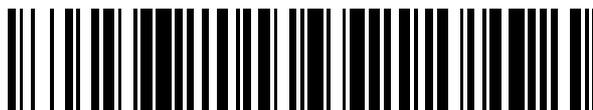


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 956**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2005 E 05729508 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1734986**

54 Título: **Método para modular el apetito**

30 Prioridad:

13.04.2004 AU 2004901957

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

11.01.2016

73 Titular/es:

**ST VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED
(100.0%)**

**CENTRE FOR IMMUNOLOGY VICTORIA STREET
SYDNEY, NSW 2010, AU**

72 Inventor/es:

**BREIT, SAMUEL NORBERT y
BAUSKIN, ASNE RHODA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 555 956 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

Método para modular el apetito

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con un método para modular el apetito y/o peso corporal en un individuo. En particular, la invención se relaciona con mic-1 o un fragmento mic-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad. También aquí se describe un método para administrar a un sujeto que sufre de apetito reducido y/o pérdida de peso asociada con tumores en estadios tardíos (particularmente, cánceres), una cantidad efectiva de un agente que es capaz de reducir la cantidad de citoquina 1 de inhibidor de macrófago (mic-1) presente en el sujeto o que de otra forma inhibe la actividad de mic-1 en el sujeto.

10 Antecedentes de la invención

El control de peso corporal es un proceso complejo que en la actualidad se entiende de forma incompleta.

15 Es multifactorial y está influenciado por el apetito, ingesta y eliminación de alimentos, utilización y gasto de energía. Se conoce una serie de mediadores solubles que están implicados en la regulación de diversos aspectos de este proceso e incluyen hormonas y citoquinas tal como leptina, grelina, melancortina, péptido relacionado con agouti, y neuropéptido Y (NPY). El control de peso normal es importante para la buena salud y obesidad especialmente, puede aumentar enormemente la morbilidad y mortalidad en individuos. También puede ser problemático el peso inferior al peso promedio, y en sociedades desarrolladas, en donde está disponible suficiente alimento, esto es más frecuente debido a enfermedades que incluyen algunos trastornos inflamatorios crónicos, trastornos alimenticios tales como anorexia nerviosa, y cáncer. Especialmente en los estadios tardíos de cáncer, la caquexia es común (que ocurren en la mayoría de pacientes con cáncer terminales), y es responsable de aproximadamente un cuarto de las muerte relacionada con cáncer.

25 Algunos años atrás, el actual solicitante clona y caracteriza una citoquina de la superfamilia de TGF-β humano novedoso que se denomina la citoquina 1 inhibidora de macrófago (MIC-1) (1-7), pero desde entonces también se conoce como factor derivado de próstata (PDF), proteína morfogenética ósea placentaria (PLAB), y factor 15 de crecimiento/diferenciación (GDF-15) (7). Bajo condiciones de descanso, la placenta es solo el tejido que expresa grandes cantidades de MIC-1 (7), pero las células epiteliales en una amplia variedad de otros órganos también expresan normalmente cantidades pequeñas de mRNA MIC-1. Este nivel bajo de expresión normal MIC-1, sin embargo, se aumenta dramáticamente en tumores malignos, inflamación y lesión (7, 8-11), el aumento está inducido en una amplia variedad de tensiones celulares y factores de activación, y está mediado intracelularmente, particularmente mediante el factor de transcripción p53 y EGR-1 (12-15). En particular, el aumento en la expresión MIC-1 se ligado fuertemente a cánceres de mama, próstata, pancreático y de colon (9-11, 17, 18), y en un estudio recientemente publicado (20) de varios cientos de pacientes con pólipos colónicos o cáncer de colon, el actual solicitante muestra que la elevación de los niveles de suero de MIC-1 ocurre en una forma en etapas progresiva, que refleja la patogenia de cáncer de colon, con evolución de normal a benigno y luego para pólipos colónicos displásicos y finalmente cáncer de colon. Esta observación, junto con los resultados de otros estudios (15, 17, 19, 21), sugiere que el MIC-1 tiene una función importante en la evolución del tumor, al inducir efectos paracrin significativos que modulan el ambiente del tumor.

Se sabe que las citoquinas están implicada en caquexia (Rubin, H. PNAS (2003) Vol. 100 (9), pp 5384-5389).

40 Se conocen los trastornos inmunológicos y proliferativos de células que están asociados con MIC-1, como lo son los métodos para detectarlos. Dichos trastornos han sido tratados al suprimir o mejorar la actividad de MIC-1 (documento WO99/06445).

Adicionalmente, se conocen métodos para diagnosticar el riesgo de aborto espontáneo y/o nacimiento prematuro, anomalías fetales, enfermedad inflamatoria y cáncer, que implican la determinación de niveles anormales de MIC-1 en una muestra (documento WO01/81928).

45 También se ha encontrado que los niveles de suero de las proteínas MIC-1 son elevados en pacientes con cáncer metastásico (Welsh. J.et al. PNAS (2003) Vol. 100 (6), pp 3410-3415).

50 En trabajo que conduce a la presente invención, se ha observa que los niveles de suero de MIC-1 de pacientes en estadios tardíos de uno de los cánceres epiteliales mencionados anteriormente (por ejemplo niveles de suero de 10 a 50 ng/ml o más), se correlaciona con niveles de suero en ratones que sobreexpresan MIC-1 y que muestran pérdida de peso marcada. Por lo tanto se propone que la caquexia que se exhibe comúnmente en pacientes con cáncer asociado con aumento de la expresión MIC-1, es debido a la sobreexpresión de MIC-1 y que al inhibir esa

expresión (por ejemplo con anticuerpos anti-MIC-1), sería posible reversar o reducir la severidad de la pérdida de peso.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad.

- 5 Adicionalmente, la presente invención también proporciona MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad, en donde dicho MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo se mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente.

10 Aquí se describe un método para modular el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que modula MIC-1, en donde dicho agente aumenta o reduce la cantidad de MIC-1 presente en dicho sujeto, o inhibe o mejora la actividad biológica de MIC-1 presente en dicho sujeto.

Aquí se describe un método para aumentar el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que inhibe MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente.

- 15 Aquí se describe un método para reducir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que mejora MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 proporciona un diagrama esquemático del procesamiento del precursor MIC-1 a través de su forma madura, 112 aminoácidos. La división del propéptido del dominio maduro ocurre en Arg¹⁹⁶.

La Figura 2 muestra gráficamente la relación entre el peso de ratones sin pelo y niveles de suero MIC-1 humanos en la sangre recolectada cuando el tumor más grande del ratón ha alcanzado un diámetro de aproximadamente 1 cm. Se xenoinjertan ratones sin pelo con células DU145 humanas construidas por ingeniería para sobreexpresar;

- (i) el MIC-1 humano de longitud completa (que incluye el propéptido) (serie 3),
25 (ii) MIC-1 humano maduro (no propéptido) (serie 1),
(iii) MIC-1 humano que incluye el propéptido pero que tiene el sitio proconvertasa similar a furina eliminado (FURIN DEL) (serie 2), y
(iv) vector solo de control negativo (serie 4).

30 La Figura 3 muestra gráficamente la relación entre el porcentaje de pérdida de peso de ratones sin pelo (comparado con el peso al inicio del experimento) y niveles de suero de MIC-1 humano en sangre recolectada cuando el tumor más grande del ratón ha alcanzado un diámetro de aproximadamente 1 cm. Los ratones sin pelo se xenoinjertan con células DU145 humanas construidas mediante ingeniería para sobreexpresar;

- (i) el MIC-1 humano de longitud completa (que incluye el propéptido) (serie 3),
(ii) MIC-1 humano maduro (no propéptido) (serie 1),
35 (iii) MIC-1 humano que incluye el propéptido pero tiene el sitio proconvertasa similar a furina eliminado (FURIN DEL) (serie 2), y
(iv) vector solo de control negativo (serie 4).

40 La Figura 4 proporciona los resultados gráficos del efecto de anticuerpos antiMIC-1 humanos de oveja en peso de ratón (g). (A) En el día 27, a dos ratones se les da 10mg (intraperitonealmente) de IgG purificado de ovejas inmunizadas con MIC-1 recombinante altamente purificada para desarrollar anticuerpo de título alto al MIC-1 humano. (B) En el día 27, a dos ratones se les da 10mg (intraperitonealmente) del IgG de control purificado de suero de oveja normal. Las gráficas A y B muestran los datos representativos de uno de cada uno de los ratones en los dos grupos.

La Figura 5 proporciona los resultados de una evaluación de pérdida de peso con una estirpe de ratón transgénico que sobreexpresa MIC-1 (TG) min 28. El peso corporal se reduce significativamente ($P < 0.001$) en ratones machos y hembras min 28 comparado con compañeros de camada tipo natural congénicos (3 litros, 59 a 61 días de edad).

5 La Figura 6 proporciona los resultados de una evaluación de pérdida de peso con una estirpe de ratones transgénicos que sobreexpresan MIC-1 (TG) min 75. El peso corporal se reduce significativamente ($P < 0.001$) en ratones machos y hembra min 75 comparado con compañeros de camada tipo natural congénicos (WT) (3 litros, 59 a 61 días de edad).

10 La Figura 7 muestra una comparación de peso corporal (g), de ratones compañeros de camada tipo natural (símbolos rellenos, WT) y transgénicos heterocigotos (TG, símbolos abiertos) de siete camadas. El número indica el peso promedio de ratones heterocigotos comparados con sus compañeros de camada tipo natural dentro de cada camada. Los ratones WT y TG recién nacidos (menos que los ratones de <48h de edad) no son significativamente diferentes en pesos corporales.

15 La Figura 8 muestra que la administración de un anticuerpo monoclonal (MAb26) al MIC-1 humano puede revertir la pérdida de peso en los ratones sin pelo xenoinjertados con células DU145 humanas que se han traducido para sobreexpresar MIC-1 utilizando una construcción de MIC-1 humano maduro (no propéptido). Los ratones inyectados con células DU145 que sobreexpresan MIC-1 empiezan a perder peso rápidamente. La administración una única inyección de MAb26, en cantidades entre 0.1 y 1mg, en el día 11, provoca un aumento en el peso, la magnitud de lo cual, y la duración de lo cual, aumenta con aumento en las cantidades de MAb26 (A-C). No se presenta efecto de MAb26 en crecimiento de tumor (D-F). Los ratones no tratados (G) y los ratones tratados con regulador PBS solo (H) rápidamente y continuamente pierden peso sobre el curso del experimento. El peso (g) está sobre el eje vertical.

20 La Figura 9 muestra una comparación de la absorción de alimento, diariamente sobre 3 días sucesivos, en ratones sin pelo xenoinjertados con células DU145 humanas que se han transducido para sobreexpresar MIC-1 utilizando una construcción de MIC-1 humano maduro (no propéptido) y ratones de control que reciben células DU145 transducidas con una construcción de control.

