm en los varones) además por lo menos otras dos condiciones seleccionadas de la dislipidemia (en particular los triglicéridos elevados en suero, típicamente igual o superior a 150 mg/dL y los niveles bajos de colesterol de alta densidad (HDL) normalmente inferior a 40 mg/dL en los varones y de 50 mg/dL en las mujeres), elevada presión arterial (PA), normalmente igual o superior a 130 mm Hg para PA sistólica e igual o superior a 85 mm Hg para PA diastólica o la resistencia a la insulina.

Tal y como se utiliza en este documento, "tratamiento" y "tratando" y los similares generalmente significan obtener un deseado efecto farmacológico y fisiológico. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención o de prevenir parcialmente una enfermedad, síntoma o condición de la misma o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad, condición, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal como se utiliza en este documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, sobre todo un ser humano e incluye: (a) prevención de la enfermedad que se produzca en un sujeto que puede estar pre dispuesto a la enfermedad, pero que aún no se ha diagnosticado como que la tiene; (b) inhibición de la enfermedad, es decir, deteniendo su desarrollo; o alivio de la enfermedad, es decir, causando la regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o condiciones de tal manera que se mejora o se reparan los daños.

En particular, el tratamiento de la obesidad comprende normalizar el peso corporal o mejorar el cuerpo con sobrepeso y en el particular el depósito de grasa central. El tratamiento de la obesidad comprende también una reducción del riesgo de co-morbilidades relacionadas con la obesidad mencionado más arriba.

En particular, el tratamiento de la resistencia a la insulina se compone de normalizar o mejorar una discapacidad de las respuestas biológicas normales tanto a la insulina exógena o endógena, típicamente a través del control de los niveles de glucemia o de la producción de insulina. El tratamiento de la resistencia a la insulina comprende la prevención o el retraso de la progresión del de síndrome hacia la diabetes de tipo 2.

En particular, el tratamiento del síndrome metabólico comprende normalizar o mejorar, por lo menos uno de los componentes del síndrome, independientemente de la pérdida de peso. En un aspecto particular, el tratamiento del síndrome metabólico comprende la prevención del desarrollo de la diabetes de tipo 2.

El término "sujeto" tal y como es utilizado en este documento se refiere a los mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados en la presente invención incluyen al ser humano, los primates, los animales domesticados tales como el ganado vacuno, las ovejas, los cerdos, los caballos, los roedores de laboratorio y los similares.

El término "eficacia" de un tratamiento de acuerdo con la invención puede ser medido basado en los cambios en el curso de la enfermedad ante un uso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento, de acuerdo con la invención puede ser medida por una disminución de la obesidad central (es decir disminución de la circunferencia del talle, disminución de la masa grasa) o una disminución a la resistencia a la insulina mediante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OTTG), prueba de glucosa en ayunas (TGA) o clamp euglicémico hiperinsulinémico. Para otro ejemplo, la eficacia del tratamiento de la obesidad comprende una reducción de los triglicéridos en plasma y los similares.

#### *El método de preparación*

La oxitocina, loa derivados de la oxitocina, los agonistas de la oxitocina y los análogos de la oxitocina están comercialmente disponibles (por ejemplo NeoMPS, Estrasburgo, Francia) o pueden ser preparados fácilmente por la persona calificada, tal y como está descrito, por ejemplo, en US 2.938. 891 y US 3.076.797 y probado para la actividad biológica de acuerdo con los métodos conocidos. Todos los análogos o derivados peptídicos de la oxitocina descritos y/o contemplados en este documento se pueden preparar por síntesis química utilizando tanto tecnologías sintéticas automatizadas o tecnologías sintéticas de fase sólida manual o mediante el uso de técnicas moleculares recombinantes, técnicas que son de manera general conocidas en la Técnica.

#### *Las composiciones*

La invención proporciona agentes farmacéuticos o terapéuticos tales como las composiciones y los métodos para el tratamiento de un paciente, preferiblemente un paciente mamífero y más preferentemente un paciente humano que padece de un desorden médico y en particular un desorden seleccionado de la obesidad y de resistencia a la insulina.

En una realización particular, la invención proporciona los agentes farmacéuticos o terapéuticos tales como las composiciones y los métodos para el tratamiento de un paciente, preferiblemente un paciente mamífero y más preferentemente un paciente humano que padece un trastorno médico, en donde el desorden es el síndrome metabólico.

En una realización particular, la invención proporciona los agentes farmacéuticos o terapéuticos tales como las composiciones y los métodos para el tratamiento de un paciente, preferiblemente un paciente mamífero y más preferentemente un paciente humano que padece de un trastorno médico, en donde la enfermedad es la diabetes de tipo 2.

En una realización particular, la invención proporciona una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener al menos una sustancia seleccionada de oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina de acuerdo con la invención en cualquier forma descrita en este documento. Las composiciones de esta invención pueden componerse además de uno o más

ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables tales como el alumbre, los estabilizadores, los agentes antimicrobianos, los tamponadores, los agentes colorantes, los aromatizantes, los adyuvantes y los similares.

Las composiciones de acuerdo con la invención, junto con un adyuvante empleado convencionalmente, un portador, un diluyente o un excipiente pueden ser realizadas en la forma de las composiciones farmacéuticas y puede ser empleado como sólidos, tales como tabletas o cápsulas rellenas o líquidos tales como soluciones, suspensiones, pomadas, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con la misma, películas o geles, todo para uso oral o en forma de soluciones inyectables parenterales estériles (incluyendo subcutáneas) utilizadas mediante inyección o infusión continua. Si es deseado, se pueden preparar fácilmente composiciones de liberación sostenida, por ejemplo geles de liberación sostenida, películas, y parches transdérmicos. Las composiciones también pueden ser formuladas como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Las composiciones de esta invención tales como las formulaciones líquidas, incluyendo, pero no limitando a las suspensiones acuosas o aceitosas, las soluciones, las emulsiones, los jarabes y los elixires pueden ser para ser utilizadas como gotas, para uso en una inyección, como un aerosol o impregnadas en un tampón nasal.

Las composiciones inyectables se basan normalmente en solución salina estéril inyectable o solución salina con tampón fosfato u otros portadores inyectables conocidos en la Técnica. Tales composiciones farmacéuticas y sus formas unitarias de dosificación pueden incluir ingredientes en las proporciones convencionales, con o sin los compuestos activos adicionales o principios y tales maneras de formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del ingrediente activo en consonancia con la gama de dosis diaria prevista para ser empleada. De acuerdo con una realización particular, las composiciones de acuerdo con la invención son inyectables o inhalables. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos incluyendo, pero sin limitarse a los agentes de suspensión, los agentes emulsionantes, los vehículos no acuosos y los conservantes. Los agentes para suspensiones incluyen, pero no se limitan al jarabe de sorbitol, a la metil celulosa, al jarabe de glucosa/azúcar, a la gelatina, a la hidroxietil celulosa, a la carboximetil celulosa, al gel de estearato de aluminio y a las grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen, pero no se limitan a la lecitina, el monooleato de sorbitán y la acacia. Los conservantes incluyen, pero no están limitados al p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen pero no se limitan al poli (etileno glicol), el glicerol, la albúmina de suero bovino, al Tween®, al Span®. Otros materiales así como las técnicas de proceso para la formulación y las similares se establecen en la Parte 5 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, 2005, University of the Sciences en Filadelfia, Lippincott Williams & Wilkins, que está incorporada en el presente documento como referencia.

Las composiciones de esta invención también pueden formularse como una preparación de depósito, que puede ser administrada mediante implantación o mediante la inyección intramuscular. Las composiciones pueden ser formuladas con adecuados materiales poliméricos o hidrofóbicos (tales como una emulsión en un aceite aceptable, por ejemplo), con resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles (como una sal poco soluble, por ejemplo).

Las composiciones sólidas de esta invención pueden ser en forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional. Por ejemplo, las tabletas y las cápsulas para la administración oral pueden contener los excipientes convencionales incluyendo, pero sin limitarse a los agentes aglutinantes, los llenadores, los lubricantes, los disgregantes y los agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan al jarabe, a la acacia, a la gelatina, al sorbitol, a la goma tragacanto, al mucílago de almidón y a la polivinilpirrolidona. Los llenadores incluyen, pero no se limitan a la lactosa, el azúcar, la celulosa microcristalina, el almidón de maíz, el fosfato de calcio y el sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan al estearato de magnesio, al ácido esteárico, al talco, al polietilenglicol y a la sílice. Los disgregantes incluyen, pero no están limitados a la fécula de patata y al glicolato de almidón sódico. Los agentes humectantes incluyen, pero no se limitan al lauril sulfato de sodio.

Los comprimidos pueden ser recubiertos de acuerdo con métodos muy conocidos en la Técnica.

Las composiciones de esta invención también puede formularse para la administración nasal que puede ser en una forma incluyendo, pero no limitándolas a un aerosol nasal en polvo o líquido, una suspensión, gotas para la nariz, un gel, una película o ungüento, a través de un tubo o un catéter, mediante una jeringa, mediante packtail, mediante torunda (una almohadilla absorbente plana pequeña), mediante un tampón nasal o por infusión submucosal. La administración nasal del medicamento puede ser llevada a cabo tal como se describe en los documentos de patente EP 1928484 ó WO 2008/042452, por ejemplo mediante el uso de dispositivos, incluyendo, pero no limitándolos a los contenedores de dosis unitarias, los rociadores de bomba; los goteros, las botellas para apriete, los aerosoles sin conservantes y sin aire, los nebulizadores, los inhaladores de dosis medidas y los inhaladores presurizados de dosis medidas. En la Técnica, son conocidos los dispositivos para la administración nasal de medicamentos y existen varios que están comercialmente disponibles. Los aerosoles pueden ser dispensados mediante la utilización de un paquete presurizado o un nebulizador y un propulsor conveniente incluyendo, pero sin limitarse al diclorodifluorometano, al triclorofluorometano, al diclorotetrafluoroetano, a los hidrocarburos, al aire comprimido, al nitrógeno o al dióxido de carbono. Un sistema de aerosol requiere que el propulsor sea inerte con relación a la composición farmacéutica. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser controlada mediante la provisión de una válvula con el fin de administrar una cantidad medida exactamente. Los aerosoles nasales en polvo pueden ser formulados en la forma de microesferas dispensadas por un dispositivo nasal insuflador (dispositivo para soplar un gas, polvo o vapor en una cavidad del cuerpo) o un bote aerosol presurizado.

Los compuestos de esta invención también pueden ser administrados en formas de liberación sostenida o de sistemas de liberación sostenida para la administración de medicamentos (WO 2004/078147). Una descripción de los materiales representativos de liberación sostenida puede ser encontrada también en los materiales incorporados en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

*Los modos de administración*

5 Las composiciones de esta invención pueden ser administradas en cualquier forma incluyendo la inyección intravenosa, la vía oral, la administración mucosal (entrega a las superficies de la mucosa de la nariz, de los pasajes nasales, de la cavidad nasal, a las superficies mucosales de la cavidad oral incluyendo la encía, el piso de la cavidad oral, las mejillas, los labios, la lengua, los dientes; y a las superficies mucosas de o de alrededor del ojo incluyendo la conjuntiva, la glándula lacrimal, los conductos naso lacrimales, la mucosa del párpado superior o inferior y el ojo),  
 10 la administración intranasal (es decir, por aerosol, por gotas, por polvo, por gel, por película, inhalante u otros medios), la administración dérmica o transdérmica (es decir, la entrega a la piel incluyendo la cara, cuello, cuero cabelludo, cuerpo o combinaciones de los mismos) por ejemplo mediante inyección intradérmica o subcutánea combinaciones de las mismas.

