

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 251**

51 Int. Cl.:

A61K 38/11 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

A61P 5/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011** **PCT/EP2011/058590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011** **WO11147889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011** **E 11724392 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2575853**

54 Título: **Métodos y composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un paciente**

30 Prioridad:

21.09.2010 EP 10306004

25.05.2010 EP 10305545

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

28.12.2016

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%) y

CHU DE TOULOUSE (33.3%)

72 Inventor/es:

MUSCATELLI, FRANÇOISE;

TAUBER, MAITHÉ;

SCHALLER, FABIENNE y

THUILLEAUX, DENISE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 595 251 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

Métodos y composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un paciente

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un agonista del receptor de oxitocina para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano. En una realización particular, el agonista del receptor de oxitocina es la oxitocina o un fragmento activo de la misma.

Antecedentes de la invención

- 10 El síndrome de Prader-Willi es una enfermedad genética rara (SPW; OMIM 176270). Los pacientes con PW presentan un fenotipo complejo y progresivo con fundamentalmente dos fases. Desde el nacimiento hasta 2 a 3 años de edad, los pacientes presentan disfunción alimentaria con escasa lactancia y retraso en el desarrollo, una hipotonía grave, que tiende a desaparecer después. Paradójicamente, a partir de este periodo desarrollan obesidad hiperfágica. Los pacientes también presentan muchos otros síntomas tales como dolor respiratorio, retardo del crecimiento debido a la deficiencia de la hormona del crecimiento, hipogonadismo, perturbación del sueño, dificultades cognitivas, dermatilomanía ("skin picking"), umbrales altos del dolor (Bittel y Butler 2005; Muscatelli 2008; Cassidy y Driscoll 2009) problemas del comportamiento y problemas psiquiátricos probablemente relacionados con disfunciones sociales.

- 20 Hasta ahora, no se han identificado claramente mecanismos patofisiológicos completos, sin embargo, gran parte del fenotipo de SPW, incluyendo los problemas alimentarios, puede ser coherente con un defecto hipotalámico (Swaab 1997). Los estudios humanos fundamentalmente se han centrado en las desregulaciones hormonales y de neuropéptidos que podrían contribuir al fenotipo en pacientes adultos con PW, pero estas dosificaciones se han realizado en plasma proveniente de pacientes y controles. Paralelamente, pocos estudios han informado de análisis histológico del hipotálamo de pacientes con Prader-Willi.

- 25 Genéticamente SPW resulta de la falta de expresión de al menos dos genes impresos localizados en la región 15q11-q13, siendo expresada la copia paterna de estos genes y silenciada su copia materna. Se acepta que SPW es un síndrome multigénico, que implica más de un gen mutado (Goldstone, 2004). A partir de estudios genéticos se ha propuesto un papel de SNORD116 (codificador de ARN huérfano nucleolar pequeño), en la hiperfagia, obesidad e hipogonadismo descritos en SPW (Sahoo, del Gaudio et al. 2008; de Smith, Purmann et al. 2009).

- 30 *Magel2* es uno de los genes candidatos implicados en el síndrome de Prader-Willi. De manera importante, la región cromosómica 7C de ratón ha conservado sintenia con la región 15q11-q13 humana. Casi todo el contenido de los genes se conserva, su orden y su regulación impresa. Al crear y analizar un modelo de ratón mutante deficiente para *Magel2*, los inventores han mostrado que un ratón deficiente en *Magel2* tenía un inicio alterado de la actividad de lactancia y la alimentación posterior afectada, recordando el fenotipo de alimentación visto en los recién nacidos con PW. El hipotálamo de los neonatos mutantes *Magel2* mostró una reducción significativa del contenido de oxitocina. Consecuentemente, la inyección de un antagonista del receptor de oxitocina específico en neonatos de tipo silvestre recapituló la deficiencia de alimentación vista en los mutantes *Magel2*. De manera importante, una inyección simple de oxitocina, tres a cinco horas después del nacimiento, rescató el fenotipo de las crías de mutante *Magel2*, permitiendo a todas ellas alimentarse normalmente y sobrevivir. Por tanto, este estudio reveló un papel de *Magel2* y un papel inesperado de la OT, mediante el receptor de OT, en el inicio del comportamiento alimentario justo después del nacimiento. De manera importante, el fenotipo letal y la deficiencia del comportamiento alimentario observada en *Magel2* KO, se rescataron después de una inyección de 2 µg de oxitocina, 3 a 5 horas después del nacimiento.

Paralelamente, los inventores mostraron que los pacientes adultos con SPW que reciben una administración intranasal simple de oxitocina tienen significativamente menos conducta disruptiva, menos conflictos y una fuerte tendencia hacia menos tristeza y menos apetito.

45 Compendio de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que la administración de oxitocina es capaz de tratar los déficits de comportamiento en niños y adultos con síndrome de Prader-Willi. Además, la inyección de oxitocina o un agonista del receptor de oxitocina se podría considerar más generalmente para el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un paciente.

- 50 Por tanto, la invención se refiere a un agonista del receptor de oxitocina para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un paciente con síndrome de Prader-Willi, similar al síndrome de Prader-Willi o enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT, del inglés "Non-organic failure to thrive disease").

- 55 Un objetivo adicional de la invención consiste en una composición farmacéutica que comprende al menos un agonista como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio

temprano en un mamífero con síndrome de Prader-Willi, similar a Prader-Willi o enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 A lo largo de la memoria, se emplean diversos términos y se definen en los siguientes párrafos.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término “síndrome de Prader-Willi” indica una enfermedad compleja (OMIM 176270) que se desarrolla con la edad. Los criterios de diagnóstico clínicos esenciales incluyen hipotonía neonata y escasa succión (0 a 2 años), un retraso global del desarrollo (2 a 6 años), hiperfagia debida a la ausencia de mecanismos de saciedad normales que conduce a una obesidad grave (6 a 12 años), dificultades de aprendizaje, hipogonadismo, problemas de comportamiento y psiquiátricos (13 años hasta la edad adulta). Las anormalidades de la respiración son muy frecuentes en SPW desde el nacimiento. Desde el punto de vista genético, SPW es un síndrome génico continuo resultante de la ausencia de la expresión de las copias paternas de genes localizados en la región 15q11-q13; silenciándose las copias maternas de estos genes a través de mecanismos de impronta genómica, da como resultado una completa ausencia de expresión de estos genes in SPW. Las mutaciones observadas en pacientes con PW fundamentalmente son una delección larga *de novo* de la región 15q11-q13 del cromosoma paterno (70 a 80 %) o una disomia uniparental materna 15 (ambos cromosomas 15 son maternos en origen) (25 a 30 %). Unos pocos pacientes con PW (1 a 3 %) tienen dos cromosomas 15 de herencia biparental pero una mutación de impronta conduce a un silenciamiento de genes paternos implicados en SPW.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término “oxitocina” indica un nonapéptido de mamífero expresado en el hipotálamo. La oxitocina, liberada en la corriente sanguínea por la neurohipófisis, como hormona se conoce clásicamente por algunos papeles fisiológicos que incluyen la estimulación de las contracciones del músculo liso en el útero durante el parto y en el mioepitelio de mamífero durante la lactancia. Por tanto, la oxitocina facilita el nacimiento y el amamantamiento, respectivamente. Esta hormona también juega un papel en una diversidad de otras funciones relacionadas con la reproducción: modulación de la duración del ciclo estrogénico, luteinización folicular en el ovario y esteroidogénesis de ovario. Además de estos efectos endocrinos, la oxitocina tiene un papel como neurotransmisor en el cerebro influyendo diversos comportamientos socio-sexuales, incluyendo orgasmo, reconocimiento social, vinculación afectiva de pareja, ansiedad, confianza, amor y comportamientos maternos (véase, por ejemplo, Ring R.H. et al., 2010). El “receptor de oxitocina” pertenece a la familia de receptor acoplado a proteína G. Su actividad está mediada por las proteínas G que activan varios sistemas diferentes de mensajero secundario.

30 Tal como se usa en la presente memoria “trastorno alimentario con inicio temprano” indica un trastorno del comportamiento alimentario en el nacimiento con frecuencia denominado “síndrome del retraso del crecimiento” de algunos neonatos en el aspecto más grave. El trastorno alimentario con inicio temprano da como resultado un déficit de lactancia durante el desarrollo neonatal, una ausencia de amamantamiento e ingesta “anormal” de alimento.