25 La Figura 10 muestra una comparación de peso de músculo y la almohadilla de la pata en ratones sin pelo xenoinjertados con células DU145 humanas que se han transducido para sobreexpresar MIC-1 utilizando una construcción de MIC-1 humano maduro (no propéptido) y ratones de control que reciben células DU145 transducidas con una construcción de control. Los MIC-1 que llevan tumores de expresión DU145 se representan por barras sólidas y las barras abiertas representan ratones que tienen tumores de control. La comparación estadística se lleva a cabo utilizando la prueba T y el número de estrellas indica el aumento de la significancia estadística de $p = 0.003$ a $p < 0.0001$. Se presenta una reducción marcada en el peso de grasa corporal en grasa inguinal, grasas del epidídimo y grasa retroperitoneal. No se presenta diferencia significativa en el peso del músculo entre los dos grupos de ratones. NS=no significativo ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

35 La Figura 11 muestra la absorción de alimentos en ratones transgénicos MIC-1 comparado con controles tipo natural. Los ratones 5 tipo natural (WT) y 6 transgénicos (TG) se alojan individualmente en jaulas, y se dejan durante 48 horas para que se ajusten al alojamiento único. El alimento puesto en la tolva se pesa en el punto de tiempo cero. Cada 24 horas, se estima el alimento consumido al restar el alimento rechazado y los derrames el peso del alimento pues en la tolva. La absorción de alimento se mide durante cuatro, periodos separados de 24 horas. La absorción de alimento por ratón/día es significativamente mayor en animales WT ($p < 0.03$) (A). Sin embargo, esta diferencia desaparece cuando la absorción de alimento se corrige para el peso corporal del ratón (B).

40 La Figura 12 muestra los pesos de los órganos de ratones MIC-1 transgénicos (TG) y ratones tipo natural (WT). Abreviaturas: m=macho, f=hembra, epid=epidídimo, ut=uterino, retroperit=retroperitoneal. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

45 La Figura 13 muestra los resultados de ensayos para MIC-1 que se unen a fetuina. El MIC-1 purificado recombinante (en 0.1% de BSA) se incuba con glóbulos de agarosa recubiertos con fetuina. Los glóbulos luego se lavan y el material unido se analiza mediante SDS-PAGE seguido por Western blot con anticuerpo anti-MIC-1. Línea 1, MIC-1 recombinante purificado; línea 2, MIC-1 unido a glóbulos de fetuina; línea 3, solo glóbulos de fetuina; línea 4, MIC-1 incubado con solo glóbulo de agarosa. La flecha indica la bandas MIC-1.

50 La Figura 14 muestra las secciones del cerebro de ratones adultos normales en la región del hipotálamo y el tercer ventrículo (V3) se cortan para ser sometido a (A) hibridación in situ para MIC-1 utilizando la sonda de ARN marcada ^{35}S y autoradiografía y (B) inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales purificados de afinidad en casa en MIC-1 de murino recombinante. Las secciones muestran la expresión de mARN MIC-1 y proteínas en la región de núcleo arqueado (AN) y la región paraventricular.

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado previamente que muchos cánceres, especialmente de origen epitelial, sobrepresan MIC-1 y que los niveles de MIC-1 en suero se elevan en pacientes con estos cánceres en proporción al estadio y grado de la enfermedad. Especialmente en estadios tardíos del cáncer, estos niveles de suero pueden alcanzar 10 a 50 ng/ml o más, niveles que en ratones se asocian con pérdida de peso marcada. Al reducir los niveles MIC-1 o la actividad de MIC-1 en pacientes con cáncer, se espera que la pérdida de peso, y los efectos negativos posteriores en el bienestar y autoestima del paciente, se pueden revertir o reducir. A su vez, esto puede ayudar en la capacidad del paciente que se va a tratar para cáncer y responde positivamente a la terapia, y por lo tanto reduce la morbilidad y mortalidad.

Aquí se describe un método para modular el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que modula MIC-1, en donde dicho agente aumenta o reduce la cantidad de MIC-1 presente en dicho sujeto, o inhibe o mejora la actividad biológica de MIC-1 presente en dicho sujeto ("método 1").

Cuando el método funciona para reducir la cantidad de MIC-1 presente en el sujeto (particularmente, para reducir el nivel de suero de MIC-1), o inhibe la actividad de MIC-1, el método puede aumentar el apetito y/o conducirá un aumento en el peso corporal o, por lo menos, una reducción en cualquier pérdida de peso corporal en el sujeto. De otra parte, cuando el método funciona para aumentar la cantidad de MIC-1 (particularmente, para aumentar el nivel de suero de MIC-1), o mejorar la actividad de MIC-1, el método puede reducir el apetito y/o conduce a una reducción en el peso corporal o, por lo menos, una reducción en cualquier ganancia de peso corporal en el sujeto.

Aquí se describe un método para aumentar el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que inhibe MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente ("método 2").

El método 2 involucra la administración de un agente que inhibe MIC-1. Dicho agente puede reducir la cantidad de MIC-1 endógeno en el sujeto (particularmente, el nivel de suero de MIC-1 endógeno), y se puede seleccionar de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos (por ejemplo fragmentos Fab o fragmentos scFv recombinantes (22)), moléculas de oligonucleótidos inhibidora y catalíticas dirigidas contra el gen *MIC-1* (por ejemplo ribozimas, ADNzimas, ARN antisentido, y ARN inhibidor pequeño (siARN)), y inhibidores de transcripción o traducción de *MIC-1*. Alternativamente, el agente que inhibe MIC-1 puede inhibir la actividad de MIC-1 endógeno en el sujeto, y se puede seleccionar de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos (por ejemplo fragmentos Fab o fragmentos scFv recombinantes), dominios del receptor extra citoplásmico soluble de receptores MIC-1, otras moléculas solubles o proteínas asociadas con matriz que se unen a MIC-1 (por ejemplo heparina, sulfato de heparan y fetuina), y péptido, imitador de péptido, o inhibidores de molécula orgánica pequeña de, por ejemplo, unión de MIC-1 a su receptor. Adicionalmente, péptido, imitador de péptido, o inhibidores de molécula orgánica pequeña pueden inhibir la actividad de MIC-1 endógeno al inhibir la fosforilación del receptor MIC-1, o transmisión de información de señalización del receptor MIC-1 al núcleo de la célula, o acción de los factores de transcripción relevantes en el genoma celular. Adicionalmente, el agente que inhibe MIC-1 puede ser un inhibidor de la enzima proconvertasa responsable de la división del propéptido del dominio de proteína MIC-1 madura. Como se muestra en el ejemplo 1 aquí adelante, el MIC-1 inmaduro (es decir proMIC-1) se asocia con la matriz extracelular, y al inhibir de esta forma al inhibir la enzima de proconvertasa responsable del procesamiento de MIC-1, el MIC-1 se puede "bloquear" en la matriz extracelular. La enzima proconvertasa se puede inhibir mediante, por ejemplo, (a) transfección de células con un mutante alfa-1-antitripsina, alfa-1-antitripsina Portland, (b) péptidos poliarginina; y (c) péptidos con base en la secuencia de la proteína objetivo para la proconvertasa, que abarca la secuencia de propéptidos y la secuencia de proconvertasas de la proteína objetivo.

Preferiblemente, el agente que inhibe MIC-1 es un anticuerpo anti- MIC-1 o fragmento del mismo, y más preferiblemente, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-MIC-1. Los anticuerpos humanizados anti-MIC-1 se pueden producir de acuerdo con los métodos descritos en la Patente Estadounidense No. 5,225,539.

El método 2 es útil para el tratamiento de un sujeto que sufre de apetito reducido y/o pérdida de peso asociada con enfermedad inflamatoria (por ejemplo artritis reumatoide) y/o cáncer (particularmente, un cáncer epitelial tal como cáncer de mama, próstata, colónico, rectal, de vejiga y pancreático). El método, sin embargo, también puede ser útil para el tratamiento de apetito reducido y/o pérdida de peso asociada con cualquier otra enfermedad, afección o tratamiento en donde el MIC-1 se sobreexpresa (por ejemplo lesión, inflamación, tensión, y radioterapia y quimioterapia). Los sujetos adecuados para tratamiento con el método 2 se puede restringir por aquellos que muestran la sobreexpresión MIC-1 o, por lo menos, un nivel de suero MIC-1 consistentemente en el extremo alto del nivel de suero normal de 200-1200 pg/ml. Dichos sujetos se pueden seleccionar mediante la detección de un alto nivel de MIC-1 en suero (por ejemplo de una muestra de suero o sangre completa), utilizando un ensayo para MIC-1 (por ejemplo un ELISA MIC-1 (4)).

El método 2 se utiliza para el tratamiento de un sujeto que sufre de apetito reducido y/o pérdida de peso asociada con cáncer avanzado, en donde una masa de tumor total alta conduce frecuentemente a un alto nivel de suero de MIC-1.

Aquí también se describe un método para reducir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un agente que mejora MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente ("método 3").

5 El método 3 involucra la administración de un agente que mejora MIC-1. Dicho agente puede aumentar la cantidad de MIC-1 endógeno en un sujeto (particularmente, el nivel de suero of MIC-1 endógeno), y se puede seleccionar de MIC-1, y agentes que mejoran la transcripción o traducción del gen *MIC-1* (por ejemplo el factor de transcripción p53, que se observa frecuentemente en niveles elevados en enfermedades asociadas con la sobreexpresión de MIC-1, o agentes que mejoran la expresión p53 o actividad tal como nutlina (23)). Alternativamente, el agente que mejora MIC-1 puede mejorar la actividad de MIC-1 endógeno en el sujeto. Como se utiliza aquí, el término agente que
10 mejora MIC-1 debe ser considerado como que incluye agentes que imitan la actividad de MIC-1 (por ejemplo fragmentos MIC-1 activos, imitadores de péptidos de los dominios activos de MIC-1, y moléculas orgánicas pequeñas que imitan la actividad MIC-1).

El método 3 es útil para el tratamiento de un sujeto que sufre de obesidad o que puede desear de otra forma pérdida de peso por razones de bienestar o vanidad.

15 Los agentes que modulan MIC-1 para uso en los métodos descritos aquí se pueden formular en cualquier forma de dosificación o composición farmacéutica/veterinaria adecuada (por ejemplo composiciones para administración oral, bucal, nasal, intramuscular y intravenosa). Normalmente, dicha composición se administrará al sujeto en una cantidad que es efectiva para modular el apetito y/o peso corporal, y por lo tanto proporciona entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 100 µg/kg peso corporal por día del agente que modula MIC-1, y más
20 preferiblemente proporciona de 0.05 y 25 µg/kg de peso corporal por día del agente que modula MIC-1. Una composición adecuada que está destinada para administración diaria única, administración diaria múltiple, o liberación controlada o sostenida, según se necesita para lograr los resultados más efectivos.

Además de los agentes que modulan MIC-1 identificados anteriormente, otros agentes que modulan MIC-1 se pueden identificar al detectar agentes candidatos o colecciones de agentes para un efecto sobre la cantidad de MIC-1 presente en un sujeto y/o sobre la actividad de MIC-1. En forma similar, los agentes para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones se pueden evaluar para efectos colaterales indeseados sobre el apetito y/o peso corporal (por ejemplo supresión indeseable o mejora del apetito).
25

Por lo tanto la presente invención proporciona MIC- 1 o un fragmento MIC-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad.