*La combinación*

15 De acuerdo con la invención, la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina y las formulaciones farmacéuticas de los mismos pueden ser administradas solas o en combinación con un agente de cooperación útil en el tratamiento de la obesidad y / o resistencia a la insulina, tales como las sustancias útiles para el tratamiento, la estabilización, la prevención y/o el retraso de la obesidad y/o la resistencia a la insulina seleccionadas de las clases de las biguanidas, las glitazonas, las sulfonilureas, los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) o los agonistas de glucagón tipo 1 (GLP-1), tal como se describe en De Fronzo, 2010, Am. J. Med., 3 (1), S38-48.

20 La invención engloba la administración de un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina y las formulaciones farmacéuticas de las mismas a un individuo antes, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o co agentes útiles en el tratamiento de la obesidad y de la resistencia a la insulina (es decir, regímenes múltiples de medicamentos), en una cantidad terapéuticamente efectiva. Un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina o las formulaciones farmacéuticas de los mismos que es administrado simultáneamente con dichos co agentes puede ser  
 25 administrado en la misma o en diferente (s) composición (es) y por la misma o por diferente (s) vía (s) de administración.

De acuerdo con una realización, es proporcionada una formulación farmacéutica que comprende un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina combinados con por lo menos un co agente útil en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados de la obesidad y de la  
 35 resistencia de insulina y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención en donde el derivado es la oxitocina.

40 La dosis administrada a un individuo, como única o múltiples dosis, variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), grado de síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

45 En una realización particular, una cantidad efectiva de la oxitocina, un derivado de la oxitocina o un agonista de la oxitocina dependerá de la forma y composición que se utiliza para la administración. Típicamente, la cantidad efectiva de oxitocina, de un derivado de la oxitocina o de un agonista de la oxitocina administrado transmucosalmente o vía transdérmica es generalmente inferior a la dosificación utilizada cuando el agente es entregado por otras vías (por ejemplo, oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea).

50 En una realización particular, las dosis utilizadas para la administración de oxitocina, un derivado de la oxitocina o un agonista de la oxitocina incluyen, pero no se limitan a una cantidad efectiva dentro de la gama de dosis de 10 a alrededor de 1'500 µg, normalmente de alrededor de 20 a alrededor de 1'000 µg, tal como alrededor de 25 a alrededor de 750 µg.

55 En otra realización particular, las dosis utilizadas para la administración de oxitocina, un derivado de la oxitocina o un agonista de la oxitocina incluyen las dosis para la administración nasal tal como se describe en los documentos de patente EP 1928484 ó WO 2008/042452.

*Los pacientes*

60 En una realización, los pacientes de acuerdo con la invención son los pacientes que padecen un trastorno seleccionado de obesidad y resistencia a la insulina.

En una realización adicional, los pacientes de acuerdo con la invención son pacientes que padecen de obesidad.

65 En otra realización adicional, los pacientes de acuerdo con la invención están padeciendo de resistencia a la insulina.

En otra realización adicional, los pacientes están padeciendo de síndrome metabólico.  
En otra realización adicional, los pacientes están padeciendo de diabetes tipo 2.

*La utilización de acuerdo con la invención*

5 En otra realización de la invención se proporciona un uso de un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para la elaboración de una composición farmacéutica para la represión o tratamiento de obesidad y/o resistencia a la insulina, en donde el derivado de la oxitocina se selecciona de 4-treonina-1-hidroxideaminoxitocina, 4-serina, 8-isoleucina-oxitocina, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina, (2,4-diisoleucina)-oxitocina, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tir(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina (ID SEC Núm.: 2: Butiril-Tir(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicina-oxitocina (TG-OT), (1-ácido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-l-carbaoxitocina, la lle-conopresina, el atosiban, la oxipresina, deamino-6-carba-oxitóxina (dC60), la desmopresina y 1-deamino-oxitocina en el cual el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 está reemplazado por un tioéter, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o agonista de la oxitocina es para ser administrada periféricamente.

20 En una realización adicional, se proporciona un uso de un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de síndrome metabólico. \*

25 En una realización adicional, se proporciona un uso de un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la diabetes de tipo 2, en donde el derivado de la oxitocina se selecciona de 4-treonina-1-hidroxideaminoxitocina, 4-serina, isoleucina-oxitocina-8, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina, (2, 4-diisoleucina)-oxitocina, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tyr(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina (ID SEC Núm.: 2: Butiril-Tir(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicineoxitocina (TG-OT), (1-ácido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-l-carbaoxitocina, lle-conopresina, el atosiban, la oxipresina, deamino-6-carba-oxitóxino (dC60), la desmopresina y 1-deamino-oxitocina en el cual el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 está reemplazado por un tioéter, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o agonista de la oxitocina es para ser administrada periféricamente.

30 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el trastorno es la obesidad.

35 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el trastorno es resistencia a la insulina.

40 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el derivado es la oxitocina.

45 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el derivado es un análogo de la oxitocina.

50 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el análogo de la oxitocina es carbetocina.

55 En otra realización, se proporciona un compuesto, un uso o un método de acuerdo con la invención, en la que el derivado es un agonista de la oxitocina.

60 Los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser útiles en la represión o el tratamiento de la obesidad y / o de la resistencia a la insulina. En una realización particular, los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser útiles en la represión o el tratamiento del síndrome metabólico. En otra realización particular, los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser útiles en la represión o la prevención o el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

65 Los ejemplos que ilustran la invención se describirán en adelante de una manera más detallada y mediante referencia a las realizaciones representadas en las Figuras.

**EJEMPLOS**

60 Las abreviaturas siguientes se refieren respectivamente a las siguientes definiciones:

65 **Acadm** (acil-CoA deshidrogenasa de cadena media), **Acox1** (acil-CoA oxidasa 1) **TAM** (tejido adiposo marrón), **Ci** (Curie), **d** (día), **h** (hora), **µg** (microgramo), **mg** (miligramo), **min** (minuto), **mM** (milimolar), **nm** (nanómetro), **ACACA** (acetil-coenzima A carboxilasa alfa), **AEA** (Anandamida), **PC** (peso corporal), **ADNc** (ADN complementario), **DGAT1** (diacilglicerol O-Aciltransferasa homólogo 1), **Ehhadh** (enoil-CoA

hidratase/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), **ELISA** (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), **TABe** (tejido adiposo blanco del epidídimo), **SAG** (síntasa ácido graso), **RIG** (ratio de infusión de glucosa), **GR** (gastrocnemio rojo), **GB** (gastrocnemio blanco), **DAG** (dieta alta en grasas), **LHS** (lipasa hormono sensible), **TABi** (tejido adiposo blanco inguinal), **Lpl** (lipoproteína lipasa), **M-MLV-RT** (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney), **AGNE** (ácidos grasos no esterificados), **OEA** (Oleoiletanolamida), **OT** (oxitocina), **PCR** (reacción en cadena de polimerasa), **PEA** (Palmitoiletanolamida), **PNPLA2** (dominio fosfolipasa similar a patatín conteniendo 2), **QR** (cuádriceps rojo) **QB** (cuádriceps blanco), **ARN** (ácido ribonucleico), **TI** (transcriptasa inversa), **S** (Soleo), **SCD1** (estearoil-coenzima A 1 desaturasa), **TG** (triglicéridos), **TIB** (tibial), **UCP3** (proteína 3 desacoplada), **2-AG** (2-araquidonilglicerol).

### **Ejemplo 1: Impacto positivo de la infusión de OT central o periférica en la ganancia de peso corporal, metabolismo de los lípidos y resistencia a la insulina**

Se evaluaron los efectos metabólicos beneficiosos de la administración de OT en el siguiente modelo de obesidad inducida por una dieta de alto contenido de grasa en ratas.

#### *Animales y dietas*

Las ratas macho Wistar (300-325 g) fueron compradas de Charles River (L'Arbresle, Francia) y alojadas en jaulas individuales bajo condiciones de temperatura controlada (22° C) e iluminación (luz encendida: 7:00-19:00 h). Tuvieron acceso libre al agua y una dieta alta en grasas 45% (DAG) (energía metabolizada, 4,56 kcal/g) (R/M Ssniff® EF de acuerdo con D12451 (I) mod., ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania) durante siete semanas. Fueron registrados diariamente el peso corporal, la ingesta de alimentos y la ingesta de agua (8:30-9:30 h). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de nuestra Universidad y estaban de acuerdo con las directrices Suizas para la experimentación animal.

#### *Infusión intra cerebro ventricular (i.c.v.)*

Con el fin de estudiar el papel de la OT sobre la homeostasis metabólica, las ratas machos Wistar de más arriba fueron llevadas a obesas durante 7 semanas de dieta alta en grasas 45% (DAG) y fueron infundidas intra cerebro ventricularmente (i.c.v.) bien con OT (1,6 nmol/d) o bien con una solución salina durante las últimas 2 semanas del experimento.

Después de tres semanas de alimentación con dieta alta en grasas (DAG), las ratas fueron sometidas a los procedimientos quirúrgicos. Fueron anestesiadas con una inyección intramuscular de ketamina-xylasina (Ketalar@-Rompun@, Parke-Davis y Bayer, Leverkusen, Suiza) de 40 y 9 mg/kg, respectivamente e implantadas con una cánula en el ventrículo cerebral lateral derecho fijada en el cráneo con cemento dental, tal y como se describió anteriormente (Rohner-Jeanrenaud et al., 1989, 124 de Endocrinología, 733-9). Después de una semana de recuperación, fue medida la respuesta de bebida a la inyección i.c.v. de Angiotensina II (5 ng/μl) (Novabiochem, Laüfelfingen, Suiza) con el fin de confirmar la colocación correcta de la cánula. Al final de la quinta semana de alimentación de la dieta alta en grasas, fueron implantadas por vía subcutánea minibombas osmóticas (Alzet®, modelo 2001, Alza Corporation, Cupertino, CA) que administraban oxitocina (NeoMPS®, Estrasburgo, Francia) o su vehículo (NaCl 0,9%) y conectadas a la cánula de la i.c.v. vía un catéter de polietileno, tal como se describió anteriormente (Rohner-Jeanrenaud et al., 1989, más arriba). La OT fue administrada en una dosis de 1,6 nmol/día ó 16 nmol/día/rata durante 14 días. Un grupo de ratas con infusión de vehículo fue alimentado de forma pareada a la cantidad de alimento consumido por los animales infundidos con la OT con el fin de evaluar los efectos de la OT independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos. El régimen de alimentación pareada consistió en dar un tercio de la cantidad diaria de alimentos en la mañana y los dos tercios restantes justo antes del inicio de la oscuridad. Las ratas fueron sacrificadas utilizando anestesia de isoflurano (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ) y decapitación rápida entre las 9:00 y 13:00 h. Las muestras de sangre se recogieron en tubos recubiertos de AEDT (ácido etildiaminotetraacético), centrifugadas y el plasma almacenado a -20 ° C. Los tejidos fueron rápidamente retirados, congelados en mesa de vacío (freeze-clamped) y almacenados a -80 ° C.

#### *Infusión subcutánea (s.c.)*

Otro grupo de las ratas machos Wistar de más arriba fueron llevados a obesos tal como se describe anteriormente y fueron infundidos subcutáneamente con solución salina o con la OT (NeoMPS®, Estrasburgo, Francia) (50 nmol/día/rata) durante 14 días.

#### *Pruebas de tolerancia a la glucosa*

El impacto de los cambios inducidos por la OT en el metabolismo lipídico periférico sobre la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina fue determinado por pruebas de tolerancia a la glucosa (TTG). Se administró glucosa (75 mg/kg de peso corporal) por vía intraperitoneal 4h después de la retirada de los alimentos. Los niveles de glucosa se midieron usando un medidor de glucosa (One Touch II; LifeScan) de muestras de sangre del rabo de 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección de glucosa.