35 Agonista y sus usos

Un primer objetivo de la invención se refiere a un agonista del receptor de oxitocina para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un mamífero con síndrome de Prader-Willi, similar al síndrome de Prader-Willi o NOFTT.

40 En otra realización preferida, el agonista se puede usar para el tratamiento de trastorno alimentario desde el nacimiento con déficit de lactancia.

En una realización, dicho agonista del receptor de oxitocina puede ser un agonista de peso molecular bajo, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña (natural o no).

45 El término “molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en compuestos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en tamaño hasta aproximadamente 10.000 Da, más preferiblemente hasta 5.000 Da, más preferiblemente hasta 2.000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

Generalmente dicho agonista se puede usar en combinación con un compuesto contra un trastorno alimentario con inicio temprano.

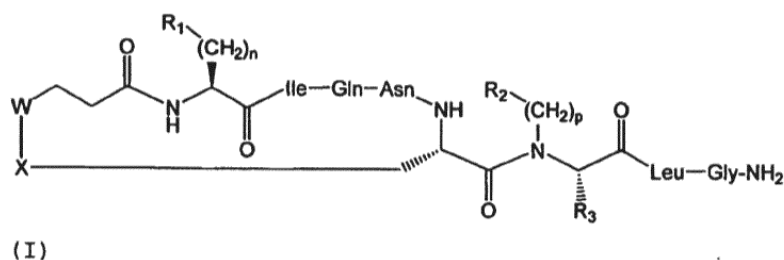
50 Los agonistas del receptor de oxitocina son bien conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Manning M. et al., 2008).

En una realización particular, el agonista para su uso según la invención puede ser la carbetocina o la demoxitocina (véase, por ejemplo, Manning M. et al., 2008).

En una realización particular, el agonista para su uso según la invención puede ser la [1-deamino-1-monocarba-2O-metiltirosina]oxitocina (véase, por ejemplo, Su LL. et al., 2007).

En una realización particular, el agonista para su uso según la invención puede ser la WAY-267464 (véase, por ejemplo, Ring et al., 2009), WAY-VNA-932 o OPC-51803 (véase, por ejemplo, Pitt et al., 2004).

- 5 En otra realización particular, el agonista para su uso según la invención puede ser un análogo de oxitocina (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente WO2009122285) de fórmula I:



en donde:

n se selecciona entre 0, 1 y 2; p se selecciona entre 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6;

- 10 R_1 se selecciona entre arilo opcionalmente sustituido con al menos un OH, F, Cl, Br, alquilo o sustituyente de O-alquilo;

R_2 se selecciona entre R_4 , H, alquilo, cicloalquilo, arilo y sistemas de anillo heteroaromático de 5 y 6 miembros;

R_3 se selecciona entre H y un enlace covalente con R_2 , cuando R_2 es R_4 , para formar una estructura de anillo;

R_4 es resto de alquilenos C_{1-6} sustituido con al menos un sustituyente O-alquilo, S-alquilo u OH;

- 15 W y X cada uno se seleccionan independientemente entre CH_2 y S, pero ambos no pueden ser CH_2 ;

alquilo se selecciona entre alquilo de cadena lineal C_{1-6} y ramificada C_{4-8} y opcionalmente tiene al menos un sustituyente hidroxilo; arilo se selecciona entre fenilo y fenilo mono- o poli-sustituido; con la condición de que cuando R_2 es H, p es 1, R_3 es H, n es 1 y W y X son ambas S, R_1 no es 4-hidroxifenilo; y solvatos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 En otra realización particular, el agonista útil para la invención puede ser un derivado de benzamida (véase, por ejemplo, la solicitud de patente US2008275026).

En una realización preferida, el agonista preferido según la solicitud de patente US2008275026 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:

- 25 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(3,3-dimetil-butyl)-piperazina-1 carboxílico;

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(2-ciclopropil-etil)-piperazina-1 carboxílico;

3-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico;

- 30 3-fluoro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico;

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(2-hidroximetil-ciclopropilmetil)-piperazina-1-carboxílico;

- 35 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(3-metil-butyl)-piperazina-1-carboxílico;

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopentilmetil-piperazina-1-carboxílico;

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclohexilmetil-piperazina-1-carboxílico;

- 3-cloro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 3-cloro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 5 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 3-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(2-ciclopropil-etil)-piperazina-1-carboxílico;
- 10 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-pentil-piperazina-1-carboxílico;
- 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-hexil-piperazina-1-carboxílico;
- 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido (R)-4-(2-metil-butil)-piperazina-1-carboxílico;
- 15 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(2-etil-butil)-piperazina-1-carboxílico;
- 2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-(2-metil-but-2-enil)-piperazina-1-carboxílico;
- 20 3-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 3-fluoro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 2-fluoro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 25 2-fluoro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 30 2-etil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 2-cloro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico;
- 2-cloro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclopropilmetil-piperazina-1-carboxílico; y
- 35 3-metoxi-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)bencilamida de ácido 4-ciclobutilmetil-piperazina-1-carboxílico.
- En otra realización particular, el agonista útil para la invención puede ser un derivado de diazicicloalcanos (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente WO03016316).
- En una realización preferida, el agonista preferido según la solicitud de patente WO03016316 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:
- 40 5-(4-(4-ciclopropilmetilpiperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;
- 5-(4-(4-bencilpiperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;
- 45 5-(4-(4-(3-hidroxibencil)piperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;
- 5-(4-(4-(3-hidroximetilbencil)piperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;

1-metil-5-(3-metil-4-(4-(4-picolil)piperazina-1-carbonilaminometil)benzoil)-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;

5-(4-(4-(2-hidroxietil)piperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;

5 1-metil-5-(3-metil-4-(4-(3-(metiltio)propil)piperazina-1-carbonilaminometil)benzoil)-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina;

5-(4-(4-(2-aminoetil)piperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]benzodiazepina; y

10 5-(4-(4-(2-hidroxietil)piperazina-1-carbonilaminometil)-3-metilbenzoil)-1-metil-4,10-dihidropirazol[4,5-c]pirido[2,3-b]diazepina.

En otra realización particular, el agonista útil para la invención puede ser un análogo de oxitocina (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente WO03000692).

En una realización preferida, el agonista preferido según la solicitud de patente WO03000692 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:

15 4-metil-1-(N-(2-metil-4-(2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzodiazepin-4-on-1-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-L-tiopropil)perhidro-1,4-diazepina;

4-metil-1-(N-(2-metil-4-(1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]-benzodiazepin-5-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-L-tiopropil)perhidro-1,4-diazepina;

20 Yoduro de 4,4-dimetil-1-(N-(2-metil-4-(1-metil-4,10-dihidropirazol[5,4-b][1,5]-benzodiazepin-5-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-L-tiopropil)perhidro-1,4-diazepina;

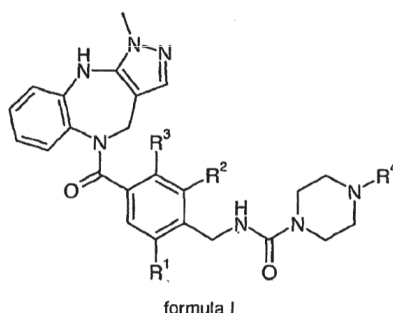
4-metil-1-(N-(2-metil-4-(5,6,7,8-tetrahidrotieno[3,2-b]azepin-4-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-L-tiopropil)perhidro-1,4-diazepina;

4-metil-1-(N-(2-metil-4-(5,6,7,8-tetrahidrotieno[3,2-b]azepin-4-ilcarbonil)benciloxi-carbonil)-L-prolil)perhidro-1,4-diazepina;

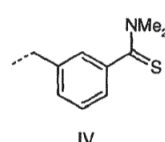
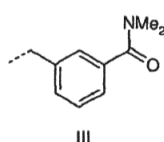
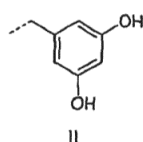
25 (4R)-N'-(2-cloro-4-(5,6,7,8-tetrahidrotieno[3,2-b]azepin-4-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-4-metoxi-L-prolina-N-metil-N-(2-picolil)amida; y

1-((4R)-N'-(2-cloro-4-(5,6,7,8-tetrahidrotieno[3,2-b]azepin-4-ilcarbonil)bencilcarbamoil)-4-metoxi-L-prolil)-4-(1-pirrolidinil)piperidina.