30 Adicionalmente, la presente invención también proporciona MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad, en donde dicho MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo se mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente.

Aquí también se describe un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, dicho método comprende administrar dicho agente a dicho sujeto o un modelo de animal adecuado del mismo (por ejemplo un ratón), y detectar cualquier aumento o reducción en la cantidad de MIC-1 (particularmente, el nivel de suero MIC-1) en dicho sujeto o modelo de animal ("método 4").
35

Cualquier aumento o reducción en la cantidad de MIC- 1 en el sujeto o modelo de animal se puede identificar al obtener muestras MIC-1 (por ejemplo muestras de suero o sangre completa) antes y después de la administración de dicho agente, y determinar la cantidad respectiva de MIC-1 en dichas muestras (por ejemplo con un ELISA MIC-1).
40

Aquí se describe adicionalmente un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, dicho método comprende formar una mezcla entre MIC-1 (o un fragmento funcional o imitador del mismo), un socio de unión MIC-1 (preferiblemente, un receptor MIC-1 o fragmento funcional o imitador del mismo), y dicho agente, y detectar cualquier aumento o reducción en la unión entre el MIC-1 (o fragmento funcional o imitador del mismo) y el socio de unión MIC-1 ("método 5").
45

Un aumento en la unión puede indicar que es probable que el agente reduzca el apetito y/o peso corporal de un sujeto. De otra parte, una reducción en la unión puede indicar que es probable que el agente aumente el apetito y/o peso corporal de un sujeto.

Aquí se describe un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, dicho método comprende exponer un MIC-1 que expresa células a dicho agente y detectar cualquier aumento o reducción en el nivel de dicha expresión de MIC-1 ("método 6").
50

Un aumento en la expresión de MIC-1 puede indicar que es probable que el agente reduzca el apetito y/o peso corporal de un sujeto. De otra parte, una reducción en la expresión de MIC-1 puede indicar que es probable que el agente aumente el apetito y/o peso corporal de un sujeto.

5 Preferiblemente, este método se realiza *in vitro* utilizando una célula que expresa MIC-1 o estirpe celular seleccionada de macrófagos, células epiteliales, células endoteliales y estirpes celulares de los mismos.

Aquí también se describe un método para evaluar el apetito en un sujeto, dicho método comprende determinar la cantidad de MIC-1 (particularmente, el nivel en suero MIC-1) presente en dicho sujeto ("método 7").

Dicho método también puede ser predictivo de la masa corporal futura.

10 El hallazgo de que la sobreexpresión de MIC-1 parece reducir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, sugiere que los métodos de terapia génica que aumenta el nivel de MIC-1 en un sujeto puede proporcionar un tratamiento efectivo de obesidad. Por lo tanto, también aquí se contemplan métodos de terapia génica, y agentes de terapia génica, para reducir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, que comprende genes recombinantes *MIC-1* para tener aproximadamente aumento en la expresión de endógeno MIC-1. Los vectores adecuados para la introducción de los genes *MIC-1* incluyen vectores asociados adenovíricos o adenovíricos recombinantes, vectores retrovíricos recombinantes, vectores de lentivirus recombinantes, liposomas que incluyen ADN lineal, y blastocitos transformados o transducidos.

De forma que la naturaleza de la presente invención se puede entender más claramente, las formas preferidas de la misma ahora se describirán con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 Regulación de los niveles en suero de MIC-1

20 El MIC-1, como otros miembros de la superfamilia TGF- β de proteínas, se sintetiza como un precursor que contiene un propéptido de terminal N y un dominio MIC-1 maduro de terminal C. El precursor experimenta dimerización ligada a disulfuro en el retículo endoplásmico (ER) y, una vez dimerizado, deja el ER en el aparato de Golgi, en donde una convertasa similar a furina se divide en un sitio conservado RXXR (aminoácido 196) (SEQ ID No:1). Esta división separa el propéptido del dominio de termina C maduro y el MIC-1 de esta forma se libera como un dímero de enlace de disulfuro de 24.5 kD (1) (Figura 1).

30 Se ha encontrado previamente que las cantidades sustanciales de MIC-1 se secretan normalmente en una forma no procesada. Por ejemplo, se ha encontrado que el proMIC-1 no procesado endógeno se secreta de una variedad de células que incluyen la estirpe celular de trofoblasto BeWo (4), las estirpes celulares de cáncer de próstata LnCAP y PC3, la estirpe celular pancreática Panc 1 y el estirpe celular monocitoide U937. En la estirpe de adenocarcinoma de próstata, LnCAP, se ha encontrado que el proMIC-1 no procesado se asocia con la matriz extracelular (ECM), mientras que el MIC-1 maduro se ubica en el medio condicionado (24). Los estudios preliminares con transfectantes MDCK también se ha demostrado que la asociación ECM también está mediada por una región de terminal C del propéptido en los aminoácidos 144-195. Adicionalmente, el propéptido recombinante purificado y proMIC-1 interactúan con heparina a través de la misma región de terminal C del propéptido.

35 La asociación de proMIC-1 con el ECM, sugiere que la asociación ECM puede proporcionar almacenamiento local del MIC-1 latente, en donde el procesamiento del proMIC-1 almacenado resultaría en la liberación rápida del MIC-1 maduro (que tiene poca afinidad para ECM) en la circulación. Para probar este concepto, se realiza un modelo de xenoinjerto de tumor en los ratones sin pelo (16).

Materiales y Métodos

40 Utilizando la estirpe de carcinoma de próstata DU145 humano (17), que no hace el MIC-1 endógeno (en gran parte porque las células no producen p53 funcional) y por lo tanto es útil como un vehículo para expresar diversas construcciones MIC-1 humanas, se generan estirpes celulares DU145 permanentemente transfectadas y subclonadas que se transducen con vectores de expresión eucarióticos (vector IRES II EGFP, Clontech) que contienen las secuencias que codifican *sea*;

45 (i) proMIC-1 humano de longitud completa (excepto utilizando un péptido líder FSH, a diferencia del líder natural) (1),

(ii) MIC-1 humano maduro (no propéptido, pero que incluye un líder FSH),

(iii) proMIC-1 humano (que incluye un líder FSH) con una eliminación de la secuencia de aminoácidos RGRRRAR (SEQ ID No:2) que incluye el sitio proconvertasa similar a furina (mostrado en negrilla), evitando por lo tanto el procesamiento y liberación posterior del MIC-1 maduro del propéptido, y

(iv) vector solo de control negativo (5).

Se seleccionan subclones de alta expresión con base en la expresión de EGFP. Estas células se inyectan subcutáneamente en el flanco de ratones sin pelo BALB/c nu/nu inmunodeficientes. Los ratones se supervisan regularmente y su peso se determina sobre una base diaria de 2-3. Los ratones se sacrifican aproximadamente 2 meses después de inyección o cuando el diámetro del tumor alcanza 1.1cm. Se obtiene suero de estos ratones justo antes de sacrificio, para estimación del nivel de MIC-1 humano mediante ELISA (4, 16, 18). Este ELISA para el MIC-1 humano no reacciona en forma cruzada con MIC-1 de murino, y se ha utilizado previamente para la medición exitosa y exclusiva de los niveles de tumor MIC-1 humano en ratones (16).

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3. Solo el MIC-1 maduro que expresa el tumor en ratones muestra un nivel dramáticamente elevado del MIC-1 en suero. Los tumores de ratón que expresan el mutante FURIN DEL de MIC-1, que no se pueden procesar normalmente y de esta forma contener el propéptido, tiene niveles en suero de MIC-1 marcadamente menores. Mediante extrapolación de datos *in vitro*, parece que este resultado se debe a la estrecha asociación del mutante FURIN DEL con el ECM.

Discusión

Los resultados obtenidos en este ejemplo indican que el propéptido MIC-1 es importante en la regulación de la distribución de MIC-1 entre tejidos y sangre. Como tal, cualesquiera sustancias que se unan al propéptido MIC-1 (por ejemplo heparina y sulfato de heparan), o de otra forma compiten con los sitios de unión de matriz en el propéptido (por ejemplo propéptido recombinante purificado) se esperaría que aumentar el nivel de MIC-1 en la circulación. Como una consecuencia, se modularían las funciones mediadas por MIC-1 en suero, que incluyen apetito.

Ejemplo 2 Modulación del Apetito mediante MIC-1

Sobre el curso de la investigación descrita en el ejemplo 1, se observa que en el modelo de xenoinjerto los ratones, aquellos que llevan un MIC-1 que sobrepresa el tumor, pierden peso, o no ganan mucho peso como ratones de control. Por lo tanto los estudios se realizan para determinar el grado y razón para el efecto observado en el peso de ratones.

Materiales y Métodos

Los ratones se pesan justo antes de sacrificio y peso/% pérdida de peso se compara contra los niveles en suero de MIC-1 medidos (es decir según se determina por ELISA descrito en el ejemplo 1).

Para evaluar si los niveles en suero de MIC-1 son responsables de la pérdida de peso secundaria, se realiza un segundo estudio en donde los ratones sin pelo se inyectan subcutáneamente con el clon DU145 que sobreexpresa el MIC-1 humano maduro (y que hemos asociado previamente con los mayores niveles en suero de MIC-1) y en el día 27, después que los ratones han perdido peso sustancial, se inyectan intraperitonealmente con 1mg o 10mg del IgG de oveja purificado de control o IgG purificado de suero de oveja que se ha inmunizado con MIC-1 humano recombinante y tiene anticuerpos de título alto para el MIC-1 humano. Este IgG anti-MIC-1 humano de oveja reacciona con alta afinidad al MIC-1 humano y se ha utilizado previamente en un MIC-1 ELISA.

Para demostrar adicionalmente que la pérdida de peso observada está mediada por MIC-1 y no otro producto derivado de tumor, se hace una evaluación de la pérdida de peso de dos estirpes de ratón transgénicas (min 28 y min 75; ambas creadas en ratones C57B16) que sobreexpresan el MIC-1 de murino bajo el control del promotor *címs* específico de macrófago.

Resultados

En los estudios realizados con IgG anti-MIC-1 humano de oveja, se encuentra que 1mg del IgG anti-MIC-1 humano de oveja IgG no hace diferencia en el peso del ratón (datos no mostrados), sin embargo 10mg de IgG anti-MIC-1 (véase Figura 4A) induce una rápida ganancia de peso en ratones sin pelo que tienen tumor respectivo (cf los resultados se muestran en la Figura 4B con 10mg del IgG de control). Esta ganancia de peso alcanza un pico 5 a 6 días después de la administración de los anticuerpos, y luego gradualmente los ratones empiezan a perder peso durante los siguientes 7 a 10 días.

Los resultados de la evaluación de pérdida de peso en estirpes transgénicas de ratones min 28 y min 75 se muestran en la Figures 5 a 7 e indican que estos ratones también son sustancialmente más pequeños que sus compañeros de camada tipo natural congénicas. En estos ratones, el peso en el nacimiento es igual y las diferencias en el peso aparecen después de las primeras pocas semanas de vida.