*Clamps Euglucémico-hiperinsulinémico*

Los ratios de utilización de la glucosa globales y de tejidos específicos fueron medidos mediante la realización de clamps euglucémico-hyperinsulinémico asociados con la técnica etiquetada 2-desoxiglucosa tal y como se describió anteriormente (Vettor et al., 1994, Diabetologia, 37, 1202-1208). A las ratas obesas inducidas por dieta alta en grasas se las hizo ayunar durante la noche y anestesiadas por vía intraperitoneal con Nembutal (pentobarbital sódico de 75 mg/kg; Abbott Laboratories, Chicago, IL). La utilización de la glucosa total fue medida durante los clamps euglucémico hiperinsulinémico, tal y como se describió anteriormente (Vettor et al., 1994, más arriba). Al final del clamp, se determinó el índice de utilización de los tejidos individuales de la glucosa *in vivo* estimulada por insulina mediante la inyección de un bolo único de la etiqueta 2-deoxi-D-[1-<sup>3</sup>H] glucosa (30 µCi; Amersham Biosciences UK, Little Chalfont, Reino Unido), tal y como se describió anteriormente (Vettor et al., 1994, más arriba). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación rápida y los tejidos fueron rápidamente retirados, congelados en mesa de vacío (freeze-clamped) y almacenados a -80 ° C. La medida de la concentración en tejido de 2-deoxy-d-[1-<sup>3</sup>H] glucosa-6-fosfato permitió el cálculo (Vettor et al., 1994, más arriba) del índice de utilización de la glucosa *in vivo* de los tejidos individuales y fue expresado en ng/mg.min.

*Mediciones de plasma*

Con el fin de determinar el efecto de la OT en el metabolismo periférico, se determinaron los niveles de glucosa, de insulina, de leptina, de AGL, de glicerol y de TG. La glucosa en plasma fue medida por el método de glucosa oxidasa (Glu, Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Suiza). Los ácidos grasos no esterificados en plasma (AGNE) y los niveles de triglicéridos (TG) fueron determinados utilizando kits comerciales AGNE C y TG enzimáticos PAP150 de Wako Chemicals GmbH (Neuss, Alemania) y Biomérieux (Marcy l'Etoile, Francia), respectivamente. Los niveles en plasma de la OT se determinaron mediante un ELISA, tal y como se ha descrito previamente (Pequeux et al., 2001, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 61, 407-415). Se midieron los niveles de glicerol en plasma usando el Reagente de Glicerol libre (Sigma). La infusión central de la OT promovió los niveles de OT crecientes en plasma, sugiriendo un efecto potencial directo sobre el tejido adiposo.

*Procesamiento de tejidos y RT-PCR en tiempo real*

Con la finalidad de delinear los mecanismos responsables del efecto sobre el metabolismo periférico, se analizó la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos en los tejidos adiposos (tejidos adiposos epidídimo blanco e interescapular marrón). Se extrajeron los ARNs totales desde el tejido congelado utilizando la extracción de un solo paso con el reactivo Trizol (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría. Una cantidad de 2,5 µg de ARN total se utilizó para RT (transcriptasa inversa) usando hexámeros aleatorios (Microsynth, Ginebra, Suiza), dNTPs (deoxinucleótidos) (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos), RNasin como un inhibidor de la RiboNucleasa (Promega Corporation) y el kit de enzima de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (RT-MLV-M) (Invitrogen, Basilea, Suiza). Para el PCR cuantitativo (PCRc), se realizó la amplificación de genes a partir de ADNc de 6,25 ó 12,5 ng, usando el SYBR® green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y una máquina ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todos los cebadores fueron diseñados (Figura 9, Tabla 1) con el software PrimerExpress (<http://phym.unige.ch/>) y utilizados en una concentración de 200 a 300 nM para PCRc. Los resultados fueron normalizados a los niveles de expresión del gen constitutivo, proteína ribosomal S29 (RPS29).

***Papel de la administración de OT en la ganancia de peso corporal independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos***

La infusión crónica i.c.v. de la OT disminuyó la ganancia de peso corporal y dio como resultado una disminución de la ganancia acumulada de peso corporal de más del cincuenta por ciento en comparación con el efecto de la solución salina (Figuras 1A y 1B; P < 0,05), sin ningún efecto en la ingesta alimentaria (Fig. 1). Esto resultó en una disminución marcada en la eficiencia alimentaria en ratas tratadas con la OT en comparación con los controles de la infusión de la solución salina, un índice calculado como el ratio de ganancia de peso corporal con relación a la ingesta de alimentos acumulada durante el periodo experimental de 14 días (Figura 1D; P < 0,05).

***Papel de la administración de OT en el metabolismo de los lípidos***

Todos los parámetros medidos de metabolismo periférico (es decir, glucosa en plasma, insulina, leptina y niveles de AGL) permanecieron sin cambios por la administración central de la OT, comparado con la infusión salina, excepto las concentraciones de los TG en plasma que fueron disminuidas, tal como se muestra en la Tabla 2 de más abajo.

Tabla 2

	Salina-Infusionada (ratas de control)	Oxitocina-Infusionada (ratas tratadas)
Oxitocina (pg/ml)	7.5 ± 2.0	21.8 ± 5.8 *
Glucosa (mg/dl)	159.1 ± 5.7	159.5 ± 4.1
Insulina (ng/ml)	2.5 ± 0.7	1.7 ± 0.3
Leptina (ng/ml)	13.9 ± 3.7	11.3 ± 2.2
FFA (mmol/l)	0.82 ± 0.06	0.70 ± 0.06
TG (mmol/l)	1.11 ± 0.09	0.80 ± 0.05*
OEA (pmol/ml)	145 ± 13	178 ± 15
PEA (nmol/ml)	1.34 ± 0.16	1.63 ± 0.15
AEA (pmol/ml)	18 ± 2.9	19 ± 2.3
2-AG (pmol/ml)	78 ± 13	53 ± 4.9

Los valores son medios ± ESM de 6-7 animales por grupo \* P < 0, 05 versus controles. P= NS Para todas las demás comparaciones. Oleoiletanolamida (OEA), Palmitoiletanolamida (PEA), Anandamida (AEA) y 2-Arachidonoilglicerol (2-AG)

Además, ambas administraciones de la OT central (Fig. 7A) y periférica (Fig. 7B) aumentaron los niveles de glicerol en plasma, apoyando que la administración crónica de la OT aumenta la lipólisis.

En el tejido adiposo blanco de epidídimo (TABe), considerado como un depósito de grasa intraabdominal, la infusión central de la OT promovió un aumento en la expresión del ARNm de Lpl, una enzima responsable de la absorción de los TG en circulación (Fig. 2A; P < 0,01). La infusión central de la OT no modificó la expresión del ARNm de las enzimas implicadas en la lipogénesis y el almacenamiento de los TG [es decir, acetil-coenzima A carboxilasa alfa (Acaca, también conocida como ACC-alfa), la sintasa ácido graso (SAG) y el diacilglicerol O-aciltransferasa homólogo 1 (DGAT1)] (Figura 2A), mientras que aumentó la de dos enzimas implicadas en la lipólisis, especialmente el dominio fosfolipasa similar a patatín que contiene 2 (PLAPN2) (Figura 2A; P < 0,05) y lipasa hormono sensible (LHS) (Fig. 2A; P < 0,01). El efecto estimulante de la OT en LHS también fue detectado en el nivel de proteínas. Como una disponibilidad mejorada intracelular de los AGL en los adipocitos podría esperarse como un resultado de tal aumento de la absorción de los TG y la lipólisis en las ratas con infusión de la OT (1,6 nmol/d) en comparación con los controles, la observación de los niveles inalterados corrientes de los AGL en plasma en las ratas con infusión de la OT (Tabla 2) sugiere una utilización endógena de estos sustratos inducida por la administración de la OT.

La medición de la expresión del ARNm de las enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos por tiempo real RT-PCR tal como se describe más arriba demostró que la infusión de OT aumentó la expresión TABe de acil-CoA oxidasa 1 (Acox1, Figura 2B, P < 0,05), de enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Ehhadh, Figura 2B, P < 0,05) y de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (Acadm, también conocido como MCAD, Figura 2B, P < 0,05) y también ha mejorado la expresión de la proteína detectable de los ácidos grasos, proteína desacopleante 3 (Ucp3, Figura 2B, P < 0,05). Con el ánimo de la comparación, también se analizó la expresión del ARNm de la mayoría de los genes citados más arriba en el tejido adiposo marrón interescapular (TAMi) y se observó que la infusión de la OT aumentó significativamente la expresión de las principales enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, así como la de PPAR-alfa en este tejido. En contraste, la infusión central de la OT no modificó la expresión de los genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en el hígado y en el músculo esquelético.

Además, la infusión central de la OT promovió un marcado aumento en la expresión del ARNm de estearoil-coenzima A desaturasa 1 (SCD1) que convierte los ácidos grasos insaturados de ácido palmítico (16:1) y del ácido esteárico (18:0) a los ácidos grasos mono no saturados del ácido palmitoleico (16:1) y del ácido oleico (18:1), respectivamente (Figura 2A; P < 0,05). Es conocido que esos ácidos grasos resultantes pueden ser incorporados en la membrana como los fosfolípidos o almacenados como los TG. Como ningún cambio fue observado en la expresión del ARNm de las enzimas implicadas en el almacenamiento de los TG en los TABe de animales con la infusión de la OT (Figura 2A), podría haber ocurrido un aumento inducido por la OT en la síntesis e incorporación como fosfolípidos (PL) en la membrana de ácidos palmitoleico u oleico. La oleoiletanolamida (OEA), un miembro de la familia endocannabinoidea, resulta de la división de N-oleoil-fosfatidiletanolamina (NOPE) mediante N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPA-PLD), resultante de la transferencia de ácido oleico desde la posición sn-1 de fosfatidilcolina (PC) a la amina libre de fosfatidiletanolamina (PE). Está observado que esa infusión crónica i.c.v. de la OT aumenta el contenido de la OEA en los TABe en comparación con el efecto de la solución salina, mientras no modifica el contenido en los TABe de otros endocannabinoides, tales como el análogo saturado de OEA,

palmitoiletanolamida (PEA) derivado de ácido palmitoleico, anandamida (AEA) o 2-araquidonilglicerol (2-AG), ni tampoco altera los niveles de plasma de la OEA y de otros endocannabinoides (Tabla 2).

Con el fin de verificar la hipótesis de que la infusión central de OT modula el metabolismo periférico de los lípidos promoviendo la síntesis de la OEA en el tejido adiposo, las ratas obesas inducidas por dieta alta en grasas fueron infundidas i.c.v. durante 14 días con una dosis diez veces más alta de la OT (16 nmol/d). En esta dosis, la infusión central de la OT disminuye la ingesta de alimentos acumulada en comparación con los controles de la infusión i.c.v. de solución salina. Por lo tanto, con la finalidad de determinar los efectos metabólicos suscitados por la OT independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos, fue infundido un segundo grupo control con solución salina que fue par alimentado (AP) en la cantidad de alimentos consumidos por las ratas tratadas con la OT. La ganancia de peso corporal de las ratas infundidas i.c.v. con la OT fue significativamente menor que en el grupo control de infusión de solución salina, un efecto que era independiente de los cambios en la ingesta de alimentos, como no se observó en el grupo de control de AP. El efecto estimulante de esta dosis de OT en la SCD1 expresión de ARNm y el contenido de la OEA fue más marcado que aquel de la dosis más baja (5,6 y 2 veces versus 4,2 y 1,3 veces, respectivamente), siendo ajenos a los cambios en la ingesta de alimentos, apoyando además que esa acción central de la OT sobre el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo implica la síntesis de la OEA promovida por la OT.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la dosis diez veces menor, la infusión de 16 nmol/d de la OT no modificó PPAR-alfa de ARNm de los TABe, pero resultó en un aumento de independiente de la ingesta de alimentos en la expresión de los genes objetivo PPAR-alfa (es decir, Acadm, Acox1, Ehhadh, Ucp3). La infusión de la OT aumentó significativamente la expresión del ARNm de PPAR-alfa y sus genes objetivo en los TAM. No puede ser excluido, un efecto potencial de la OT en la actividad del TAM, incluyendo el aumento de la termogénesis.