30 En otra realización particular, el agonista útil para la invención puede ser un derivado de piperazina (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente WO2005023812 y EP1660501) de fórmula I:



en donde: R¹, R² y R³ cada uno independientemente se selecciona entre H, alquilo, F y Cl; y R⁴ se selecciona entre las fórmulas II, III y IV:



En una realización preferida, el agonista preferido según la solicitud de patente WO03000692 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3,5-dihidroxibencil)-piperazina-1-carboxílico;

5 2,6-dimetil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3,5-dihidroxibencil)-piperazina-1-carboxílico;

3-cloro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3,5-dihidroxibencil)-piperazina-1-carboxílico;

10 2-fluoro-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3,5-dihidroxibencil)-piperazina-1-carboxílico;

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3-dimetilcarbamoil-bencil)-piperazina-1-carboxílico; y

2-metil-4-(3-metil-4,10-dihidro-3H-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azuleno-9-carbonil)-bencilamida de ácido 4-(3-dimetiltiocarbamoil-bencil)-piperazina-1-carboxílico;

15 En otra realización, el agonista del receptor de oxitocina puede ser un anticuerpo anti-receptor de oxitocina que se une al receptor de oxitocina o un fragmento anti-receptor de oxitocina del mismo que se une al receptor de oxitocina (véase, por ejemplo, Vela et al., 2010 y Serradeil-Le Gal et al., 2004 para encontrar un ensayo para discriminar entre agonista y antagonista del receptor de oxitocina).

20 Anticuerpos dirigidos frente al receptor de oxitocina se pueden obtener según los métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedante seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para aumentar la producción de anticuerpo. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales frente al receptor de oxitocina se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma descrito originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocito B humano (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (véase, por ejemplo, la Patente US N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple anti-receptor de oxitocina.

25 Los agonistas útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos del anticuerpo anti-receptor de oxitocina que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab')₂, los cuales se pueden generar por digestión por pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada al receptor de oxitocina.

35 Los anticuerpos anti-receptor de oxitocina humanizados y los fragmentos de anticuerpo de los mismos también se pueden preparar según técnicas conocidas. "Anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedor) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos de la región estructural ("framework") (FR, del inglés "Framework Region") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todo de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los cuales todas o básicamente todas las horquillas hipervariables corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas de las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, por Winter (Patente US N° 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente US N° 4.816.397).

40

45

50

A continuación, para esta invención, se seleccionan los anticuerpos activadores del receptor de oxitocina.

En aún otra realización, el agonista del receptor de oxitocina se puede seleccionar entre aptámeros. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en término de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar a través de la

55

- evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX, del inglés "Systematic Evolution of Ligands by Exponential") de una genoteca de secuencia al azar, como se describe en Tuerk, C. y Gold, L., 1990. La genoteca de secuencia al azar es obtenible por la síntesis química combinatoria de ADN. En esta genoteca, cada miembro es un oligómero lineal, finalmente químicamente modificado, de una secuencia única. Modificaciones, usos y ventajas posibles de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena, S.D., 1999. Los aptámeros de péptido consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringido mostrada por una proteína de plataforma, tal como Tioredoxina A de *E. coli* que se seleccionan entre genotecas combinadas por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996 y Serradeil-Le Gal et al., 2004 para encontrar un ensayo para discriminar entre agonista y antagonista del receptor de oxitocina).
- 5 A continuación, para esta invención, se seleccionan los aptámeros activadores del receptor de oxitocina.
- En otra realización, el agonista del receptor de oxitocina es la oxitocina o un fragmento activo de la misma.
- En una realización preferida, dicho fragmento de oxitocina comprende al menos 75 % de identidad sobre dicha oxitocina, incluso más preferiblemente al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 %.
- 15 La oxitocina de sus fragmentos se puede producir por cualquier técnica conocida por sí en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, o bien sola o en combinación.
- Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica fácilmente puede producir una parte pertinente de dicha oxitocina de sus fragmentos, mediante técnicas estándar para la producción de péptido. Por ejemplo, se pueden sintetizar usando el método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptido comercialmente disponible (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 20 Alternativamente, la oxitocina de sus fragmentos se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante ya que ahora es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos se pueden obtener como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el polipéptido deseado en los vectores de expresión y la introducción de tales vectores en los hospedantes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán la oxitocina deseada de sus fragmentos, a partir de los cuales pueden ser más tarde usando técnicas bien conocidas.
- 25 La oxitocina de sus fragmentos se puede usar en una forma (por ejemplo, purificada) o puede estar contenida en un vector, tal como una vesícula de membrana o lipídica (por ejemplo, un liposoma).
- 30 Tal modificación de los compuestos terapéuticos se puede usar para disminuir la toxicidad, incrementar el tiempo circulatorio, o modificar la biodistribución. Por ejemplo, se puede disminuir significativamente la toxicidad de los compuestos terapéuticos potencialmente importantes mediante la combinación con una diversidad de vehiculizantes portadores de fármaco que modifican la biodistribución.
- 35 Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se han mostrado diversos polímeros solubles en agua para modificar la biodistribución, mejorar el modo de absorción celular, cambiar la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modificar el índice de depuración del cuerpo. Para alcanzar o bien un efecto de liberación dirigido o sostenido, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos pendientes de la cadena de polímero.
- 40 El polietilenglicol (PEG) se ha usado ampliamente como un vehículo de fármaco, dado su alto grado de biocompatibilidad y la facilidad de modificación. La unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas ha demostrado que mejora el tiempo de permanencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y por otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita a como mucho dos agentes activos por molécula. En un planteamiento diferente, los copolímeros de PEG y los aminoácidos se exploraron como biomateriales novedosos que retendrían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendría la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando mayor carga de fármaco), y que se podría diseñar sintéticamente para convenir una diversidad de aplicaciones.
- 45 Los expertos en la técnica son conscientes de que las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de los fármacos. Por ejemplo, polímeros de reparto de fármaco que consisten en polímeros alternativos de PEG y monómeros trifuncionales tales como lisina han sido usados por VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (generalmente 2.000 daltons o menos) se enlazan a los grupos α- y ε- amino de lisina a través de enlaces de uretano estables. Tales copolímeros retienen las propiedades deseables de PEG, mientras que proporcionan grupos pendientes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena de polímero. Los grupos pendientes reactivos se pueden usar para la derivatización, entrecruzamiento, o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles en producir profármacos de larga circulación, estables variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los
- 50
- 55