Discusión

La pérdida de peso observada es muy dramática en algunos ratones y se encuentra que se relaciona con el nivel de suero del MIC-1 humano derivado de tumor. Los ratones transducidos con un clon DU145 que sobreexpresa el MIC-1 humano maduro tienen como mucho los más altos niveles de MIC-1 en suero y estos ratones pierden peso a una tasa dramática. La observación del comportamiento del animal, indican que una razón principal para esto, es una reducción dramática en la ingesta de alimentos por estos ratones. El hallazgo de que la pérdida de peso se puede revertir mediante administración con IgG anti-MIC-1 de oveja (pero no el IgG de control) demuestra que la pérdida de peso se debe a MIC-1. Esto se corrobora mediante la evaluación de pérdida de peso con las estirpes transgénicas de ratones min 28 y min 75. En estos ratones, que tienen niveles en suero de MIC-1 marcados incluso la expresión de MIC-1 es específica de macrófago, se observa un diferencial significativo en el peso cuando se compara con ratones tipo natural congénicos. Esta pérdida de peso efectuada ocurre después del nacimiento, debido a que las estirpes transgénicas de ratones y sus compañeros de camada tipo natural congénicas tienen pesos idénticos de nacimiento (es decir cómo se mide 24 horas después del nacimiento).

Ejemplo 3 Pérdida de peso asociada con tumor que secreta MIC-1 se reversa mediante la administración de un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1

Resultados y Discusión

Se establece un modelo de xenoinjerto en ratones sin pelo (como se describió anteriormente) en cuyos flancos se inyectan células DU145 construidas mediante ingeniería para sobreexpresar el MIC-1 maduro. Los ratones inyectados con células DU145 que sobreexpresan MIC-1 empiezan a perder peso rápidamente. La administración de una única inyección de un anticuerpo monoclonal a MIC-1 (MAB26), en cantidades entre 0.1 y 1 mg, en el día 11, provoca un aumento en el peso, cuya magnitud, y cuya duración aumenta con el aumento de las cantidades de MAB26 (Figura 8A-C). A la dosis más alta de aproximadamente 1mg, el peso se ha elevado a nivel de prexenoinjerto y toma aproximadamente 17 días para reducir de nuevo al mismo peso cuando primero se administra el anticuerpo. No existe efecto de MAB26 sobre el crecimiento del tumor (Figura 8D-F) y los ratones no tratados (Figura 8G) y los ratones tratados con solución salina regulada con fosfato (Figura 8H) (PBS) solo, rápidamente y continuamente pérdida de peso sobre la duración del experimento.

Ejemplo 4 Efecto sobre la absorción de alimento en modelo de xenoinjerto de ratón

Materiales y Métodos

Se establece un modelo de xenoinjerto en ratones sin pelo (como se describió anteriormente) en cuyos flancos se inyectan células DU145 construidas mediante ingeniería para sobreexpresar el MIC-1 maduro, o llevar un plásmido de control. En el día 8 después de inyección de las células DU145 que sobreexpresan MIC-1, cuando el volumen promedio del tumor es 56 mm³ y la pérdida de peso promedio es 7%, la absorción de alimento se mide durante 3 periodos consecutivos de 24 horas. Los ratones se dejan en grupos de 5 por jaula. El alimento se pone en la tolva y la camada se pesa en el punto de tiempo 0. Después de 24 horas, se estima el alimento consumido al restar el alimento que no se consumió y desechado del alimento puesto en la tolva. La absorción de alimento para los ratones de control de la misma forma, pero en el día 21 después de inyección de tumor cuando el volumen del tumor ha alcanzado un promedio de 70mm³.

Resultados

Los ratones inyectados con DU145 que sobreexpresan MIC-1 comen significativamente menos alimento (aproximadamente 30%) en el día 1, 2 y 3 (p=0.01, 0.0001 y 0.02) que los ratones de control (Figura 9). Una medición directa de la masa de grasa en estos ratones indica que la sobreexpresión de MIC-1 se asocia con una reducción marcada en la masa de grasa en las áreas de epidídimo, inguinal, y retroperitoneal sin reducción en la masa en dos músculos representativos (Figura 10).

Ejemplo 5 Medición de marcadores metabólicos en suero en modelo de xenoinjerto de ratón

Materiales y Métodos

Se establece un modelo de xenoinjerto en ratones sin pelo (como se describió previamente) en cuyos flancos se inyectan células DU145 construidas mediante ingeniería para sobreexpresar MIC-1 o células DU145 de control. En 11-16 días después de inyección de las células neoplásicas DU145 que sobreexpresan MIC-1 y 21-30 días después de inyección del tumor de control, cuando los volúmenes de tumor han alcanzado 100-200 mm³, y, o los ratones han perdido aproximadamente 18 % de peso corporal, los ratones se sacrifican. A partir de experimentos previos se sabe que los niveles de suero del MIC-1 humano derivado de tumor están entre 15 y 58 ng/ml. Se recolecta suero

mediante punción cardiaca y se evalúa para los marcadores metabólicos utilizando inmunoensayos comerciales. Se realiza comparación estadística utilizando la prueba T de Student.

Resultados y Discusión

5 La medición de un rango de marcadores metabólicos en ratones demuestra una reducción estadísticamente significativa en MIC-1 que sobreexpresan ratones con tumor de triglicéridos y ácidos grasos libres así como también glucagón y IGF-1 (datos no mostrados). También se presenta una reducción en los niveles de leptina que es consistente con la reducción en la masa de grasa, una indicación de que es muy probable que el MIC-1 reduce la absorción del alimento está mediado por el estímulo MIC-1 de leptina. La diferencia para glucosa es muy corta en significancia estadística a $p=0.053$. Estos hallazgos se mantienen en gran medida con inanición y pérdida de masa de grasa.

Ejemplo 6 Medición de peso de músculo y almohadilla de la pata en modelo de xenoinjerto de ratón

Materiales y Métodos

15 Se establece un modelo de xenoinjerto en ratones sin pelo macho (como se describió anteriormente). En los flancos de 20 ratones se inyectan células DU145 construidas mediante ingeniería para sobreexpresar MIC-1 y en 20 ratones se inyectan células DU145 transducidas con un plásmido de control. En 11-16 días después de inyección de las células neoplásicas DU145 que sobreexpresan MIC-1 y 21-30 día después de inyección del tumor de control, cuando los volúmenes de tumor han alcanzado 100-200 mm³, y, o los ratones han perdido aproximadamente 18 % de peso corporal, los ratones se sacrifican. El tejido adiposo marrón interescapular, inguinal, de epidídimo, y la grasa retroperitoneal y también el músculo tibial y gastrocnemio se cortan cuidadosamente, se retiran y se pesan y el peso se corrige para peso corporal.

Resultados y Discusión

25 No se presenta reducción en la grasa marrón pero existe una reducción marcada en el peso de grasa corporal en la grasa inguinal, grasa de epidídimo y grasa retroperitoneal (Figura 10). No se presenta diferencia significativa en el peso del músculo entre los dos grupos de ratones (Figura 10). Sin embargo, utilizando análisis de masa magra corporal total más sensible utilizando el formador de imágenes PIXImus (GE Lunar) indica que se presenta una reducción general en la masa magra corporal. También se confirma una reducción mucho mayor en la masa de grasa total y la masa de grasa abdominal.

Ejemplo 7 Ratones transgénicos MIC-1

Resultados y Discusión

30 Los ratones transgénicos se construyen mediante ingeniería para sobreexpresar MIC-1 de células monocitoides bajo el control del promotor c-fms. Estos ratones tienen niveles MIC-1 sistémicamente elevados, parecen estar bien y se reproducen normalmente. Estos se pueden distinguir de ratones tipo natural pero no muestran un retardo significativo en el crecimiento partiendo en aproximadamente 3 semanas y en la edad adulta (Figura 5-7). Este efecto se observa en dos estirpes transgénicas independientes denominadas min 75 y min 28.

35 Como los ratones de xenoinjerto de tumor, los ratones transgénicos que sobreexpresan MIC-1 comen significativamente menos que sus contrapartes tipo natural, pero esta diferencia desaparece si la absorción de alimento se corrige para el peso del ratón (Figura 11). Se considera que el aumento en los niveles de MIC-1 desde el nacimiento resulta en reducción de la absorción de alimento que resulta en reducción del tamaño y alcanza un equilibrio en que su tamaño sea apropiado para su absorción de alimento reducida. La medición de los mismos marcadores metabólicos en los animales transgénicos, como en los ratones xenoinjertados con tumor solo muestran una diferencia significativa en los niveles de IGF-1, que se reducen en los ratones transgénicos MIC-1.

45 La medición de la masa de grasa en las áreas inguinal, de epidídimo/uterina y retroperitoneal muestra una reducción en la masa de grasa en ratones transgénicos que sobreexpresan lo que es más prominente en ratones hembra comparado con ratones macho (Figura 12). A pesar de un bazo más pequeño y un timo más grande, todos los tres que analizan las almohadillas de la pata tienen tamaño reducido. En términos absolutos, no se presenta diferencia entre los pesos de WT versus el timo TG.

Ejemplo 8 Control de los niveles en suero de MIC-1 mediante fetuina

La presencia de MIC-1 en suero, a una concentración media de 450pg/ml en todos los individuos, sugiere que como algunas otras citoquinas de la superfamilia TGF- β , el MIC-1 se puede unir a uno o más moduladores circulantes. La

glucoproteína, fetuina se expresa ampliamente en células y tejidos y está presente en suero en sangre. La siguiente investigación se hace para determinar si el MIC-1 puede interactuar con esta glucoproteína.

Materiales y Métodos

5 El MIC-1 maduro recombinante, purificado (en 0.1% de BSA) se incuba con glóbulos de agarosa recubiertos con fetuina. Los glóbulos luego se lavan y el material unido se analiza mediante SDS-PAGE seguido por Western blot con anticuerpo anti-MIC-1: Línea 1, MIC- 1 recombinante purificado; Línea 2, MIC-1 unido a glóbulos de fetuina; Línea 3, solo glóbulos de fetuina; Línea 4, MIC-1 incubado solo con glóbulo de agarosa.

Resultados

Los resultados, mostrados en la Figura 13, indican claramente que el MIC-1 maduro interactúa y se une con fetuina.

10 Discusión

15 Cuando el MIC-1 se une a fetuina, la fetuina puede ofrecer una alternativa a la administración de anticuerpos anti-MIC-1 para modular las funciones mediadas por MIC-1 en suero. Por ejemplo, para modular los efectos inhibidores del MIC-1 en suero sobre el apetito, la fetuina se puede administrar a un sujeto (por ejemplo un sujeto que sufre de cáncer avanzado) mediante una ruta adecuada (por ejemplo administración intravenosa) con el propósito de reducir el nivel de MIC-1 "libre".