#### ***Papel de la administración de OT en la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasas***

Se realizaron dos pruebas de tolerancia a la glucosa (TTG), una primera después de 3 semanas de la dieta alta en grasas (DAG) (es decir, antes de los tratamientos de solución salina y OT respectivos) y una segunda al final de la semana 2 con infusión de solución salina o de la OT (es decir, después de 7 semanas de la DAG). Después de 7 semanas de DAG, ambas ratas con infusión de solución salina y de OT exhibieron una debilitación de la tolerancia a la glucosa en comparación con la TTG realizada después de 3 semanas de alimentación DAG (Figura 3A;  $P < 0,05$ ). Tal deterioro fue acompañado por sobre secreción de insulina en el grupo de la infusión de solución salina (Figura 3B;  $P < 0,05$ ), lo que implica la ocurrencia de disminución de sensibilidad a la insulina mientras que esto no se observó en los animales infundidos con la OT, lo que sugiere un papel protector para la OT contra la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina inducida por la DAG. Los experimentos de clamps euglicémico hiperinsulinémico confirmaron que la infusión con la OT promovía aumentos significativos en el ratio de infusión de glucosa (RIG) (Figura 3;  $P < 0,05$ ) y en el índice de utilización de la glucosa en los músculos esqueléticos rojos, tales como el cuádriceps rojo (Figura 3D;  $P < 0,01$ ), el gastrocnemio rojo (Figura 3D;  $P < 0,05$ ) y el sóleo (Fig. 3D;  $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo de la solución salina. Un aumento en la absorción de glucosa en el TAB inguinal (Figura 3E;  $P < 0,05$ ) y en el TAB epidídimo (Fig. 3E;  $P < 0,05$ ), se observó también en las ratas infundidas centralmente con la OT. Todos en conjunto, estos resultados apoyan que la infusión crónica central de la OT disminuye la ganancia de peso corporal en las ratas obesas inducidas con dieta alta en grasas (DAG), independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos, mejora la resistencia a la insulina inducida por la DAG (tolerancia a la glucosa mejorada, junto con una disminución significativa en la secreción de insulina durante el TTG, es decir, sensibilidad a la insulina mejorada, RIG aumentado e índice aumentado de utilización de la glucosa en los músculos esqueléticos rojos, TABi y TABe), disminuye los niveles de triglicéridos en plasma y aumenta la expresión de Lp1 en el tejido adiposo blanco del epidídimo (TABe), una enzima responsable de la absorción de los TG, así como de las enzimas involucradas en las lipólisis y en la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos. Este efecto busca selectivamente el tejido adiposo blanco tal como la infusión crónica central de OT no tiene efecto alguno sobre el metabolismo de los lípidos en el músculo esquelético o en el hígado. Además, el aumento suscitado por la OT en el contenido de OEA en el TABe y el aumento de genes (por ejemplo, Acadm, Acox1, Ehhadh, Ucp3) que codifican las enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación del ácido graso que son genes objetivo PPAR-alfa (Jeong et al., 2009. Exp. Mol. Med., 41, 397-405) es apoya un efecto de la OT en la actividad mejorada de PPAR-alfa.

#### **Ejemplo 2: Efecto directo de la OT sobre el metabolismo de los lípidos en los adipocitos in vitro**

El efecto *in vitro* de la OT en el metabolismo de los lípidos en los adipocitos diferenciados 3T3-L1 fue ensayado como sigue. Fueron diferenciados los fibroblastos Murine 3T3-L1 hacia un fenotipo de pre adipocito tal y como se describió anteriormente (Olson et al., 1997, Mol. Cell. Biol, 2425-2435). En resumen, las células fueron cultivadas en un medio de eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa suplementado con 10% suero de ternera inactivado por calor reducido (SBR) a 37° C / 8% CO<sub>2</sub>. Las células fueron inducidas a diferenciarse, dos días después de la confluencia, mediante incubaciones secuenciales con: 4,5 g/l de glucosa DMEM, suero fetal bovino (SFB) 10% que contiene 1  $\mu$ g/ml de insulina, 0,25  $\mu$ M de dexametasona y 0,5 mM isobutimetilxantano (IBMX) durante 4 días; 4,5 g/l de glucosa DMEM, SFB 10% que contiene solamente insulina por otros 4 días adicionales; 4,5 g/l de glucosa DMEM, SFB 10% durante 3-4 días. La diferenciación fue considerada lograda cuando más del 90% de las células muestran una acumulación de grandes gotitas lípidas en su citoplasma.

La OT aumentó la expresión del ARNm de todos los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos que fueron afectados por la infusión central de la OT. Esto comprendió un efecto estimulador de la OT en PPAR-alfa (Figura 4A). Además incluso y aunque el efecto de la OT sobre la expresión del ARNm de SCD1 fue menos pronunciado que la obtenida en ratas infundidas centralmente, la exposición de los adipocitos 3T3-L1 a la OT resultó en un contenido aumentado de OEA (Figura 4B). Con el fin de apoyar adicionalmente que la OEA podría ser un mediador de los efectos inducidos por la OT sobre el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo, los adipocitos 3T3-L1 fueron incubados en presencia de OEA y la OEA mostró inducir la expresión del ARNm de PPAR-alfa y de la mayoría de los genes relacionados con PPAR-alfa (Acadm, Acox1, Ehhadh, Ucp3).

### **Ejemplo 3: Impacto positivo de la administración periférica de la OT en la ganancia de peso corporal y el metabolismo lipídico**

Los efectos metabólicos beneficiosos de la administración de la OT fueron evaluados en el mismo modelo de obesidad en ratas inducida por la dieta alta en grasas tal como en el Ejemplo 1 y en ratones knockout PPAR-alfa (Lee et al., 1995, Mol. Cell. Biol., 15(6):3012-22). Los animales con obesidad inducida por la dieta alta en grasas DAG, grupos con solución salina o con la OT (ver las condiciones en el Ejemplo 1) fueron infundidos subcutáneamente vía mini bombas (Alzet<sup>®</sup>, tal como más arriba). La OT fue administrada en una dosis de 50 nmol/día/rata durante 14 días.

#### *Los parámetros de la composición corporal*

Fue utilizado un analizador de resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMN) EchoMRI-700 (Echo Medical Systems, Houston, TX) para medir la masa grasa total y la masa corporal magra en las ratas al principio y al final del tratamiento.

A esta dosis, la administración de la OT disminuyó la ingesta de alimentos (Figura 5B;  $P < 0,05$ ) y la ganancia de peso corporal (Fig. 5A;  $P < 0,05$ ). La pérdida de peso corporal de ratas tratadas con la OT estaba relacionada en cualquier caso a un efecto anorexigénico de la hormona, como no se observó en el grupo de AP (Figura 5A). La composición corporal analizada por un analizador de RMN demostró que la administración periférica de la OT promovió una disminución significativa en la masa de grasa, mientras que indujo un aumento en la masa magra corporal porcentual, independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos (Figuras 5C y D;  $P < 0,05$ ) después de 10 días de tratamiento. De esta manera, también fue confirmada una disminución en la masa grasa, independiente de la ingesta de alimentos, mediante el examen y el pesado de diferentes depósitos de tejido adiposo (Figuras 5E y F).

#### *PPAR-alfa en los ratones knockout y de tipo salvaje*

La OT fue administrada periféricamente con 50 nmol/día durante 3 días en ratones knockout (KO) PPAR-alfa y sus hermanos de camada de tipo salvaje. Mientras que la infusión periférica de la OT indujo a una disminución significativa en la ganancia de peso corporal de los animales de tipo salvaje, no modificó este parámetro en ratones KO PPAR-alfa. Consistentemente, la infusión periférica de la OT promovió un aumento en la expresión del ARNm de los genes objetivo PPAR-alfa (Acadm, Acox1, Ehhadh, Ucp3) en ratones de tipo salvaje, mientras que no tenía efecto en los ratones knockout PPAR-alfa.

#### *Análisis estadístico*

Para los ejemplos 1-3, los resultados se expresan como promedios  $\pm$ ESM. Se utilizó la prueba de Levene para comprobar si la igualdad de la varianza entre los grupos (SPSS Inc., Chicago, IL). Con el fin de evaluar los efectos del tratamiento, la comparación de los grupos fue realizada utilizando pruebas paramétricas (prueba t de Student) y pruebas no paramétricas (prueba de Mann-Whitney) cuando fallaron las pruebas de normalidad e igual varianza. La significación estadística fue establecido en \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Estos resultados apoyan que los efectos inducidos por la OT sobre el metabolismo de los lípidos del tejido adiposo son ejercidos por la vía de la activación directa del PPAR- $\alpha$ , estimulando la síntesis del endocannabinoide, la oleoiletanolamida (OEA), en el tejido adiposo, estimulando de esta forma la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos locales.

Todos los efectos metabólicos observados apoyan el beneficio de la administración de la OT y/o la activación de la vía del receptor de la OT por moléculas similares a la OT (por ejemplo, derivados de la OT, agonistas del OTR o análogos de la OT) para la represión o el tratamiento de la obesidad o la resistencia a la insulina. En particular, esos múltiples efectos de componente apoyan el beneficio de la administración de la OT y/o la activación de la vía del receptor de la OT por las moléculas similares a la OT para el tratamiento de un síndrome multi componente tal como el síndrome metabólico y en la prevención, represión, retraso o tratamiento de trastornos debidos a la aumentada resistencia a la insulina periférica tal como en la diabetes de tipo 2.

**Ejemplo 4: Impacto positivo de la administración periférica de la OT en la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasas**

Los efectos beneficiosos de la administración de la OT se evaluaron en el mismo modelo de de rata con obesidad inducida por dieta alta en grasas como en el Ejemplo 1. Los animales obesos inducidos por DAG fueron infundidos subcutáneamente por la vía de mini bombas con solución salina (Alzet<sup>®</sup>, tal como arriba) o con la OT (NeoMPS<sup>®</sup>, Estrasburgo, Francia) (50 nmol/día/rata) durante 14 días.

*Evaluación del modelo de la homeostasis de resistencia a la insulina*

La insulinemia y la glicemia fueron medidas después de un ayuno nocturno (es decir, antes de clamps euglicémico hiperinsulinémico) y fueron utilizadas para calcular la "evaluación de modelo de la homeostasis de resistencia a la insulina" (MHO-RI). El MHO-RI fue calculado como sigue: (insulina de suero de ayuno en mU/l) x (glucosa en sangre en ayuno en mM)/22.5.

Se determinó el efecto de la administración periférica de la OT en la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasa tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Después de 7 semanas de la DAG, las ratas infundidos con la OT mostraron un MHO-RI inferior en comparación con los controles de infusión de solución salina (Figura 6A). Este efecto no se relaciona con un efecto anorexigénico de la hormona, como no se observó en el grupo de la AP (Figura 6A). Las clamps euglicémico hiperinsulinémico confirman que la infusión de la OT promovió una sensibilidad creciente de la insulina tal como sugiere que aumenta significativamente el ratio de la infusión de glucosa (RIG) (Figura 6B). En conjunto, estos resultados demuestran que la infusión crónica periférica de la OT mejora la resistencia a la insulina inducida por una DAG (disminuyó el MHO-RI y aumentó la RIG).

**Ejemplo 5: Impacto positivo de la administración periférica de la Carbetocina en la ganancia de peso corporal y el metabolismo lipídico**

Los efectos metabólicos beneficiosos de la administración de un derivado de la oxitocina de acuerdo con la invención (Carbetocina) fueron evaluados en el mismo modelo de rata con obesidad inducida por la dieta alta en grasas tal como en el Ejemplo 1. Los animales obesos inducidos por la DAG fueron infundidos subcutáneamente vía mini bombas (Alzet<sup>®</sup>, tal como más arriba) con solución salina o con carbetocina (Bachem) (5 nmol/día/rata o 50 nmol/día/rata) durante 14 días.