- segmentos de PEG, y el enlace que se puede escindir entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo fármaco/grupo de enlace y la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos de PEG más pequeños proporcionan mayores cargas de fármaco). En general, incrementar el peso molecular total del conjugado de copolímero en bloque incrementará la semivida circulatoria del conjugado. No obstante, el conjugado debe o bien ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral limitante de la filtración glomerular (por ejemplo, menos de 45 kDa).
- Además de la cadena principal del polímero que es importante en el mantenimiento de la semivida circulatoria, y la biodistribución, se pueden usar ligantes para mantener el agente terapéutico en una forma de profármaco hasta que se libera del polímero de cadena principal por un detonante específico, generalmente actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de reparto de fármaco activado por tejido es particularmente útil donde se requiere el reparto a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de la patología. Genotecas de grupo de enlace para su uso en el reparto de fármaco activado son conocidas por los expertos en la técnica y pueden estar basadas en cinéticas enzimáticas, prevalencia de la enzima activa, y especificidad de escisión de las enzimas específicas a enfermedad seleccionadas (véase, por ejemplo, tecnologías establecidas por VectraMed, Plainsboro, N.J.). Tales ligantes se pueden usar en la modificación de la proteína o fragmento de la proteína descrita en la presente memoria para el reparto terapéutico.
- En una realización preferida, el trastorno alimentario con inicio temprano se selecciona entre el grupo que consiste en el síndrome de Prader-Willi, y en la enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT), resultante de una incapacidad de ingerir alimento, en niños sin causa orgánica conocida.
- En otra realización preferida, el trastorno alimentario con inicio temprano es uno similar al síndrome de Prader-Willi, es decir, un síndrome con un déficit de lactancia desde el nacimiento con una obesidad de inicio temprano en los primeros años de vida.
- En otra realización preferida, el trastorno alimentario con inicio temprano se selecciona entre el grupo que consiste en obesidad sindrómica, niños prematuros, niños con hiperinsulinismo orgánico, niños con problemas de lactancia con o sin un síndrome de Prader-Willi.
- En una realización preferida, el agonista útil para la invención se da a mamífero para tratar un trastorno alimentario con inicio temprano. Más particularmente el mamífero es un ser humano.
- En una realización particular, el agonista útil para la invención se puede administrar a un ser humano en cualquier fase de la vida.
- En una realización preferida, el agonista útil para la invención se da a un niño.
- En una realización particular, el agonista útil para la invención se administra a un niño y preferiblemente los tres primeros meses de vida del niño.
- Más particularmente, el agonista se puede administrar crónicamente desde la edad infantil a la edad adulta.
- En otra realización particular, el agonista se puede administrar a un adulto.
- En otra realización, el agonista del receptor de oxitocina es la oxitocina. Preferiblemente, es una oxitocina de mamífero. Más preferiblemente, es la oxitocina humana.
- En otra realización preferida, el agonista de la invención se puede usar para el tratamiento de trastorno alimentario desde el nacimiento con déficit de lactancia.
- Ácidos nucleicos, vectores, células hospedantes recombinantes y sus usos
- En la presente memoria se describe una molécula de ácidos nucleicos que codifica la oxitocina o un fragmento activo de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano.
- Una "secuencia codificadora" o una secuencia "que codifica" un productor de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína, o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína, o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificadora para una proteína puede incluir un codón de inicio (normalmente ATG) y un codón de parada.
- Estas moléculas de ácidos nucleicos se pueden obtener mediante métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, en particular por mutagénesis dirigida a sitio del gen que codifica la proteína nativa. Generalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede ser incluida en un vector adecuado, tales como un plásmido, cósmido, episomo, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

En la presente memoria se describe un vector y un casete de expresión en el cual se asocia una molécula de ácidos nucleicos con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y, opcionalmente traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácidos nucleicos. Estos vectores recombinantes pueden, por ejemplo, ser vectores de clonación, o vectores de expresión.

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehiculizante mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedante, para transformar el hospedante y la expresión promotor (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Se puede usar cualquier vector de expresión para célula animal, siempre y cuando se pueda insertar y expresar un gen codificador de un polipéptido o derivado químico. Ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4) y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovirales, retrovirales, de virus de herpes y AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante células empaquetadoras de transfección o mediante transfección transitoria con plásmidos ayudantes o 30 virus. Ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenV+, células 293, etc. Protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectivos de replicación se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para célula animal incluyen promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. et al., 1987), promotor LTR y potenciador del virus de leucemia de ratón Moloney (Kuwana, Y. et al. 1987), promotor (Mason, J.O. et al., 1995) y potenciador (Gillies, S.D. et al., 1993) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

En la presente memoria se describen sistemas de reparto de gen que comprenden una molécula de ácidos nucleicos que se puede usar en la terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transfección víricos tales como los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adeno asociado, lentivirus, los cuales convencionalmente se usan en la terapia génica. Esto también incluye sistemas de reparto génico que comprenden una molécula de ácidos nucleicos y un vehiculizante de reparto génico no vírico. Ejemplos de vehiculizantes de reparto génico vírico incluyen liposomas y polímeros tales como polietileniminas, ciclodextrinas, polímeros de histidina/lisina (HK), etc.

En la presente memoria también se describe una célula hospedante procariota o eucariota genéticamente transformada con al menos una molécula de ácidos nucleicos.

El término “transformación” significa la introducción de una secuencia de gen, ADN o ARN “extraño” (es decir, extrínseco o extracelular) a una célula hospedante, de modo que la célula hospedante expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, generalmente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. Se ha “transformado” una célula hospedante que recibe y expresa ADN o ARN introducido.

Preferiblemente, para expresar y producir las proteínas, y en particular la oxitocina, se elegirán células eucariotas, en particular células de mamífero, y más particularmente células humanas.

Generalmente, las líneas celulares tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6 o HEK293 25 se podrían usar, por su capacidad de procesar las modificaciones correctas después de traducción de los derivados.

Para la construcción de los vectores de expresión, la transformación de las células hospedantes se puede llevar a cabo usando técnicas convencionales de la biología molecular. Los derivados de la subunidad c de V-ATPasa pueden, por ejemplo, ser 30 obtenidos cultivando células genéticamente transformadas y recuperando el derivado expresado por dicha célula, a partir del cultivo. A continuación, se pueden, si es necesario, purificar por procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por precipitación fraccionada, en particular precipitación de sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

En particular, los métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes se pueden usar para producir las proteínas.

Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos el agonista descrito en la presente memoria según la invención, junto con al menos un excipiente

farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la composición farmacéutica puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico o un plásmido o un vector que contiene al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la oxitocina, junto con al menos un adyuvante y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vector se puede usar en terapia génica.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término “tratar” o “tratamiento”, indica invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección a la cual se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

Según la invención, el término “paciente” o “individuo” a tratar se destina a un ser humano o mamífero no humano (tal como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino, o un primate). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Más preferiblemente, el sujeto es un niño. Incluso más preferiblemente, el niño está en los tres primeros meses de vida.

- 10 Se entenderá que la dosificación diaria total del agonista y las composiciones será decidida por el médico que atiende dentro del alcance de dicha opinión médica. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del agonista específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración, y el índice de excreción del agonista específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro del alcance de la técnica empezar la dosis del agonista a niveles inferiores a los requeridos para alcanzar el efector terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se alcance el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar durante un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente a tratar. Un medicamento generalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra habitualmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

- 20 La cantidad terapéuticamente eficaz de producto activo que se debería administrar, así como la dosificación para el tratamiento de una afección patológica con las proteínas y/o composiciones farmacéuticas de la invención, dependerán de numerosos factores, incluyendo la edad y la condición del paciente, la gravedad de la perturbación o trastorno, el método y la frecuencia de administración y el péptido particular a usar.

- 25 La presentación de las composiciones farmacéuticas que contienen el agonista puede estar en cualquier forma que sea adecuada para la administración, por ejemplo, sólido, líquido o semisólido, tales como cremas, pomadas, geles o soluciones, y estas composiciones se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, oralmente, parenteralmente, inhalación o tópico, así incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para preparar la forma deseada de administración. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para administrar medicinas de los excipientes necesarios para obtener lo mismo se puede encontrar, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faul y Trillo, 1993, Luz n 5, S.A. Ediciones, Madrid.

- 30 En las composiciones farmacéuticas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local, pulmonaria, gota de ojos, intraocular, intranasal o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de ruta oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones orales o soluciones, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales, formas de administración intraoculares y rectales.

- 35 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehiculizantes que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato de monosodio o disodio, sodio, potasio, calcio o cloruro de magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

- 40 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil capacidad de ser inyectado por jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento y se debe conservar de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden agonista útil en la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezcladas con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Los péptidos se pueden formular en una composición en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos hidroclicóricos o fosfóricos, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilos libres también pueden ser derivadas de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede traer aproximadamente por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede traer aproximadamente mediante el uso en las composiciones de los agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes anteriormente enumerados, cuando se requieran, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehiculizante estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Tras la formulación, se administrarán soluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables anteriormente descritas, también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería ser adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido primero volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En esta conexión, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se podría disolver en 1 ml de solución de NaCl isotónica y o bien añadida a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectada al sitio propuesto de infusión. Alguna variación en la dosificación necesariamente se dará dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

La proteína puede estar formulada como una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además del agonista útil en la invención formulado para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables, incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación de tiempo; y cualquier otra forma actualmente usada.

Tal como previamente se ha mencionado, los péptidos podrían formar parte de una terapia combinada con propósito de parar más eficazmente un trastorno alimentario con inicio temprano. En este caso, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos un péptido; junto con otro u otros compuestos contra un trastorno alimentario con inicio temprano.