Ejemplo 9 Análisis de la expresión MIC-1 en cerebro de ratón normal

Resultados y Discusión

20 La absorción de alimento y el apetito se controlan por una disposición de complejo de mecanismos, muchos de los cuales se ubican en el sistema nervioso central. El área dentro del sistema nervioso que controla muchas funciones corporales basales tales como apetito y temperatura corporal se ubican dentro del área del hipotálamo. En el caso del apetito, se localizan muchos de los factores complejos que regulan este proceso en el núcleo arqueado del hipotálamo y muchos de los mediadores y receptores para los mediadores tales como neuropéptido Y en esta área. La barrera de cerebro en sangre en esta área también es defectuosa y es una de las áreas muy limitadas del cerebro en donde existe una oportunidad para que las moléculas sistémicas crucen la barrera de cerebro en sangre y actúan directamente en el cerebro. Se considera que el MIC-1 es capaz de ejercer un efecto directo sobre el núcleo arqueado y el hipotálamo mediante este mecanismo. Sin embargo. El MIC-1 también se expresa dentro de esta región del cerebro de ratón normal (Figura 14). Esto no representa la difusión del MIC-1 circulante como se indica por los estudios de hibridación *in situ* que demuestra la colocalización del mRNA MIC-1 y la proteína en el área del núcleo arqueado, área periventricular e hipotálamo paraventricular. La localización de MIC-1 en aquellas áreas de cerebro normales, fuertemente asociadas con funciones tales como el control del apetito, proporciona un fuerte argumento para la función del MIC-1, ambas de la circulación periférica, y se produce endógenamente dentro del cerebro, en el control de esta función importante.

35 A través de esta especificación la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

40 Cualquier discusión de los documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente especificación son únicamente para el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se toma como una admisión que cualquiera o todas estas materias hacen parte de la base de la técnica anterior o son de conocimiento general común en el campo relevante de la presente invención como existe en Australia o cualquier parte antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Referencias

1. Bootcov MR, Bauskin A, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He C, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh B, Nicholson R, Fairlie DF, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily cluster. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:11514-11519.
- 45 2. Breit SN, Bootcov MR. "Novel TGF-beta like cytokine", International Patent Application No PCT/AU96/00386 (WO 97/00958).
3. Fairlie WD, Zhang H-P, Brown PK, Russell PK, Bauskin AR, Breit SN. Expression of a TGF- β superfamily protein, Macrophage Inhibitory Cytokine-1, in the yeast *Pichia pastoris*. Gene 2000; 254:67-76.

4. Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier MLC, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN. TGF- β superfamily cytokine MIC-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4781-88.
5. Fairlie WD, Russell PK, Moore AG, Zhang H-P, Brown PK, Breit SN. Epitope mapping of the Transforming Growth Factor- superfamily protein, MIC-1: Identification of at least five distinct epitope specificities. *Biochemistry* 2001; 40:65-73
6. Breit SN et al. "Diagnostic assay and method of treatment involving macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1)", International Patent Application No PCT/AU01/00456 (WO 01/81928).
7. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang H-P, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF- β superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukocyte Biol* 1999; 65:2-5.
8. Koniaris LG. Induction of MIC-1/growth differentiation factor-15 following bile duct injury. *J Gastrointest Surg* 2003 Nov 7(7):901-5.
9. Welsh JB, Hampton GM. Analysis of Gene Expression Identifies Candidate Markers and Pharmacological Targets in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2001; 61:5974-5978.
10. Buckhaults P, Vogelstein B, Kinzler KW. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res* 2001; 61:6996-7001.
11. Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, Ward RL, Hawkins NJ, Quinn DI, Russell PJ, Sutherland RL, Breit SN, Moskaluk CA, Frierson, HA Jr. and Hampton GM. Large-Scale Delineation of Secreted Protein Biomarkers Overexpressed in Cancer Tissue and Serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3410-3415.
12. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. 2000 Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 470:77-82.
13. Pei-Xiang Li, et al. Placental Transforming Growth Factor-b Is a Downstream Mediator of the Growth Arrest and Apoptotic Response of Tumour Cells to DNA Damage and p53 Overexpression. *J Biol Chem* 2000; 275:20127-20135.
14. Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2003; Oct 2(10):1023-1029.
15. Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou M-F, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG, Hegi ME. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002; 27:4212-4219.
16. Brown DA, Bauskin AR, Fairlie WD, Smith MD, Liu T, Xu N and Breit SN. An antibody based approach to high volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *Biotechniques* 2002; 33(1):118-20, 122,124 passim.
17. Liu T, Bauskin AR, Zauders J, Brown DA, Pankurst S, Russell PJ, Breit SN. MIC-1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5034-5040.
18. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Sokoll L, Chan DW, Yeo CJ, Hruban RH, Breit SN, Kinzler KW, Vogelstein B, Goggins M. Serum MIC-1 as a Marker of Pancreatic and other Periampullary Cancers. *Clin Cancer Res* (in press).
19. Baek SJ et al. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59:901-908.
20. Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, Bauskin AR, Kinzler KW, Vogelstein B, Breit SN. MIC-1 serum level and genotype: Associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:2642-2650.
21. Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, Song KS, Lee YH et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; Aug 1; 63(15):4648-4655.

22. Pluckthun A, Antibody engineering: advances from the use of Escherichia coli expression systems. Bio/Technology 1991; 9: 545-551.

23. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science 2004; Feb 6; 303(5659):844-848.

24. Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, Rasiah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst, GJ, Johnen, H, Russell PJ, Barret W, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. Cancer Res 2005; March 15; 65(6):2330-2336.

10 Listado de secuencias

[0074]

<110> St Vincent's Hospital Sydney Limited

<120> Método para modular el apetito

<130> 03 1382 1643

15 <160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia consenso para proconvertasa

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (2)..(3)

<223> X= cualquier aminoácido

<400> 1

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 2

30 <211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 555 956 T3

<223> secuencia que incluye el sitio de proconvertasa similar a furina

<400> 2

Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg

1

5

REIVINDICACIONES

1. Citoquina 1 de inhibidor de macrófago (MIC-1) o un fragmento MIC-1 activo para uso en el tratamiento de obesidad.
 2. MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho MIC-1 o un fragmento MIC-1 activo se mezcla con un portador farmacológicamente aceptable y/o excipiente.
- 5