Fueron medidos los parámetros de la composición corporal mediante la resonancia magnética nuclear cuantitativa tal como está descrito en el ejemplo 3 en el principio y a los 10 días de tratamiento.

En ambos, los 5 nmol/día y los 50 nmol/día, de administración de carbetocina disminuyó la ingesta de alimentos (Figura 8B; P < 0,05) y la ganancia de peso corporal (Figura 8A; P < 0,05). La pérdida de peso corporal de las ratas tratadas con carbetocina no estaba en cualquier caso relacionada a un efecto anorexigénico del péptido, como no se observó en los dos grupos de AP (Figura 8A). La composición corporal determinada con un analizador de RMN mostró que la administración periférica de la carbetocina promovió una disminución significativa en la masa de grasa independientemente de los cambios en la ingesta de alimentos (Figura 8; P < 0,05) después de 10 días de tratamiento.

En general, todos los efectos observados apoyan el beneficio de la administración de la OT y/o la activación de la vía del receptor de OT mediante las moléculas de la OT (por ejemplo derivados de la OT, agonistas del OTR o análogos de la OT) para la represión o el tratamiento de la obesidad o de la resistencia a la insulina.

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE GINEBRA

<120> NUEVAS UTILIZACIONES DE LAS MOLÉCULAS DEL TIPO DE LA OXITOCINA Y LOS MÉTODOS RELATIVOS

<130> P1305PC00

<150> 61/345616  
<151> 2010-05-18

<150> 61/447103  
<151> 2011-02-28

<160> 28

<170> versión PatentIn 3.3

5 <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 1

Cys Thr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly  
1 5

<210> 2  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Construcción sintética

15 <220>  
<221> MISC\_CHARACTERISTICA  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa es Butiril-Tyr(Me)

20 <220>

25 <221> MISC\_CHARACTERISTICA  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa es Gly-NH2

<400> 2

Xaa Ile Gln Asn Cys Pro Leu Xaa  
1 5

30 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

35 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Lpl

40 <400> 3  
ggcatacagg tgcaattcca 20

45 <210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Lpl

50 <400> 4  
cgtcgaactt ggacagatcc tt 22

55 <210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Acaca

60 <400> 5

## ES 2 526 672 T3

acctcaacca ctacggcatg a 21

5 <210> 6  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Acaca

<400> 6  
aggtggtgtg aaggcgtg 19

15 <210> 7  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Fasn

25 <400> 7  
ggacatggtc acagacgatg ac 22

30 <210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Fasn

35 <400> 8  
cgtcgaactt ggacagatcc tt 22

40 <210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Dgat1

45 <400> 9  
gttcagctca gacagcggtt t 21

50 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

55 <220>  
<223> PCR anti- sentido de cebador para la amplificación del Dgat1

<400> 10  
catcaccacg caccaattca 20

60 <210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

65 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Pnpla2

## ES 2 526 672 T3

<400> 11  
ggccatgatg gtgccctata 20

5 <210> 12  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> PCR anti-primer sentido para la amplificación delPnpla2 gene

<400> 12  
ccaacaagcg gatggtgaa 19

15 <210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Hsl

<400> 13  
ccccgagatg tcacagtcaa t 21

25 <210> 14  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Hsl

<400> 14  
gaattcccgg atgcagaa 19

35 <210> 15  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

40 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen PPAR-alfa

45 <400> 15  
gtccctcgga gagg 14

50 <210> 16  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

55 <220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen PPAR-alfa

<400> 16  
ggaagctgga gaga 14

60 <210> 17  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

65 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Acox1

## ES 2 526 672 T3

<400> 17  
cgacctgtt cgggcaagt 19

5           <210> 18  
            <211> 24  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

10           <220>  
            <223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Acox1

            <400> 18  
            tgagaagacc ttaacgacca cgta 24

15           <210> 19  
            <211> 21  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

20           <220>  
            <223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Ehhadh

            <400> 19  
            tccttgctt tctacgttc t 21

25           <210> 20  
            <211> 18  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

30           <220>  
            <223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Ehhadh

            <400> 20  
            gatggtgctc tgctcgat 18

35           <210> 21  
            <211> 19  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

40           <220>  
            <223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Acadm

45           <400> 21  
            cgccggaaca cgtactttg 19

            <210> 22  
            <211> 21  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

50           <220>  
            <223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Acadm

55           <400> 22  
            cgagctggtt ggcaatatct c 21

60           <210> 23  
            <211> 20  
            <212> ADN  
            <213> secuencia artificial

65           <220>  
            <223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Ucp3

## ES 2 526 672 T3

<400> 23  
ggacagcagc ctgtattgca 20

5 <210> 24  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen Ucp3

<400> 24  
gggttgact tcggaagtg t 21

15 <210> 25  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen Scd1

<400> 25  
ccgtggcttt ttctctctc a 21

25 <210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> PCR non-sentido de cebador para la amplificación del gen Scd1

<400> 26  
cttccgccc ttctcttga 20

35 <210> 27  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

40 <220>  
<223> PCR sentido de cebador para la amplificación del gen oxt

45 <400> 27  
cgctgagc cctgagt 17

<210> 28  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

50 <220>  
<223> PCR anti-sentido de cebador para la amplificación del gen oxt

55 <400> 28  
aaggaagcgc cctaaagta tc 22

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de la obesidad y de la resistencia a la insulina, en donde se selecciona el derivado de la oxitocina desde 4-treonina-1-hidroxideaminoxitocina, 4-serina, isoleucina-oxitocina-8, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina, (2, 4-diisoleucina)-oxitocina, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tir(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina (ID SEC Núm.: 2: Butiril-Tir(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicina-oxitocina (TG-OT), (1-acido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-1-carbaoxitocina, Ile-conopresina, atosiban, oxipresina, deamino-6-carba-oxitóxino (dC60), desmopresina y 1-deamino-oxitocina en donde el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 está reemplazado por un tioéter, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o agonista de la oxitocina es para ser administrado periferalmente.
2. Un derivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno es la resistencia a la insulina.
3. Un derivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno es la obesidad.
4. Un derivado de uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la enfermedad es el síndrome metabólico.
5. Un derivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 para la prevención del desarrollo de la diabetes de tipo 2.
6. Un derivado para su uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el derivado es un análogo de la oxitocina.
7. Un derivado para su uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el derivado es oxitocina.
8. Un derivado para su uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el derivado es carbetocina.
9. Una formulación farmacéutica que comprende un derivado seleccionado de oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina, combinado con por lo menos un co agente seleccionado de las clases de las biguanidas y glitazonas, las sulfonilureas, los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y los agonistas de glucagón tipo 1 (GLP-1) y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado de la oxitocina está seleccionado de 4-treonina-1-hidroxideaminoxitocina, 4-serina, 8-isoleucina-oxitocina, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina, (2, 4-diisoleucina)-oxitocina, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tir(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina (ID SEC Núm.: 2: Butiril-Tyr(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicina-oxitocina (TGOT), (1-acido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-1-carbaoxitocina, Ile-conopresina, el atosiban, la oxipresina, deamino-6-carba-oxitóxino (dC60), la desmopresina y 1-deamino-oxitocina en donde el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 es reemplazado por un tioéter.
10. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la cual el derivado es un análogo de oxitocina.
11. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la cual el derivado es oxitocina.
12. Una formulación farmacéutica de acuerdo con los reivindicaciones 9 ó 10, en la cual el derivado es carbetocina.
13. Una formulación farmacéutica de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de la obesidad y la resistencia a la insulina, en donde la formulación es para ser administrada periferalmente.
14. Un derivado seleccionado de la oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina para su utilización en el tratamiento de un trastorno seleccionado de la obesidad y de la resistencia a la insulina y, en donde dicha oxitocina, un derivado de la oxitocina y un agonista de la oxitocina es para ser administrado en combinación con al menos un co agente seleccionado de las clases de -biguanidas y glitazonas, sulfonilureas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y agonistas de glucagón tipo 1 (GLP-1), en donde el derivado de la oxitocina es seleccionado de 4-treonina-1-hidroxideaminoxitocina, 4-serina, isoleucina-oxitocina-8, 9-deamidooxitocina, 7-D-prolina-oxitocina, (2,4-diisoleucina)-oxitocina, 1-deamino-1-monocarba-E12-Tyr(OMe)]-OT(dCOMOT), carbetocina, (ID SEC Núm.: 2:Butiril-Tyr(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>), 4-treonina, 7-glicina-oxitocina (TG-OT), (1-acido butanoico-2-(O-metil-L-tirosina)-1-carbaoxitocina, Ile-conopresina, atosiban, oxipresina, deamino-6-carba-oxitóxino (dC60), desmopresina y 1-deamino-oxitocina en donde el puente disulfuro entre los residuos 1 y 6 es reemplazado por un tioéter, en donde dicha oxitocina, derivado de la oxitocina o el agonista de la oxitocina es para ser administrado periféricamente.