En la presente memoria se describe un agonista del receptor de oxitocina para el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un paciente que incluye, pero no se limita a, síndrome de Prader-Willi, y en la enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT), resultante de la incapacidad de ingerir alimento, en niños sin causa orgánica conocida.

Además, el agonista del receptor de oxitocina se puede usar para el tratamiento de los problemas de comportamiento en relación con funciones sociales afectadas observadas durante la niñez y en pacientes adultos con síndrome de Prader-Willi o similar al síndrome de Prader-Willi.

La invención se ilustrará más por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, de ninguna manera estos ejemplos y figuras deberían interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: Interrupción dirigida del gen *Magel2*

(A) Mapeo del tipo silvestre de *Magel2*, la construcción de dianización ("targeting construct") y de los alelos mutantes resultantes, indicando el reemplazamiento de la región de 3.397 kb que incluye la región promotora de *Magel2* y parte del gen *Magel2* por un casete LoxP-Pgk1-hidromicina-LoxP (higro) colocado en la orientación transcripcional opuesta y que introduce nuevos sitios EcoRV. El recuadro negro representa el gen *Magel2* comprendido por un exón sencillo, el recuadro en blanco y los dos círculos en blanco representan el gen de resistencia a higromicina bajo el control del promotor Pgk1, rodeado por las dos secuencias LoxP (LoxP-higro-LoxP). El gen de resistencia a higromicina se separó secundariamente mediante la expresión de la recombinasa Cre en clones de células ES, generando el alelo escindido nulo de *Magel2*. La sonda usada para identificar la recombinación homóloga en células ES por análisis de transferencia tipo Southern está indicada como sonda 1.

(B) Análisis de transferencia tipo Southern del ADN genómico digerido por EcoRV derivado de clones de célula ES resistentes a higromicina, permitiendo la detección de alelos de *Magel2* tanto mutado (4,5 kb) como de tipo silvestre (12,8 kb).

(C) Análisis PCR de clones de célula ES sometidos a electroporación con una vector de expresión de recombinasa Cre. La delección del gen de resistencia a higromicina detectado por la amplificación de un producto de 376 pb se muestra en el panel superior (los cebadores usados para la PCR están representados por dos flechas alrededor del casete de higromicina). Se debería indicar que el alelo de tipo silvestre no se puede detectar ya que el fragmento amplificado es demasiado largo. En el panel inferior se muestra una PCR control que amplifica un fragmento genómico de *Necdin*.

(D) Hibridación *in situ* de *Necdin* y *Magel2* en secciones seriales transversales a través de la región del diencefalo de embriones de ratón E12.5 WT y *Magel2* KO. III, tercer ventrículo; hp, región del hipotálamo; lv, ventrículo lateral; me protuberancia media; vt, tálamo ventral; zi, zona intratálamica. Barra de escala: 185 µm.

Figura 2: disfunción en el proceso de maduración con OT pero no AVP en el NPV de *Magel2* KO

En secciones de vibratomo hipotalámicas (100 µm) que recubren el NPV entero de recién nacidos *Magel2* KO (n=7) y tipo silvestre (n=5), realizamos una inmunomarcación conjunta usando anticuerpos PS-38 y VA-10 para revelar respectivamente los intermediarios de la prohormona de OT y el péptido de OT (a). Se hizo un experimento similar usando anticuerpos PS-41 y VA-4 para revelar respectivamente los intermediarios de la prohormona de AVP y el péptido de AVP en NPV de recién nacidos *Magel2* KO (n=6) y tipo silvestre (n=6) (b).

En NPV de *Magel2* KO, en comparación con NPV de tipo silvestre, observamos una acumulación de formas de OT intermedias (b) pero no formas de AVP intermedias (b).

Figura 3: Anatomía visceral normal de neonatos P1 de *Magel2* KO

Para determinar si la anatomía interna era normal, se diseccionaron los recién nacidos en P1, las secciones del cuerpo se tiñeron con hematoxilina y eosina y se visualizaron por microscopio óptico. La tinción con hematoxilina y eosina en las secciones sagitales de los neonatos de tipo silvestre (WT, del Inglés "Wild Type") y *Magel2* KO P1. a: pulmón, b: hígado (LV) y estómago (ST); c: riñón (KD) y glándula adrenal (AG). Se observó la anatomía normal del pulmón, el hígado, el riñón, las glándulas adrenales y el corazón.

Figura 4: Anatomía del cerebro de neonatos mutantes *Magel2*

(a) Tinción con azul de Nissl sobre las secciones de cerebro coronales de neonatos de tipo silvestre (WT) y *Magel2* KO P0 que muestran una morfología similar en los neonatos de tipo silvestre y mutantes. Barra de escala: 2 mm.

(b) Tinción con hematoxilina y eoxina sobre secciones coronales de neonatos de tipo silvestre (WT) y *Magel2* KO P0 al nivel de la glándula pituitaria. Su estructura y su tamaño son idénticos. "a", "i" y "p": lóbulos anterior, intermedio y posterior de la glándula pituitaria. Barra de escala: 100 µm.

(c) Inmunomarcación con *Necdin* sobre secciones de cerebro coronales de embriones de tipo silvestre (WT) y *Magel2* KO P0, a tres niveles diferentes del hipotálamo. La inmunomarcación con *Necdin* es similar en ambos

genotipos sugiriendo que la falta de Magel2 no modifica la colocación de los núcleos hipotalámicos. Barra de escala: 300 µm.

Figura 5: Porcentaje de pacientes en el grupo placebo en el grupo OT que fallaron (barra blanca) o pasaron (barra gris) la prueba de Sally y Ann

5 Tabla 1: ensayo de lactancia

Genotipo de recién nacidos	Actividad de lactancia			TOTAL
	Ausente	Débil	Fuerte	
*WT	0	7	6	13
*KO	6	2	1	9
°WT	1	2	27	30
°KO	6	10	6	22

10 La actividad de lactancia se considera como: a) ausente si no hay acoplamiento al pezón (puntuación 0), b) débil si la latencia para el acoplamiento es más de 3 min y la propia actividad de lactancia es nula o débil y no se mantiene (puntuación 1), o c) fuerte si la latencia de acoplamiento es menos de 3 min y la propia actividad de lactancia es fuerte (puntuación 2).

*Las crías ensayadas provienen de tres camadas, aproximadamente de 2 a 3 horas de edad. Las crías no tenían leche en su estómago antes del ensayo. No hay diferencia significativa en la actividad de los mutantes y los controles (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, $P < 0,005$).

15 °Las crías ensayadas provienen de siete camadas, de entre 4 y 8 horas de edad. La mayoría de los ratones de tipo silvestre tenían leche en su estómago, pero el mutante tenía el estómago vacío. Hay diferencia significativa en la actividad de los mutantes y los controles (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, $P < 0,5 \times 10^{-4}$).

Tabla 2: Contenidos neuropeptídicos en hipotálamo y glándula pituitaria de recién nacidos de mutante Magel2 y tipo silvestre

	Hipotálamo P0 (ng/hipotálamo)			Glándula pituitaria P0 (ng/pituitaria)		
	WT (n=14) M (C1, C3)	KO (n=14) M (C1, C3)	Valor P	WT (n=11) M (C1, C3)	KO (n=11) M (C1, C3)	Valor P
OT	4,2 (3,5, 5,7)	2,7 (2,2, 3,1)	$P < 0,005$	2,1 (1,9, 2,2)	2,0 (1,8, 2,4)	N.S.
AVP	8,4 (8,0, 9,2)	6,8 (6,4, 7,2)	$P < 0,001$	6,4 (5,8, 7,0)	7,2 (6,4, 9,2)	N.S.
OX A	10,1 (9,6, 11,2)	7,9 (7,5, 9,2)	$P < 0,001$	N.D.	N.D.	
ACTH	8,6 (8,5, 9,0)	9,1 (8,0, 9,4)	N.S.	9,5 (8,8, 12,2)	8,7 (8,4, 9,6)	N.S.
AGRP	4,8 (3,6, 6)	5,5 (4,4, 7,2)	$P < 0,05$	N.D.	N.D.	
α-MSH	5 (3,7, 6,1)	5,6 (5,0, 6,5)	N.S.	N.D.	N.D.	

20 Los resultados de los ensayos ELISA para comparar, entre recién nacidos mutantes y de tipo silvestre (a P0), la cantidad de varios neuropeptidos producidos en hipotálamo o glándula pituitaria. Los valores están indicados como Media (Cuartil1, Cuartil3) <.