FIGURA 1

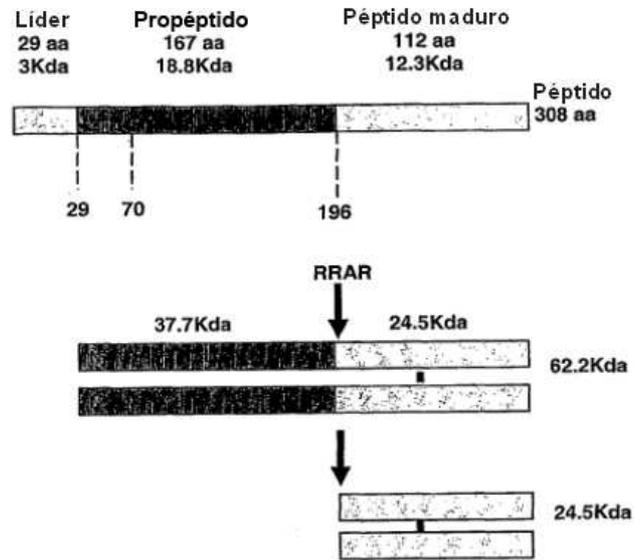


FIGURA 2

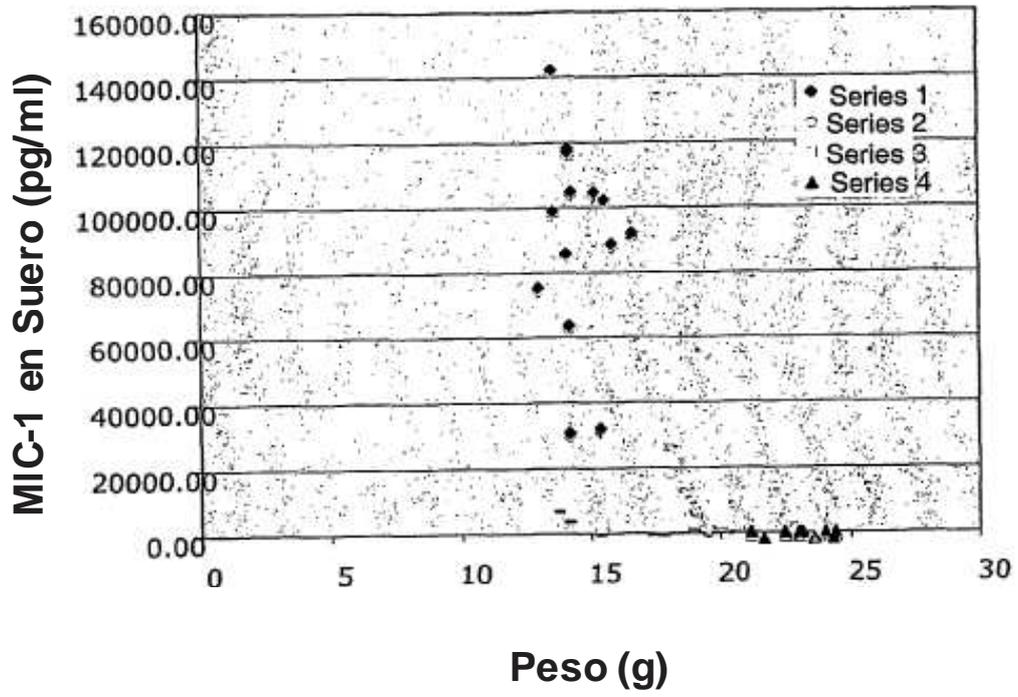


FIGURA 3

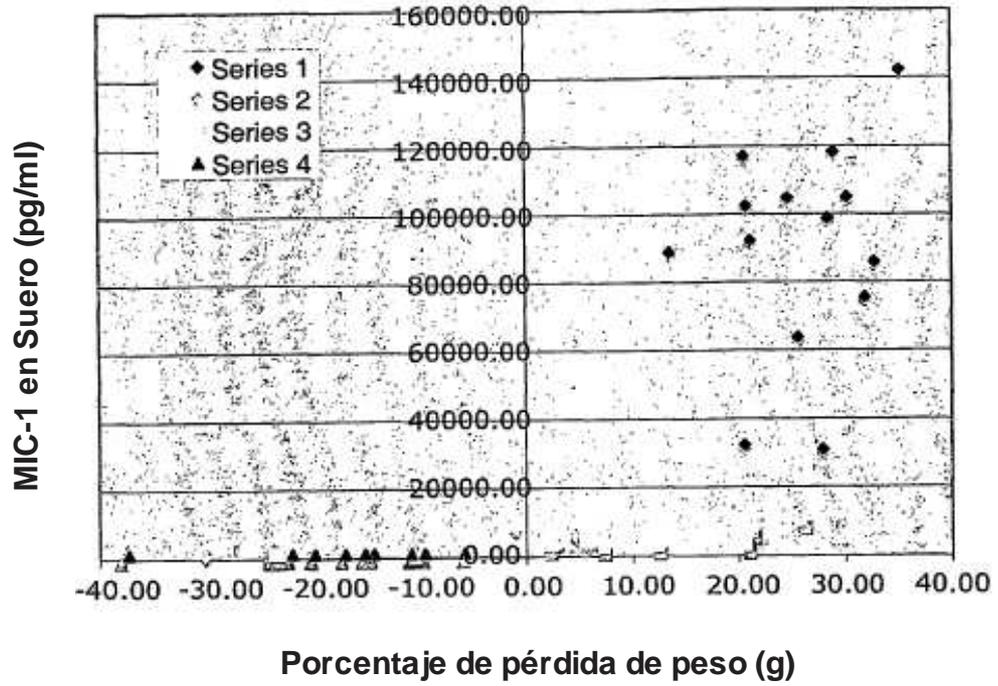


FIGURA 4A

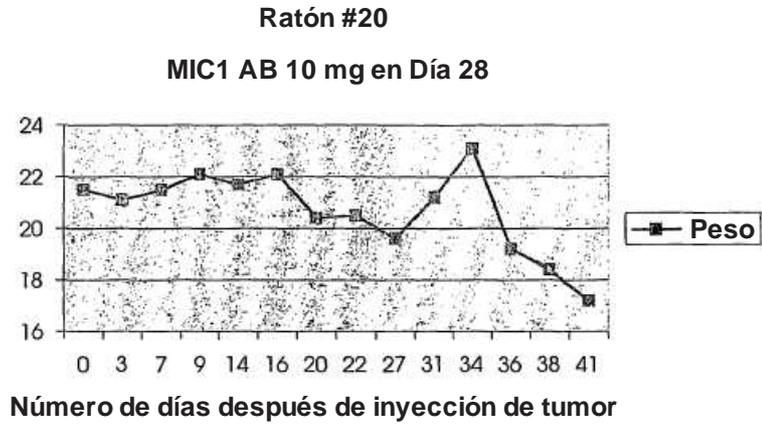


FIGURA 4B

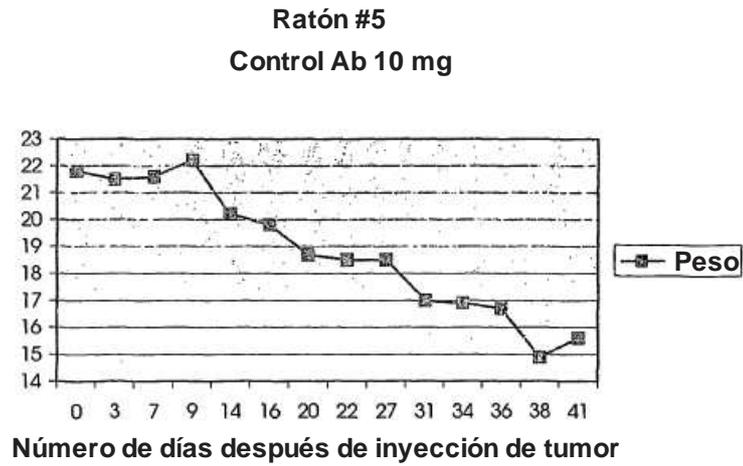


FIGURA 5

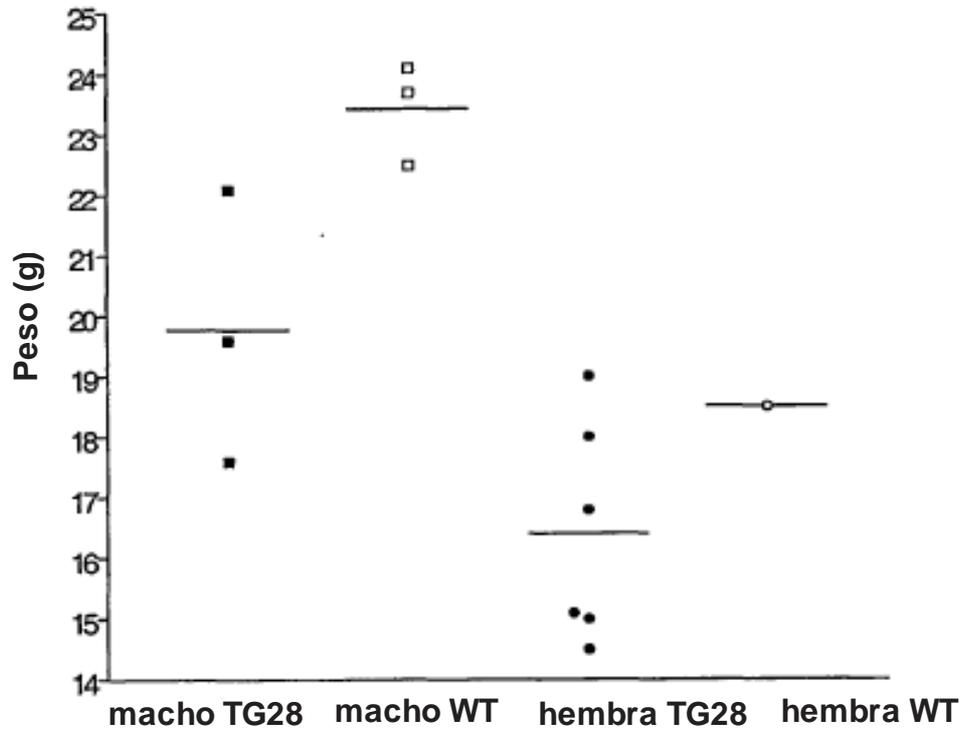


FIGURA 6

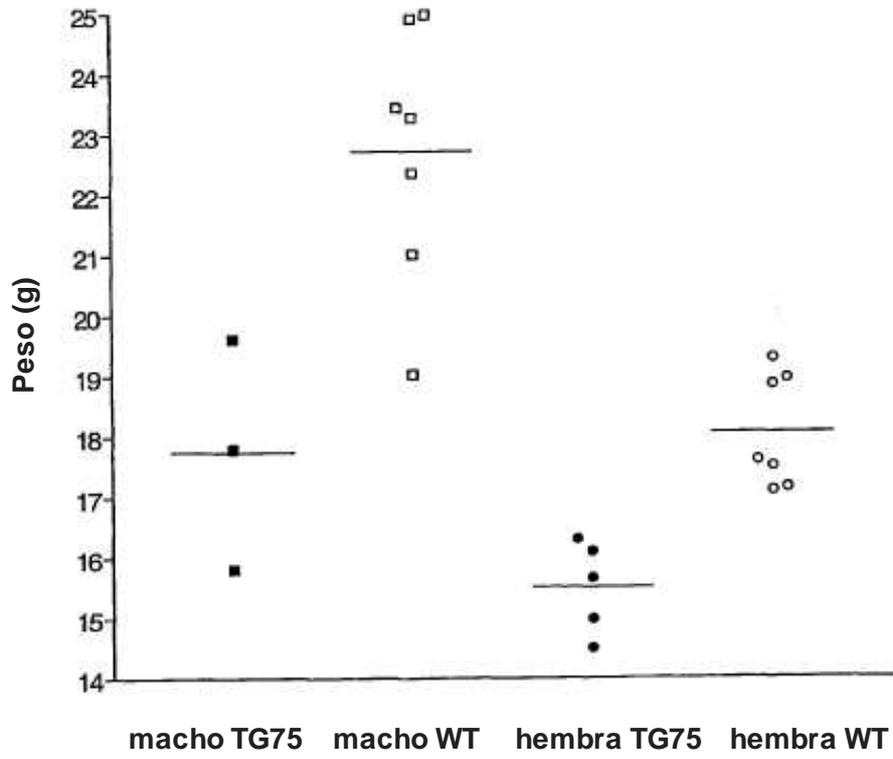


FIGURA 7

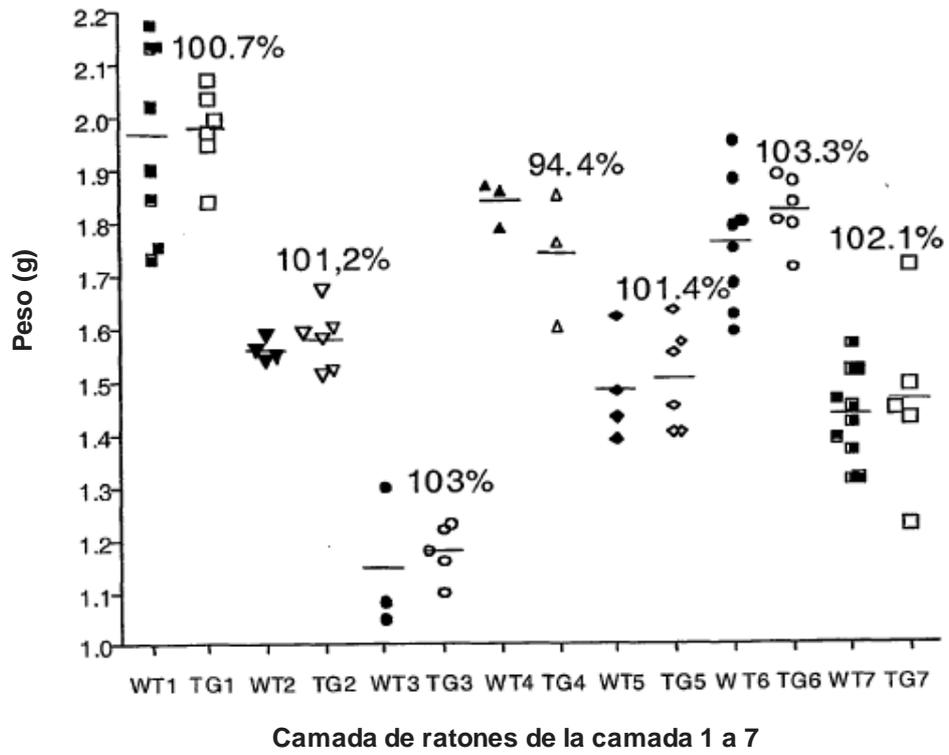


FIGURA 8A

Peso de ratón después de inyección de 0.1 mg de MAB en día 11

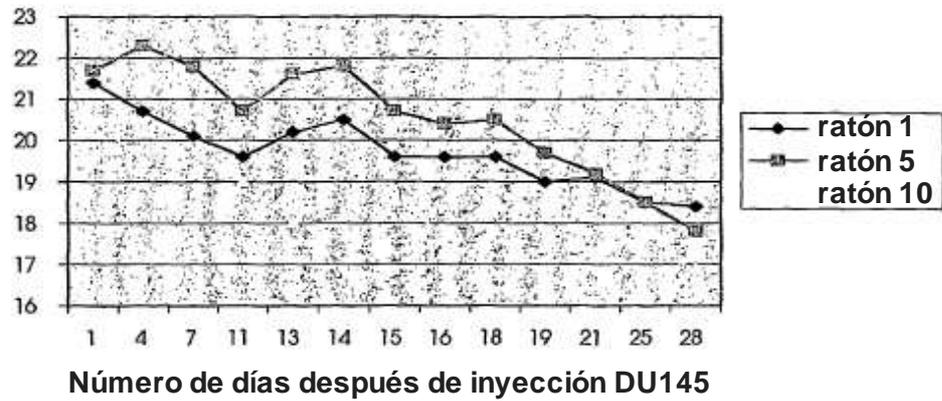


FIGURA 8B

Peso de ratón después de inyección de 0.3 mg de MAB en día 11

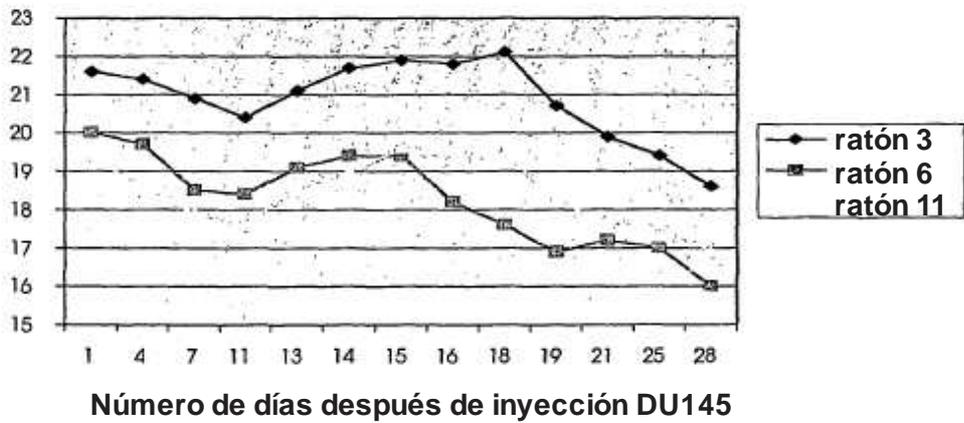


FIGURA 8C

Peso de ratón después de inyección de 1 mg de MAB en día 11

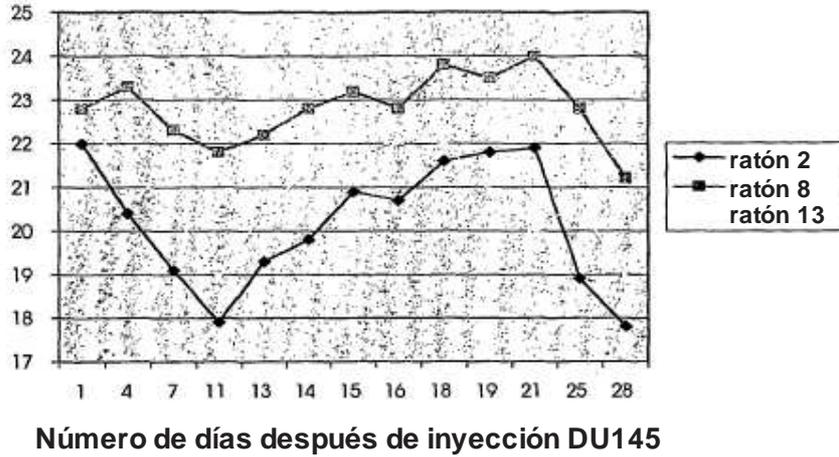


FIGURA 8D

Crecimiento de tumor en ratones inyectados con células Du145 (recibido 0.1 mg Mab en día 11)