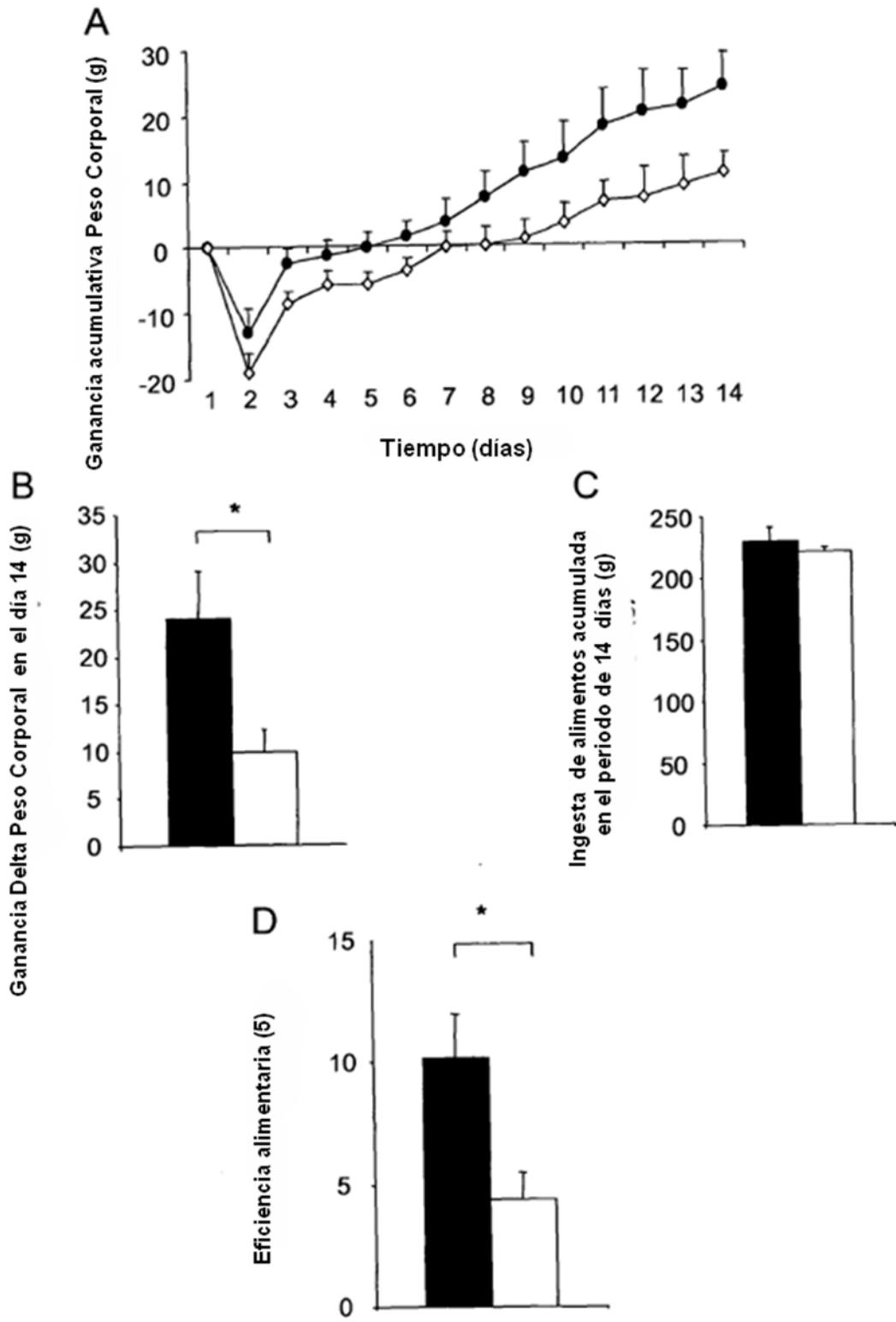


Figura 1

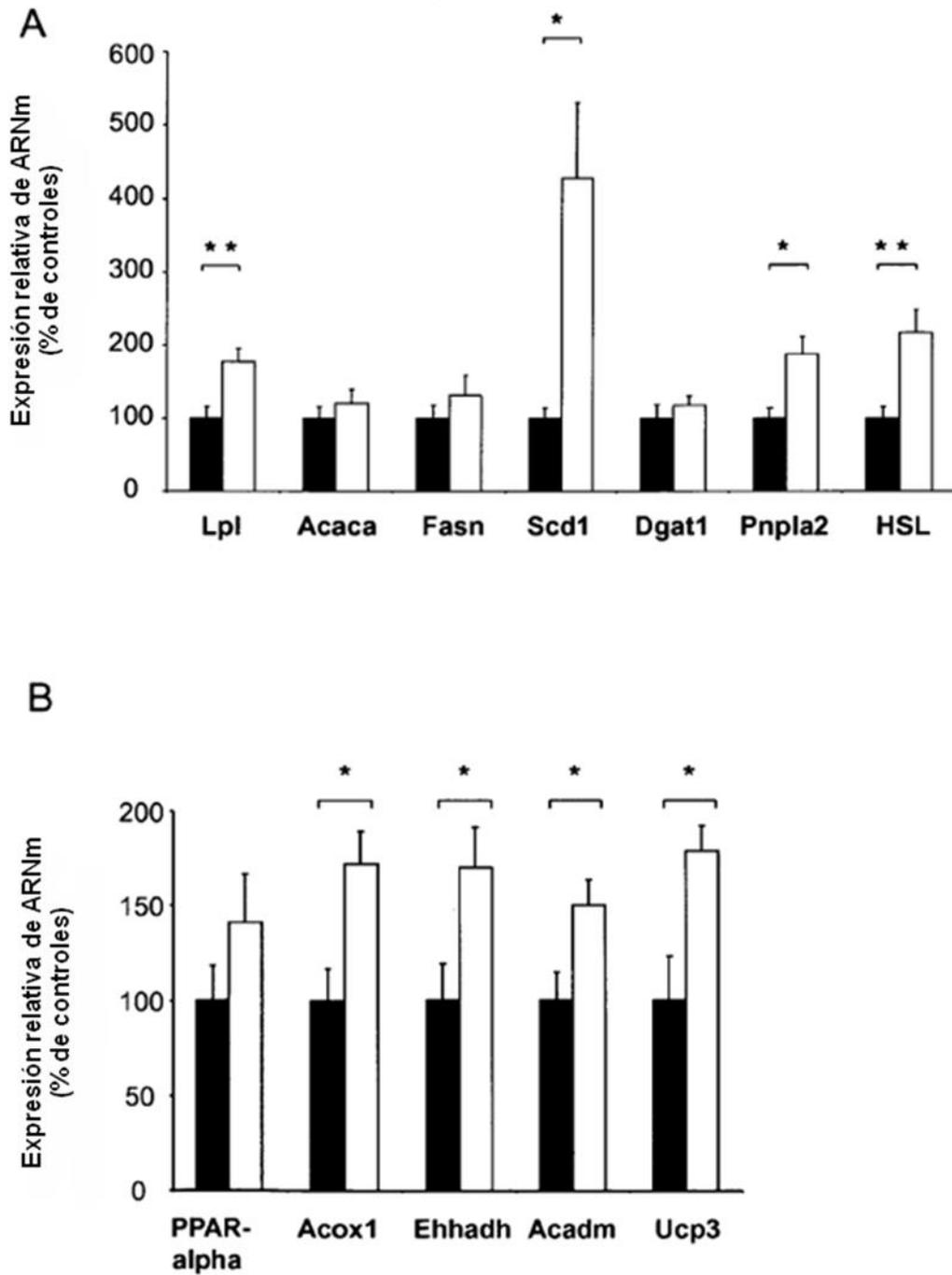


Figura 2

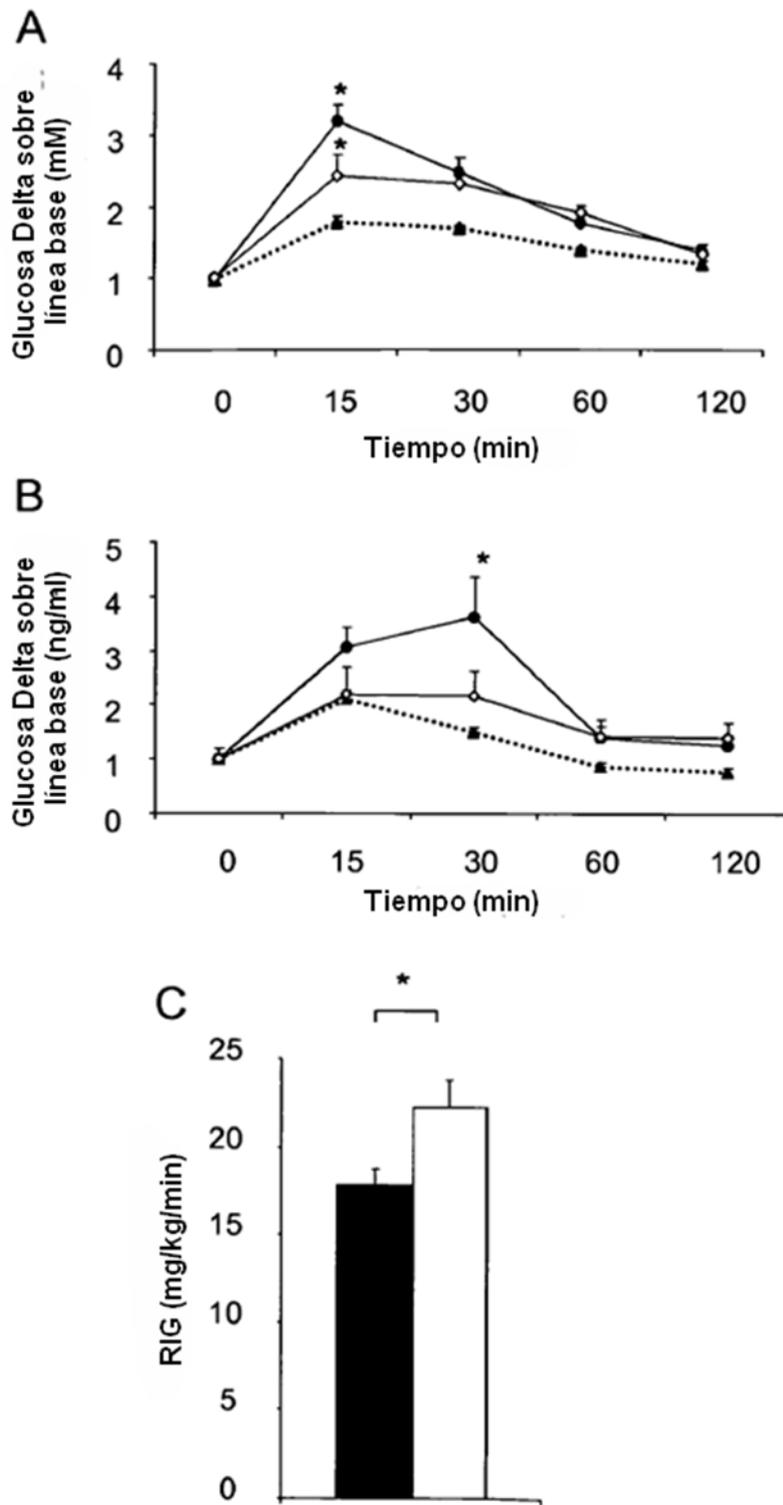


Figura 3

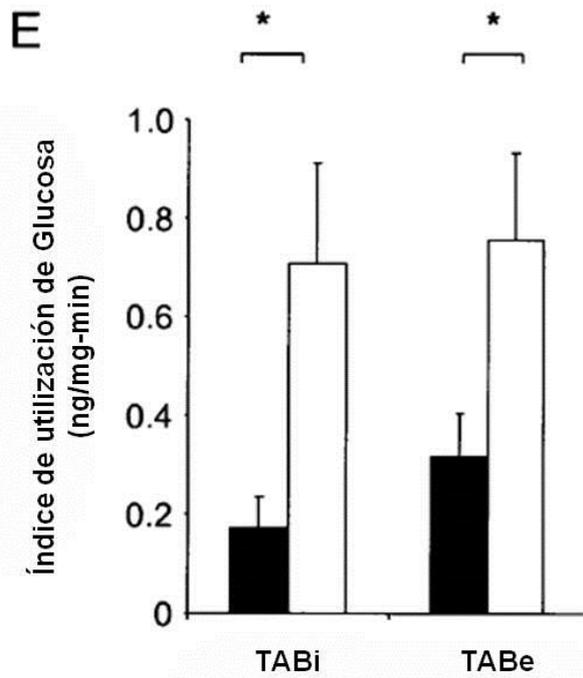
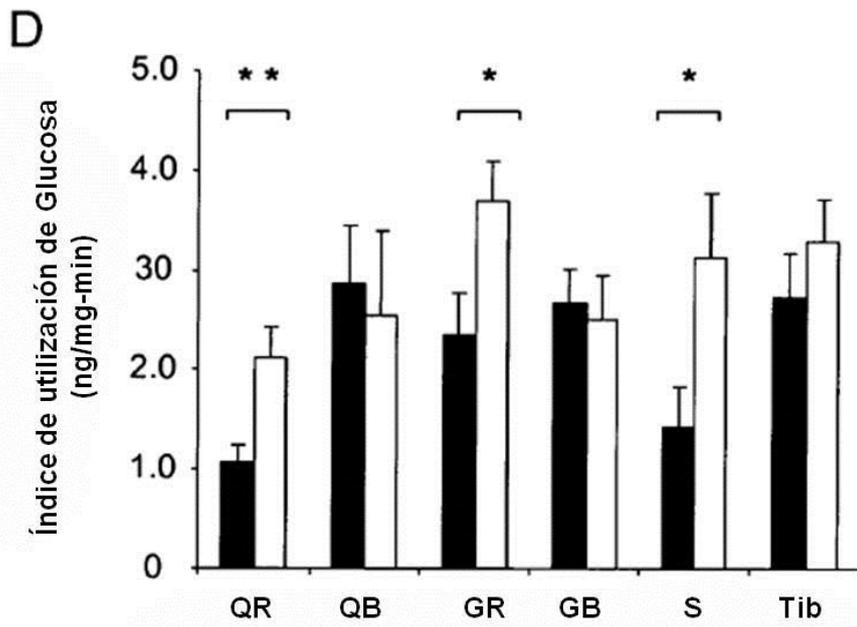