Ejemplo

Ejemplo 1: Modelo en ratón

25 Declaración ética

Todos las crías y experimentos se llevan a cabo conforme a las directrices europeas para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Directiva 86/609/CE del consejo).

Generación de la línea de ratón *Magel2* KO

Se amplificaron por PCR dos fragmentos que contenían secuencias genómicas 5' y 3' a la región de *Magel2* para someter a delección desde el ADN 129/SvPas y se verificaron más por secuenciación. Los fragmentos de 2,651 kb *Xho*I y 3,062 kb *Not*I, localizados respectivamente 372 y 3.062 pb 5' y 3' al sitio de inicio de transcripción del ARNm NT_039428.7 *Magel2* (gen sin intrón), se insertaron en cada lado del casete *LoxP*-*pgk1*-higromicina-*LoxP* subclonado en un vector pBluescript II-SK (Stratagene). ES (trasfondo genético de 129Sv) se sometieron a electroporación y 240 células ES resistentes a higromicina se investigaron para casos de recombinación homóloga y de monoinserción por análisis de transferencia tipo Southern. Los clones seleccionados se sometieron a electroporación con un vector de expresión de recombinasa Cre. Siete clones de células ES que llevaban un alelo en el que se delecionó el gen de resistencia a higromicina se seleccionaron por PCR, generando un producto de PCR de 376 pb. Se inyectaron dos clones en blastocistos C57BL/6J. Los animales quiméricos obtenidos de uno de estos dos clones permitieron la transmisión del alelo de *Magel2* mutante detectado por PCR en crías agouti, usando los mismos cebadores que los usados para detectar la delección del gen de resistencia a higromicina. La genotipificación de ratones se realizó por PCR sobre ADN genómico preparado de biopsias de cola y placenta, usando los mismos cebadores. La colonia de *Magel2* KO se mantuvo en la instalación animal INMED (Marsella).

Comportamiento de lactancia de los neonatos

Este ensayo se realizó como previamente se ha descrito (Dragatsis, I., et al., 2004). En resumen, 2 a 6 horas después de parir sus recién nacidos, las hembras se anestesiaron con Rompun Xilasina al 0,1 %/ 10 mg/ml de Ketamina Imalgene (0,1 ml/10 g de tejido) y se tumbaron sobre su espalda, sobre una plataforma quirúrgica calentada (37 °C). En los recién nacidos se ensayó individualmente su capacidad de encontrar y agarrarse a uno de los pezones de su madre y succionar leche eficazmente. Las puntuaciones están descritas en la Tabla 1.

Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica

Tejidos de todos los embriones (E12.5) o cerebros P0 se diseccionaron, fijaron y trataron como previamente se ha descrito (Andrieu, D., et al., 2003; Muscatelli, F., et al., 2000). Se recogieron 14 µm de secciones congeladas sagitales o coroneales. Para los análisis de hibridación *in situ* (ISH, del Inglés "In Situ Hybridization") de *Magel2*, las secciones se trataron e hibridaron con una ribosonda marcada con digoxigenina antisentido de *Magel2* (nucleótidos 3.366-4.053; XM_622091), a 70 °C en formamida al 50 %, como se ha descrito previamente (Andrieu, D., et al., 2003). Para el análisis ISH doble de *Magel2* y *Necdin*, las secciones se hibridaron con ribosondas marcadas con fluoresceína de *Necdin* y digoxigenina antisentido de *Magel2* (nucleótidos 2.130-2.420; D76440) (Andrieu, D., et al., 2006). La inmunohistoquímica (IHC, del Inglés "immunohistochemistry") sobre las criosecciones se realizaron como previamente se ha descrito (Andrieu, D., et al., 2006). Se usó un anti-*Necdin* de conejo policlonal (N°07-565, Upstate; 1/500) y se detectó la inmunomarcación con el anti-Alexa Fluor 488 de conejo de cabra (Molecular Probes, Invitrogen; 1/500) como anticuerpo secundario. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital AxioCam MRm (Zeiss) en un microscopio de imagen Axioplan2 (Zeiss) con un módulo de Apotome (Zeiss), usando el programa informático AxioVision 4.4.1.0 (Zeiss). Las imágenes se juntaron con el programa informático Adobe Photoshop CS2.

Recuento de neuronas de oxitocina, vasopresina y prepro-orexina en cerebros P0

Para el recuento de neuronas de oxitocina y vasopresina, los cerebros P0 (2 a 3 horas después del nacimiento) se diseccionaron, se fijaron en medio AntigenFix (Diapath, Ref P0014) durante la noche y se incluyeron en agar al 4 %. Se recogieron 100 µm de las secciones coroneales del vibratomo de la comisura anterior a la extremidad posterior del hipotálamo. Para oxitocina, inicialmente se usó un anti-oxitocina (OT) policlonal, que específicamente reconoce las formas no identificadas de OT (un regalo de G. Tramü, Muscatelli, F., et al., 2000). A continuación, realizamos la inmunomarcación conjunta usando un anticuerpo monoclonal de ratón altamente específico frente a la neurofina de ratón asociada a OT (PS38) y un anticuerpo policlonal que reconoce las formas intermedias de OT (VA10) (Ben-Barak, Y., et al., 1985; Alstein, M., et al., 1987). Para la vasopresina, realizamos la inmunomarcación conjunta usando un anticuerpo monoclonal de ratón altamente específico frente a la neurofina de ratón asociada a AVP (PS41) y un anticuerpo policlonal que reconoce las formas intermedias de AVP (VA4) (Ben-Barak, Y., et al., 1985; Alstein, M., et al., 1987). PS38, PS41, VA10 y VA4 son un regalo del Pr. H. Gainer.

Para el recuento de las neuronas de prepro-orexina, los cerebros P0 se trataron como se describió en la inmunohistoquímica. Se hicieron secciones coroneales de 14 µm con un criostato y montaron descongelados sobre conjuntos de 5 portaobjetos, conteniendo cada portaobjeto series rostro-caudales de secciones tomadas a intervalos de 70 µm. Las secciones se recogieron en la misma región que anteriormente, lo que representó una media de 24 secciones. El conjunto individual de portaobjetos para cada cerebro P0 se tiñó con anti-prepro-orexina de conejo policlonal (N°AB3096, Chemicon; 1/250). La inmunomarcación se detectó con los siguientes anticuerpos secundarios: anti-Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555 de conejo de cabra (Molecular Probes, Invitrogen; 1/500), anti-Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555 de ratón de cabra (Molecular Probes, Invitrogen; 1/500). Los portaobjetos se montaron en medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Inc).

Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal (Zeiss, LSM510), la pila z de 6 µm se realizó para cada imagen. Las cuantificaciones se realizaron con el programa informático de análisis de imagen eCELLence

(Glance Vision Technologies Srl). Todas las neuronas positivas se contaron en cada sección para contar todas las neuronas positivas en el NPV entero (OT y AVP) o en el hipotálamo lateral (prepro-orexina).

Análisis de inmunoensayo ligado a enzimas

- 5 Los análisis de inmunoensayo ligado a enzimas se realizaron para cuantificar los niveles de neuropéptidos en el hipotálamo y la hipófisis P0. El hipotálamo y la hipófisis P0 se diseccionaron de 10:00 a 12:00 am (parto que se da temprano en la mañana), antes de que se dé la muerte postnatal que afecta una proporción de neonatos Magel2-KO (la mayoría desde 12:00 horas después del nacimiento a P1). Los tejidos se sometieron a sonicación en un coctel inhibidor de proteasa (Complete Mini, Roche), se incubaron a 95 °C durante 10 min para inactivar completamente las proteasas y se mantuvieron en hielo. Las concentraciones de proteína se determinaron en una alícuota de cada muestra. Los neuropéptidos se extrajeron por adición de HCl y ácido acético a una concentración final de 0,02 M y 0,1 M respectivamente. Las muestras se centrifugaron a 5.500 rpm durante 20 min y los sobrenadantes se dividieron en alícuotas antes de ser almacenados a -80 °C. Las concentraciones de neuropéptidos se determinaron por inmunoensayos ligados a enzima (EIAs, del Inglés "Enzyme-linked Immunoassays") usando kits de EIA con Orexina A, Vasopresina[Arg8], Oxitocina, proteína relacionada con Agouti (AGRP, del Inglés "Agouti-related protein"), Hormona Estimuladora de alfa-Melanocito (alfa-MSH, del Inglés "alpha-Melanocyte Stimulating Hormone"), hormona adrenocorticotropina ACTH y corticosterona (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras, por series en las que las concentraciones eran para comparar, se extrajeron y valoraron en el mismo experimento.