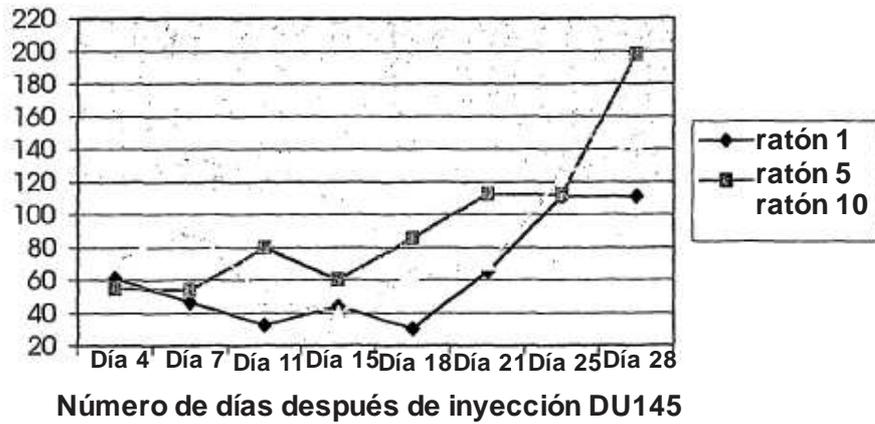
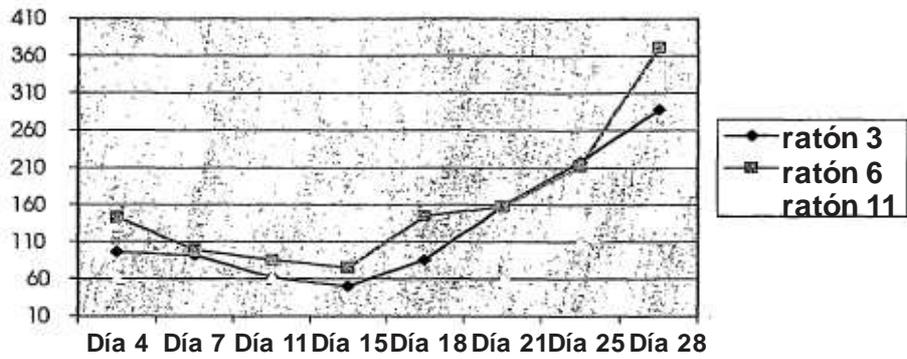


FIGURA 8E

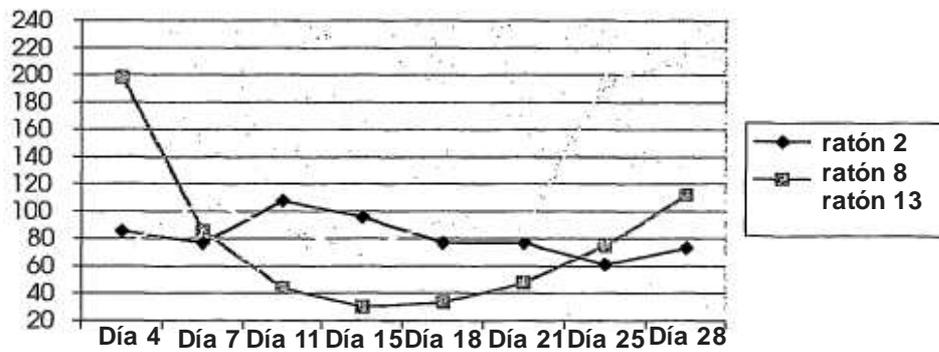
Crecimiento de tumor en ratones inyectados con células DU145 (recibido 0.3 mg Mab en día 11)



Número de días después de inyección DU145

FIGURA 8F

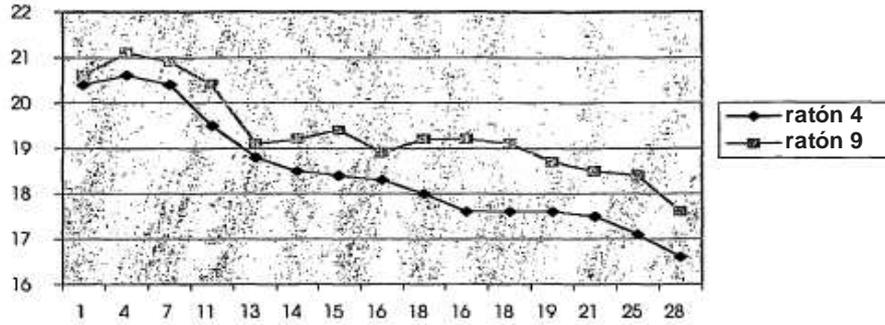
Crecimiento de tumor en ratones inyectados con células DU145 (recibido 1 mg Mab en día 11)



Número de días después de inyección DU145

FIGURA 8G

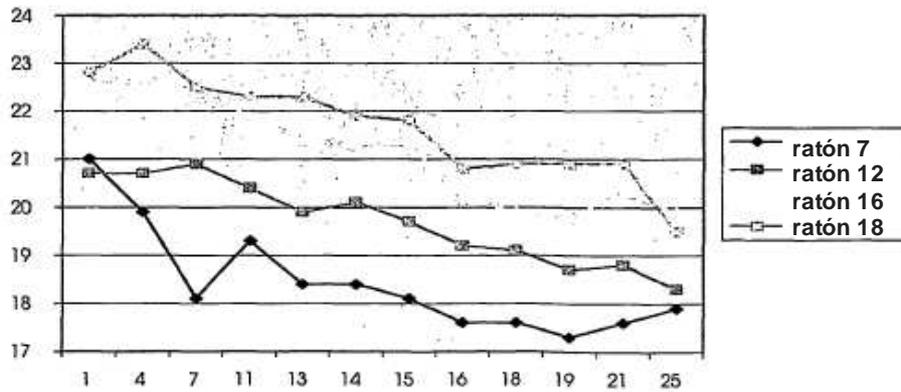
Peso de ratón después de inyección de PBS en día 11



Número de días después de inyección DU145

FIGURA 8H

Peso de ratón - sin tratamiento en día 11



Número de días después de inyección DU145

FIGURA 9

Ingesta de alimentos en ratones inyectados con DU145 que sobreexpresan MIC-1 células DU145 de control