Figura 3

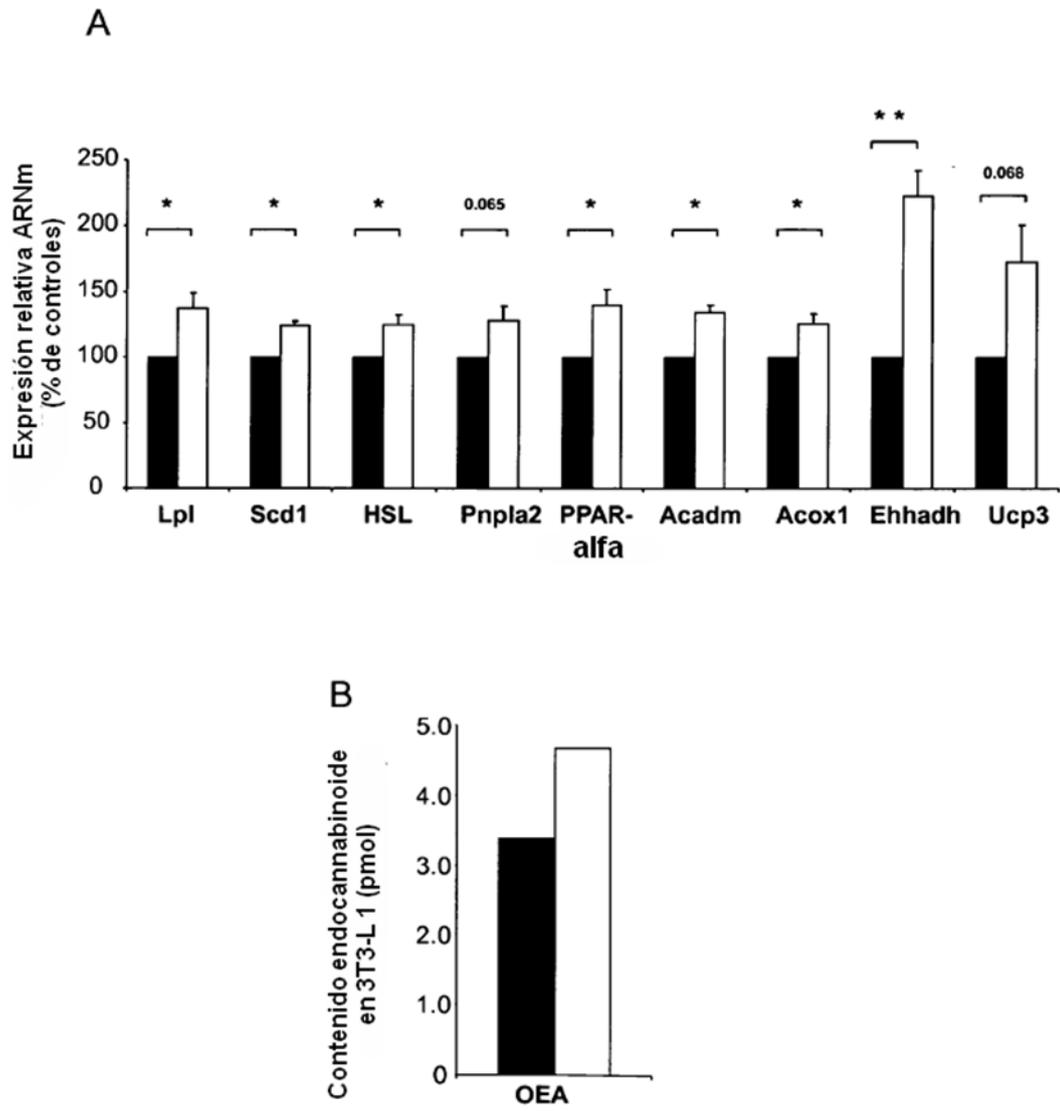


Figura 4

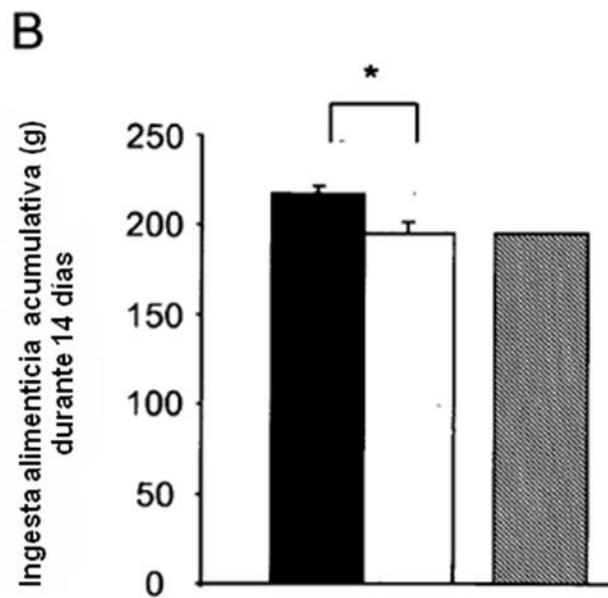
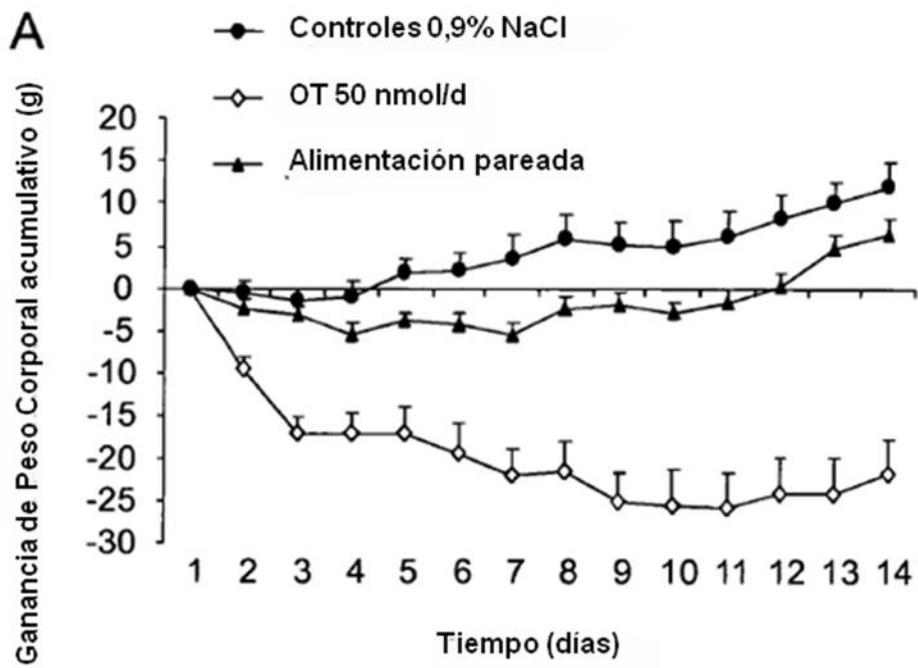