Inyección de Oxitocina y Vasopresina

- 20 Tres a cinco horas después del parto, crías de tipo silvestre o crías provenientes de un cruce entre un heterocigoto (+/-) macho con hembras de tipo silvestre se separaron temporalmente (10 min) de su madre, se pesaron y se les dio una inyección subcutánea simple (en la región ventral al nivel de las costillas flotantes) (20 µl) de solución salina isotónica o 2 µg de oxitocina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., N° de catálogo 051-01) disuelta en solución salina isotónica (20 µl). Esta dosis de OT se usó porque hay una bibliografía que indica que durante el periodo neonatal estas no son tóxicas, pero pueden afectar una diversidad de respuestas fisiológicas en ratas macho y hembra y ratones de campo, así como activación neuronal en neonatos 28-29. Siguiendo el mismo protocolo, se inyectaron vasopresina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., N° Catálogo 065-07) a diferentes dosis. A P2, las crías se escarificaron para realizar el genotipo.

Inyección de SSR126768 (antagonista del receptor de oxitocina)

- 30 Una primera cohorte de recién nacidos de tipo silvestre C57B16 se separaron de sus madres 1 a 1h30 después de su nacimiento y muy rápidamente se les dio una inyección subcutánea simple (20 µl) del vehiculizante control (etanol al 0,2 % en agua destilada) o 3 µg (en 20 µl de etanol al 0,2 % en agua destilada) de SSR126768A (OTA). Una primera cohorte de recién nacidos de tipo silvestre C57B16 se inyectaron 12 a 24 horas después del nacimiento. La dosis de OTA usada se basó en publicaciones anteriores (Serradeil-Le Gal, C., et al., 2004).
- 35 Elegimos usar el antagonista de oxitocina SSR126768A (un regalo de C. Serradeil-Le Gal, Sanofi-Synthélabo Recherche, Toulouse, Francia) porque ya estaba bien caracterizado. Mostró tener una afinidad alta para OTR en diferentes especies, incluyendo ratón, y una alta selectividad. Se ha usado a 1, 3 o 10 µg/g en ratas (Serradeil-Le Gal, C., et al., 2004) sin inducir letalidad o cualquier efecto secundario fuerte. Además, al menos en el útero, SSR126768A mostró un inicio rápido de la acción y un largo efecto de duración (24 horas después de la administración con una dosis tan baja como 3 µg/g) (Serradeil-Le Gal, C., et al., 2004).

Análisis estadístico

- 45 Tomando en cuenta el tamaño de la muestra y la normalidad o ausencia de normalidad de la distribución de los diferentes valores, usamos herramientas estadísticas apropiadas. Se usaron herramientas estadísticas no paramétricas (programa informático Sigmastat) o herramientas estadísticas exactas (programa informático StatXact) cuando fue necesario. Todos los ensayos son pruebas de dos colas. En los resultados, los valores están indicados como sigue: (C2 (C1, C3), n, valor P) donde C2 es la media, C1 es el primer cuartil y C3 es el segundo cuartil. El nivel de significancia se fijó a un valor P menor de 0,05).

Resultados

Muerte neonatal de ratones deficientes en Magel2

- 50 Para elucidar el papel fisiológico de Magel2, usamos la dianización genética ("gene targeting") para generar ratones Magel2 nulos (Fig. 1). Puesto que Magel2 es un gen impreso con solamente una expresión paterna, los ratones con un alelo Magel2 paternalmente delecionado (m+/p-) son más adelante referidos como ratones Magel2 KO puesto que son funcionalmente equivalentes a ratones Magel2 nulos. Estos ratones Magel2 KO se compararon con ratones tipo silvestre de la misma camada. Usando hibridación *in situ*, se comprobó que los transcritos de Magel2 no se detectaban en embriones Magel2 KO (Fig. 1d).

Dependiendo del trasfondo genético, los ratones Magel2 KO estaban significativamente bajo representado en el tiempo de destete, revelando una falta del 51,4 % de ratones Magel2 KO después de 5 a 7 retrocruzamientos en trasfondos genéticos C57B16/J. En los mutantes supervivientes, machos y hembras se representaron igualmente.

- 5 Durante la embriogénesis (de E10.5 a E18.5) y en neonatos tempranos (2 a 4 horas de edad), observamos 50 % de ratones deficientes en Magel2, tal como se esperaba. Sin embargo, la genotipificación de camadas a P1, revelaron que de hecho el 58 % de los mutantes Magel2 KO frente al 99 % del tipo silvestre estaban vivos mientras que el 42 % de los mutantes Magel2 KO frente al 1 % del tipo silvestre (WT: n=1, KO: n=32; prueba χ^2 , $P<0,001$) estaban muertos durante el primer día después del nacimiento.

Deficiencia alimentaria en crías de mutantes Magel2: la causa de la muerte neonatal

- 10 Los mutantes Magel2 recién nacidos mostraron proporciones normales de tamaño de cabeza y cuerpo, además de piel de color rosado normal, indicando apropiadas funciones circulatorias y respiratorias. Aparentemente, los corazones de los neonatos mutantes latían normalmente. Todos los órganos estaban presentes en los neonatos KO y eran similares en el inicio a los compañeros de camada de tipo silvestre como se confirma por un análisis histológico (Fig. 3).
- 15 Sin embargo, en una población de 26 camadas (104 WT, 104 KO) analizada 3 a 8 horas después del nacimiento, el 56 % (58/104) de los recién nacidos de Magel2 KO no tenían leche en sus estómagos en comparación con el 16 % (17/104) de los controles ($\chi^2=116$, $P<0,0005$). A continuación, aproximadamente 12 horas después del nacimiento, medimos el nivel de glicemia de los recién nacidos supervivientes de Magel2 KO (25 % estaban muertos) para tener un valor cuantitativo del metabolismo energético. Observamos un 30 % de hipoglicemia en mutante en comparación con los neonatos de tipo silvestre (WT: 55 mg/dl (46, 65), n=42; KO: 39 mg/dl (28, 52,5), n=35; prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, $P<0,001$). Estos datos revelaron un problema de alimentación en recién nacidos Magel2 KO. De hecho, observamos que en 10 camadas, el 58 % (19/39) de los individuos Magel2 KO murieron entre P0 y P1 frente al 5 % (2/39) de ratones de tipo silvestre y, el análisis post mortem reveló que ninguno de ellos tenía leche en su estómago.
- 20
- 25 Paralelamente, seguimos el crecimiento de los mutantes supervivientes en comparación con los recién nacidos de tipo silvestre. Primero, entre P0 y P3, observamos una reducción significativa del 43 % en la ganancia de peso de individuos Magel2 KO en comparación con los de tipo silvestre (4 camadas, WT: 0,52 g (0,27, 0,73), n=16; KO: 0,22 g (0,18, 0,31), n=13; prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney con estrato=camada, $P<0,005$), pero esta diferencia en la ganancia de peso desapareció entre P3 y P4 (WT: 0,33 g (0,34, 0,35), n=16; KO: 0,34 g (0,34, 0,39), n=13, N.S.).
- 30 Tomados en conjunto, estos datos sugieren que en ausencia de Magel2, la iniciación del proceso de alimentación después del nacimiento se altera, conduciendo a una muerte prematura del 50 % de los mutantes.

Comportamiento alimentario en crías de Magel2 KO: el inicio de la actividad de lactancia es interrumpida

- 35 Como recién nacido, una etapa crucial para sobrevivir es encontrar comida. De hecho, los neonatos de ratón tienen que encontrar los pezones de su madre para mamar por ellos mismo. Esta etapa implica: un estado despierto, un sistema olfatorio o táctil funcional para localizar los pezones de su madre, un reflejo de búsqueda, un reflejo de amamantamiento rítmico y tragar (Hongo, T., et al., 2000). Por tanto, están implicados varios sistemas sensoriales y motores que implican estructuras diferentes del cerebro y los músculos (Delaney, A.L. & Arvedson, J.C., 2008).