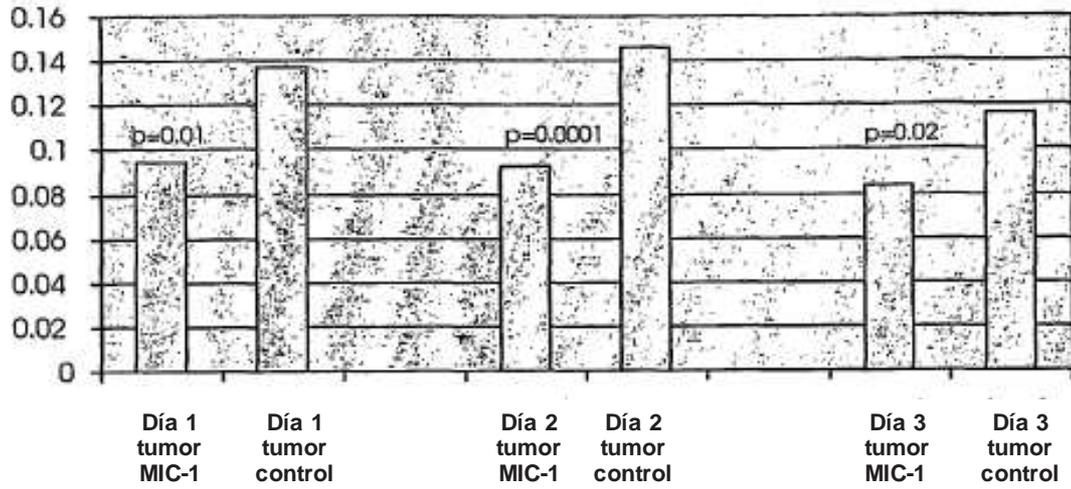


FIGURA 10

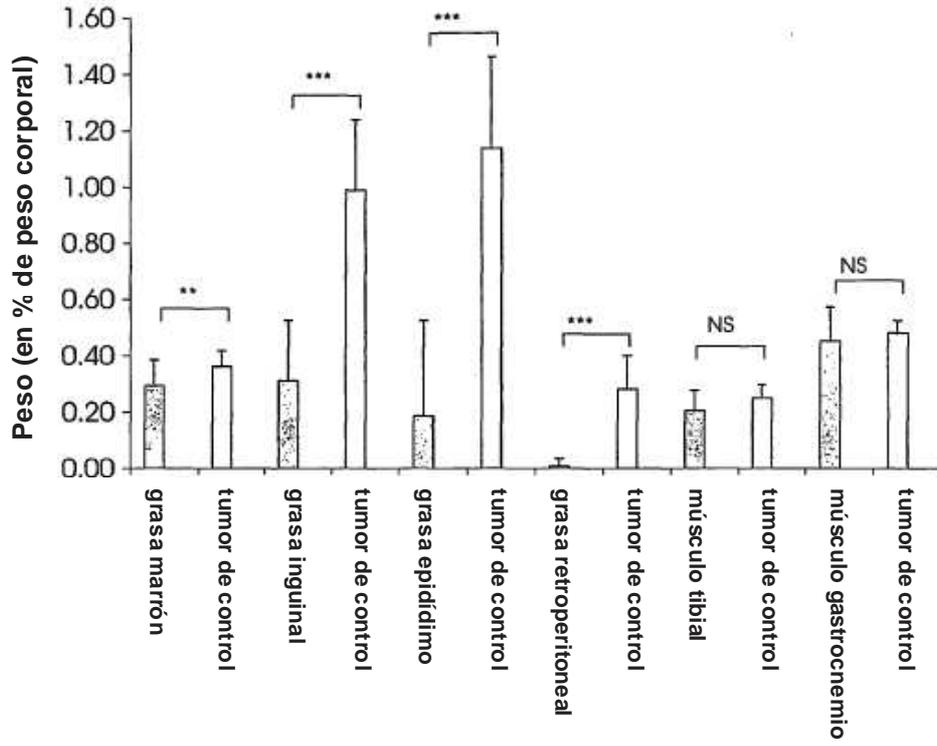


FIGURA 11

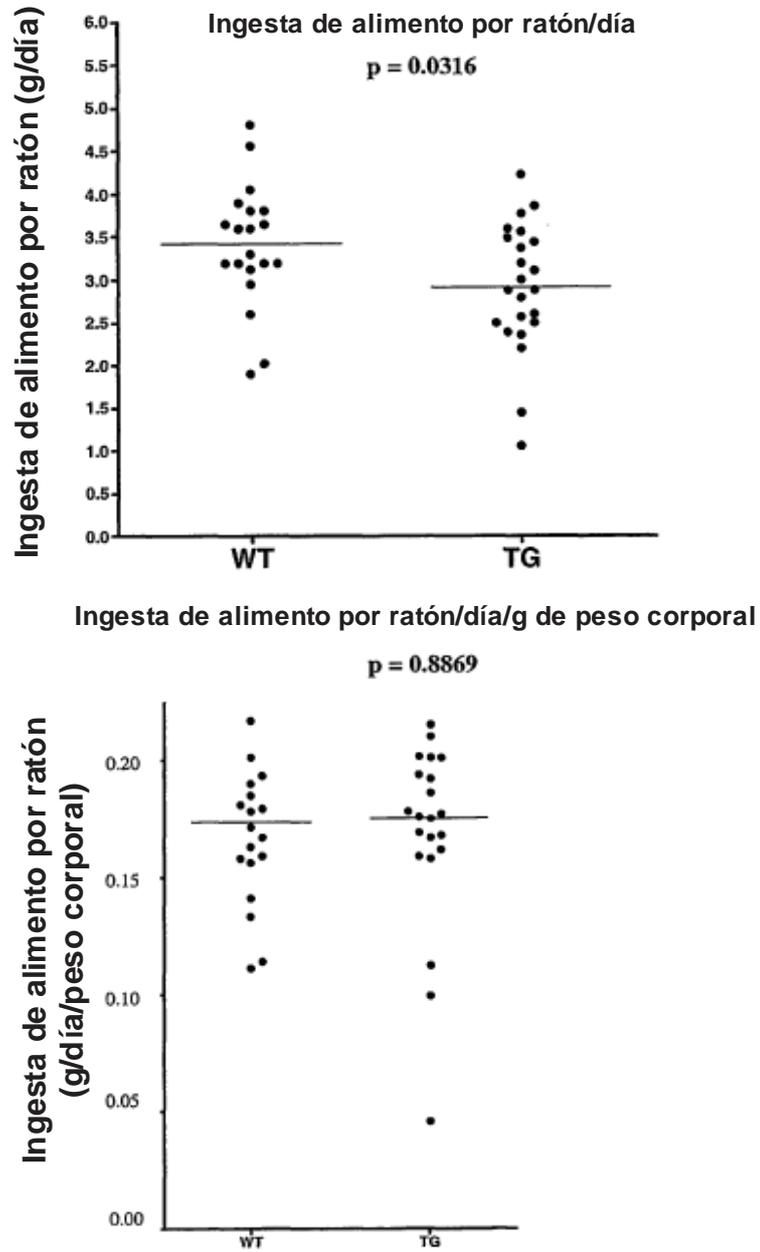


FIGURA 12

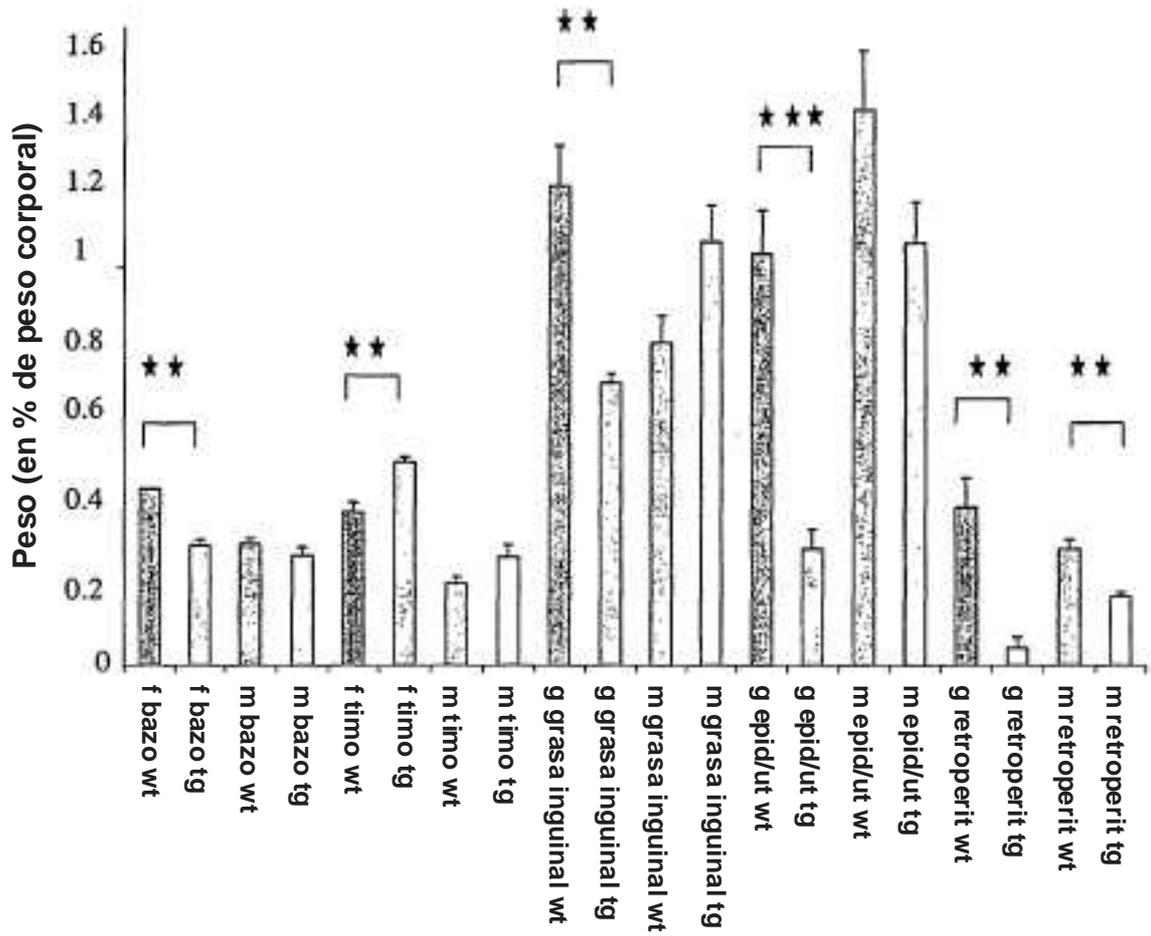


FIGURA 13

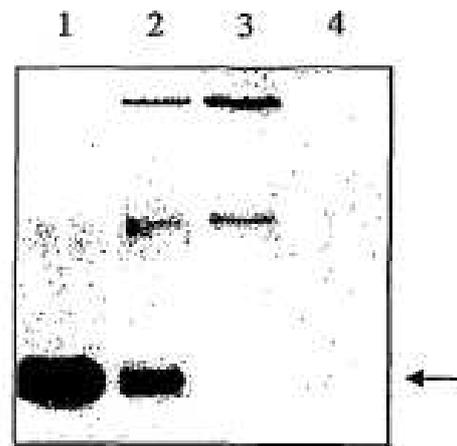


FIGURA 14A

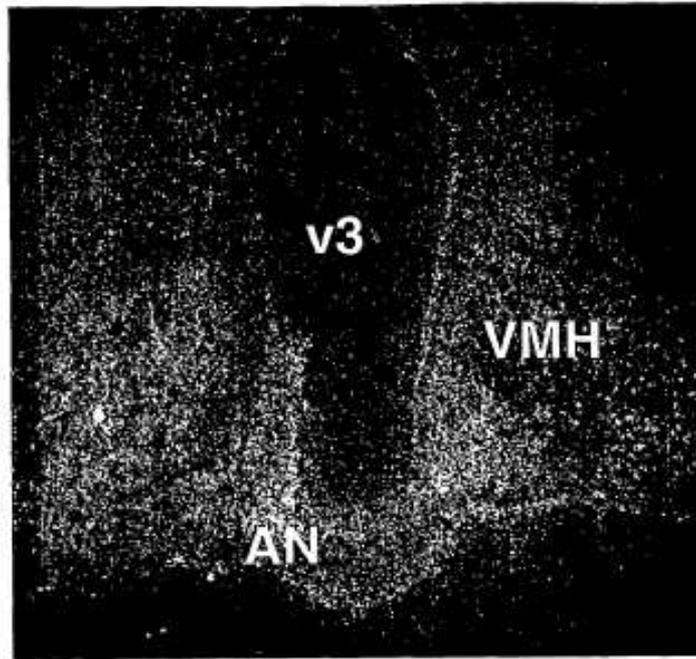


FIGURA 14B