Figura 5

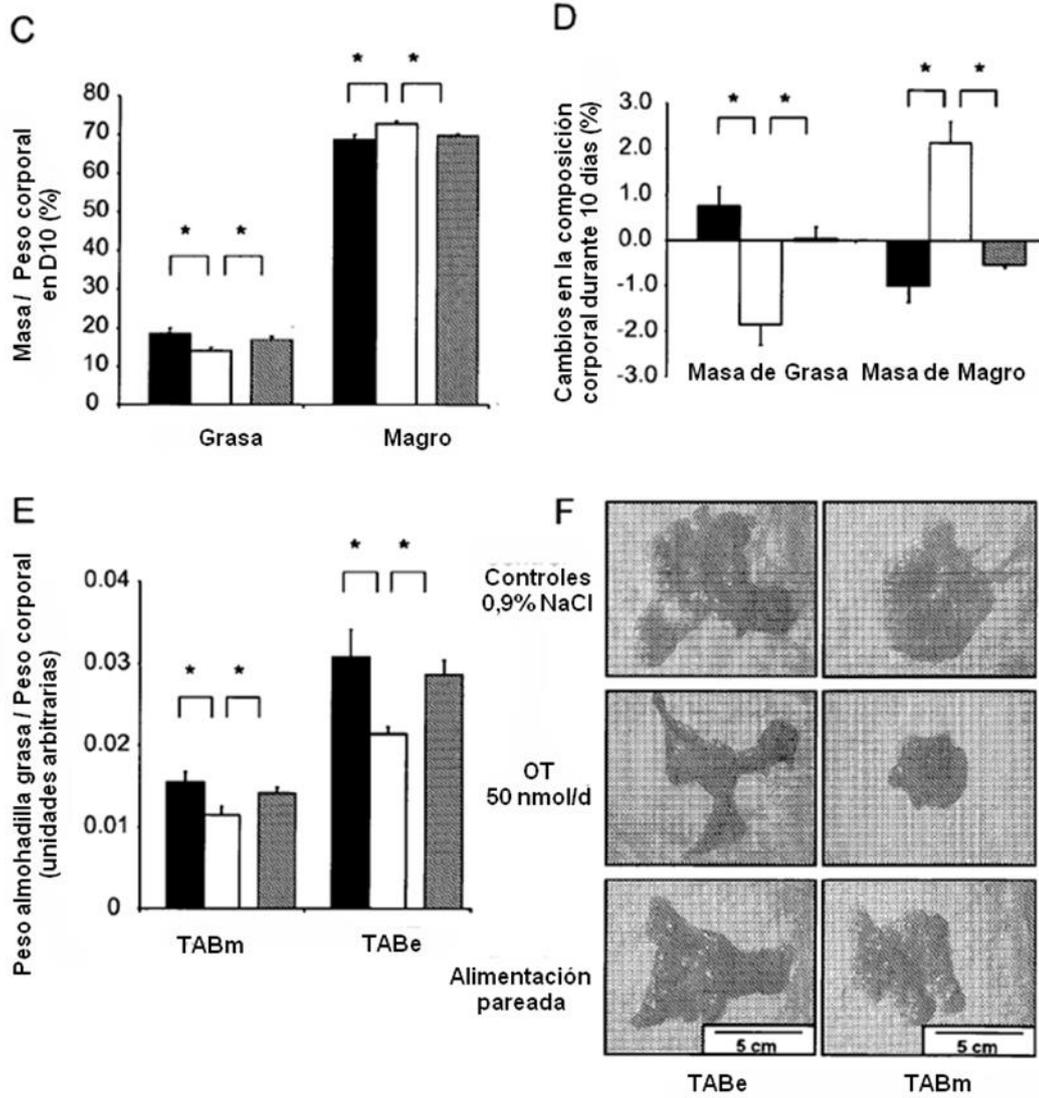


Figura 5

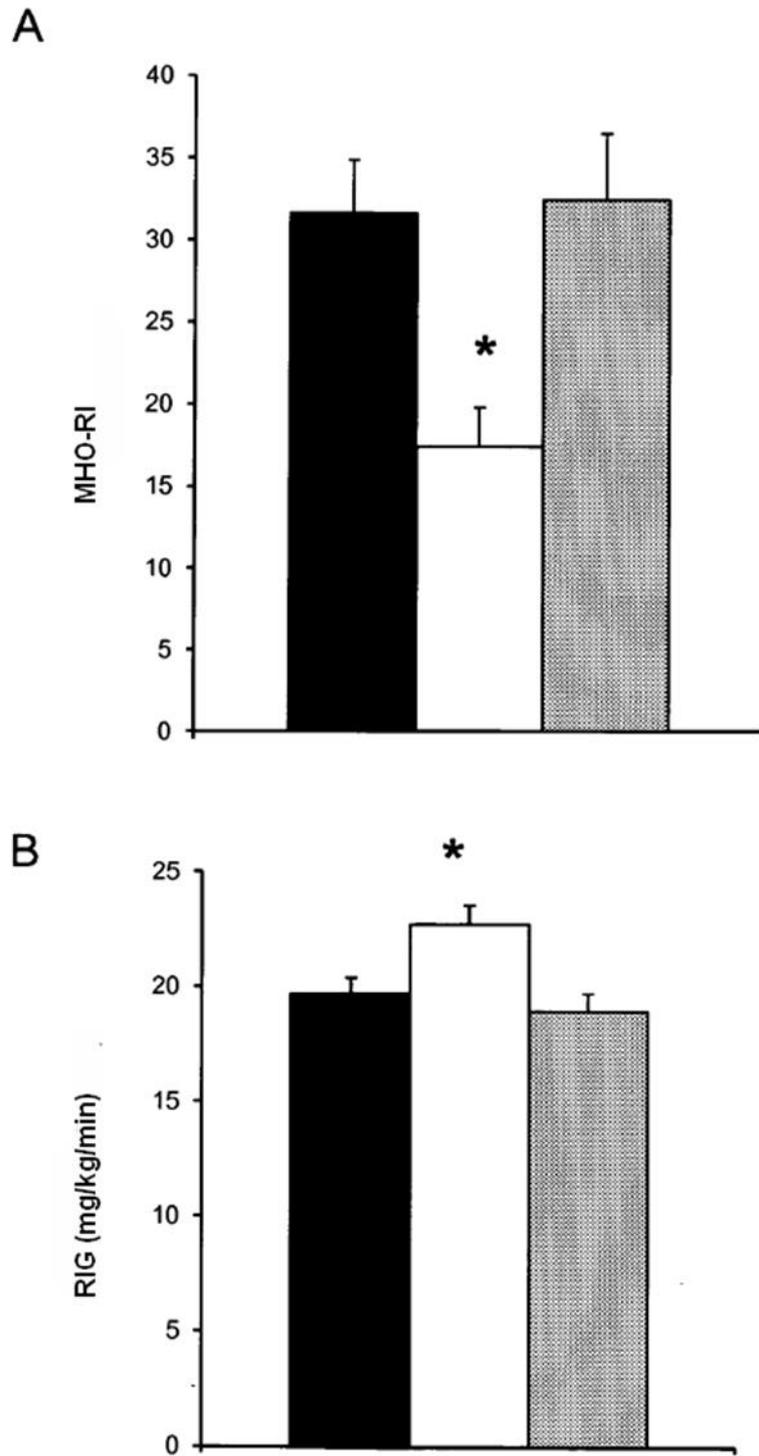
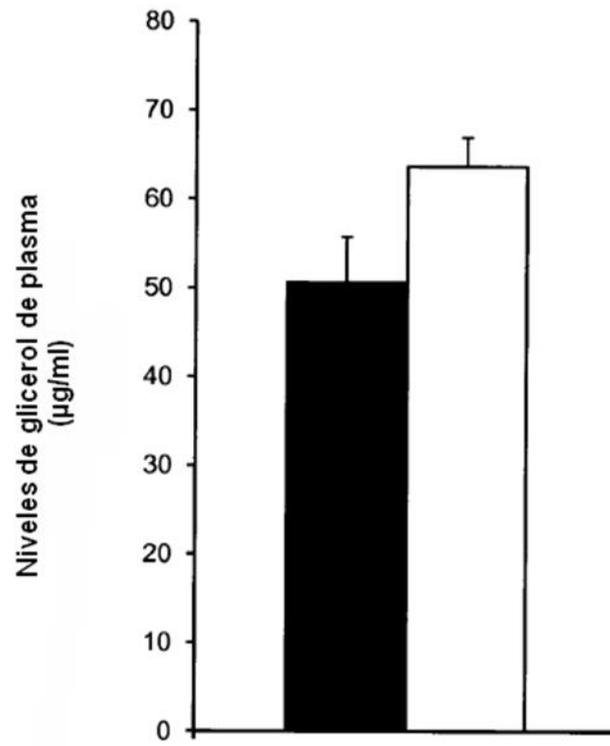


Figura 6

A



B

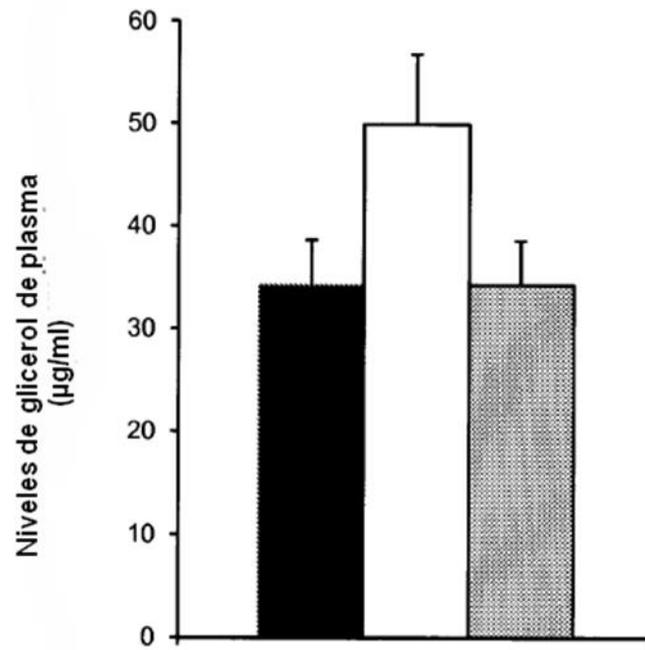


Figura 7

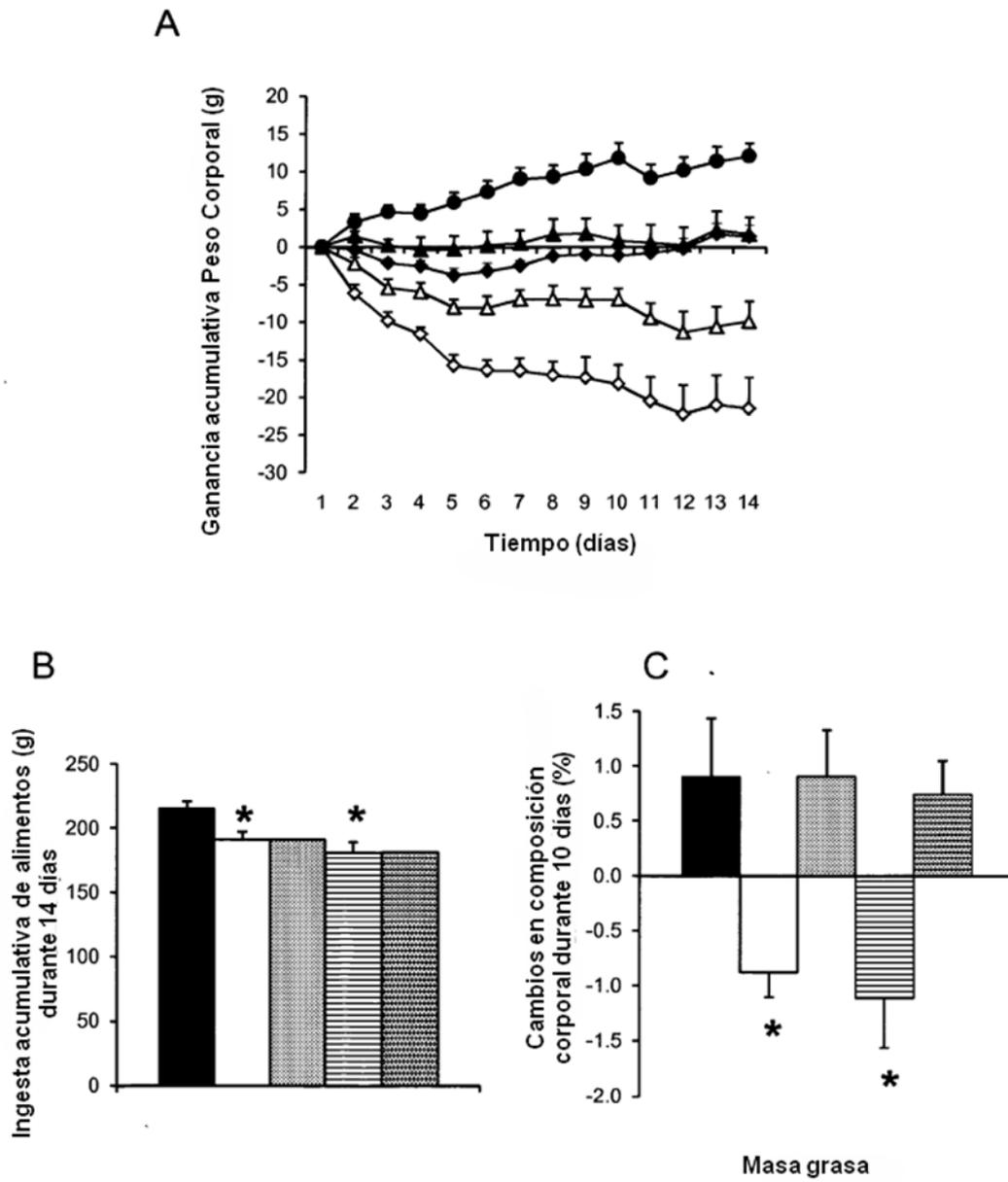


Figura 8

Gen	Número ascensión	Secuencia cebador avance	Secuencia cebador retroceso
Lpl	L03294	5'-GGCATACAGGTGCAATTCCA ID. SEC Núm. 3	5'-CGTCGAACTTGGACAGATCCTT ID. SEC Núm. 4
Acaca	J03808	5'-ACCTCAACCACTACGGCATGA ID. SEC Núm. 5	5'-A0GTGGTGTGAAGGCGTTGT ID. SEC Núm. 6
Fasn	NM017332	5'-GGACATGGTCACAGACGATGAC ID. SEC Núm. 7	5'-CGTCGAACTTGGACAGATCCTT ID. SEC Núm. 8
Dgat1	NM053437	5'-GTTCCAGCTCAGACAGCGGTTT ID. SEC Núm. 9	5'-CATCACCACGCACCAATTCA ID. SEC Núm. 10
Fnpla2	NM001108509	5'-GGCCATGATGGTGCCCTATA ID. SEC Núm. 11	5'-CCAACAAGCGGATGGTGAA ID. SEC Núm. 12
Hsl	NM012859	5'-CCCCGAGATGTCACAGTCAAT ID. SEC Núm. 13	5'-GAATCCCGGATCGCAGAA ID. SEC Núm. 14
PPAR- $\alpha$	NM013196	5'-GTCCCTCGGAGAGG ID. SEC Núm. 15	5'-GGAAGCTGGAGAGA ID. SEC Núm. 16
Acox1	NM0173340	5'-CGACCTTGTTGCGGCAAGT ID. SEC Núm. 17	5'-TGAGAAGACCTTAACGACCACGTA ID. SEC Núm. 18
Ehhadh	NM133606	5'-TCCCTGGCTTTCTACGTTCCCT ID. SEC Núm. 19	5'-GATGGTGGCTGCTCGAT ID. SEC Núm. 20
Acadm	NM016986	5'-CGCCGGAACACGTACTTTG ID. SEC Núm. 21	5'-CGAGCTGGTTGGCAATATCTC ID. SEC Núm. 22
Ucp3	NM019354	5'-GGACAGCAGCCTGTATTGCA ID. SEC Núm. 23	5'-GGTTGCACTTCGGAAGTTGT ID. SEC Núm. 24
Scd1	NM139192	5'-CCGTGGCTTTTCTTCTCTCA ID. SEC Núm. 25	5'-CTTCCGCCCTTCTCTTTGA ID. SEC Núm. 26
Oxt	NM012996	5'-CGCCTGCGACCCTGAGT ID. SEC Núm. 27	5'-AAGGAAGCGCCCTAAAGGTATC ID. SEC Núm. 28

Figura 9