- 40 Poco después del nacimiento, las crías de Magel2 KO no parecen hipotónicas y reaccionan con movimientos similares a los observados en los controles, particularmente cuando se colocan sobre su espalda. Durante el primer día postnatal, las crías control y mutantes presentaron un reflejo de búsqueda similar. Además, los recién nacidos de Magel2 KO podían abrir y cerrar su boca de manera normal. Todas estas observaciones están de acuerdo con una actividad motora normal necesaria para mamar en mutantes Magel2.

- 45 A continuación, realizamos un ensayo de lactancia, registrando el acoplamiento del recién nacido al pezón de su madre (Dragatsis, I., et al., 2004). Observamos una diferencia significativa en la actividad de lactancia (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, $P<0,005$) entre los recién nacidos de tipo silvestre y Magel2 KO provenientes de 10 camadas (Tabla 1): 39 % (12 de 31) de mutante Magel2 frente a 2 % (1/43) de los animales tipo silvestre no tenían actividad de lactancia, 39 % (12/31) de mutante Magel2 frente a 21 % (9/43) de animales de tipo silvestre tenían una actividad de lactancia débil y solamente el 22 % (7/31) de mutante Magel2 frente al 77 % (33/43) de animales de tipo silvestre tienen una fuerte actividad. Juntos, estos datos sugirieron que en el nacimiento los ratones Magel2 KO tenían defectos en el proceso que inicia la estimulación de la lactancia conduciendo al 50 % de estos recién nacidos a una alimentación afectada y la muerte. El 50 % de estos neonatos mutantes eran capaces, aparentemente con algunas dificultades, de iniciar el proceso de mamar y sobrevivir.
- 50

Función neuroendocrina durante el periodo postnatal temprano en Magel2 KO

- 55 La ausencia de modificaciones estructurales obvias en la anatomía del cerebro y en el hipotálamo de recién nacidos mutantes (Fig. 4) no excluye una alteración funcional de esta estructura. La producción de neuropéptidos y

hormonas debería ser modificada, en particular aquellos que se sabe que juegan un importante papel en el nacimiento.

Se piensa que los glucocorticoides circulantes juegan un importante papel en la adaptación del neonato a la vida extra uterina (Legase, J., et al., 1996; Girard, J. et al., 1992), en particular en la activación del hígado o enzimas gastrointestinales para regular la homeostasis de energía (Boksa, P., 1997). Justo después del nacimiento, previamente se ha descrito una brusca subida independiente al sexo en la hormona Adrenocorticotropina (ACTH, del Inglés "Adrenocorticotropin Hormone") en plasma (10 minutos después del nacimiento), seguido de un incremento en los niveles de corticosterona en plasma y adrenales (una hora después del nacimiento) (Lesage, J., et al., 1996). A continuación, usamos las pruebas de inmunoensayo enzimático (EIA) y se comparó el nivel de ACTH en plasma, en recién nacidos de sección de cesárea (E18.5), 10 min después del nacimiento, y el nivel de corticosterona en plasma, 60 min después del nacimiento, entre ratones Magel2 KO y tipo silvestre. No observamos ninguna diferencia significativa en el nivel en plasma de ACTH (WT: 5,4 ng/ml (4,6, 5,8), n=9; 5,9 ng/ml (5,4, 6,1), n=11, prueba de Wilcoxon Mann-Whitney, N.S.). Similarmente, el nivel en plasma de corticosterona, una hora después del nacimiento, no se diferenció significativamente entre ambos genotipos (WT: 750 ng/ml (650, 1.050), n=10; KO: 575 ng/ml (425, 750), n=10; prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, N.S.).

También se piensa que diversos neuropéptidos hipotalámicos juegan un papel importante, durante el periodo postnatal temprano tal como la Oxitocina (OT) (Carter, C.S., 2003), Arginina-Vasopresina (AVP) (Zelena, D., et al., 2008; Raymond-Marron, I., et al., 2006; Liu, X., et al., 2003), y la Orexina-A (OXA) (Dickinson, H., et al., 2008). Usando un planteamiento de EIA, se midió la cantidad de estos neuropéptidos maduros producidos en el hipotálamo y en la hipófisis de los neonatos de mutante Magel2 y sus compañeros de camada de tipo silvestre. En el hipotálamo, se observó un promedio de 36 % de reducción en la producción de OT, una reducción del 20 % de AVP y una reducción del 22 % de OXA (Tabla 2). Los niveles de ACTH, y hormona estimuladora de alfa-melanocito (α -MSH) que son dos productos derivados de la proopiomelanocortina son similares en recién nacidos mutantes y de tipo silvestre (Tabla 2). En la glándula pituitaria, la cantidad de OT, AVP y ACTH era similar entre ambos genotipos (Tabla 2). En conclusión, la deficiencia en la expresión de Magel2 conduce a una disfunción de producción hipotalámica de al menos varios neuropéptidos amidados maduros (OT, AVP, OXA), siendo la producción de OT la más afectada.

Análisis inmunohistoquímico de neuronas hipotalámicas productoras de OT, AVP y OXA

A continuación, observamos la distribución de las neuronas hipotalámicas que expresan estos péptidos mediante inmunohistoquímica (IHC). Inicialmente, usando un anticuerpo anti-OT que es capaz de reconocer las formas no caracterizadas de OT, visualizamos a P0 (3 a 5 horas después del nacimiento) una inmunomarcación de OT incrementada, en el NPV de animales mutantes en comparación con de tipo silvestre (3 ratones por grupo). Puesto que revelamos un descenso del 36 % en la forma madura de OT en hipotálamo de Magel2 KO mediante EIA, la inmunomarcación incrementada podría ser debida a una acumulación de una forma no completamente procesada de OT. Para discriminar qué forma se podría acumular, a continuación, usamos un par de anticuerpos que nos permiten tefir específicamente para 1) neurofisina asociada a OT (PS-38) detectando la respectiva prohormona de OT y 2) para los intermediarios peptídicos de OT (VA-10) (Ben-Barak, Y., et al., 1985; Whitnall, M.H., et al., 1985; Alstein, M., et al., 1987). Usando la inmunomarcación conjunta (Fig. 2a) seguido de análisis por microscopio confocal, cuantificamos el número de células positivas para cada anticuerpo en el NPV de recién nacidos (3 a 5 horas después del nacimiento). El número de células positivas PS-38 era similar entre los animales mutantes y de tipo silvestre (WT: 237 (226, 298), n=5; KO: 300 (279, 303), n=7; N.S.). Pero, en las mismas secciones, el número de células positivas VA-10 era significativamente mayor en el NPV de Magel2 KO en comparación con NPV de tipo silvestre (WT: 259 (239, 309), n=5; KO: 442 (387, 469), n=7; Wilcoxon-Mann-Whitney $P < 0,005$). Puesto que el anticuerpo VA-10 reconoce específicamente las formas de OT intermedias (fundamentalmente OT-G), concluimos un incremento de 1,7 veces en la acumulación de formas de OT intermedias en el NPV de Magel2 KO en comparación con el NPV de tipo silvestre.

De manera similar a este estudio, realizamos una inmunomarcación conjunta sobre las secciones de NPV usando anticuerpos específicamente enfrentados a la neurofisina asociada a AVP (PS-41) y los intermediarios peptídicos de AVP (VA4) (Ben-Barak, Y., et al., 1985; Whitnall, M.H., et al., 1985; Alstein, M., et al., 1987). Un análisis confocal (Fig. 2b) y cuantificación de neuronas positivas PS-41 (KO: 375 (304, 386), n=6; WT: 362 (314, 387), n=6; N.S.) y VA4 (KO: 379 (360, 391), n=6; WT: 407 (390, 417), n=6; N.S.) en NPV mutante y de tipo silvestre no reveló diferencia significativa entre ambos genotipos. Por tanto, en NPV de Magel2 KO, no observamos una acumulación de formas de AVP intermedias como observamos para OT.

Por último, también usamos un anticuerpo que reconoce específicamente la prepro-orexina, la forma de OXA no procesada inicial. Observamos una inmunomarcación similar y contamos el mismo número de neuronas de expresión de prepro-orexina en el hipotálamo lateral de animales mutantes (258 (253, 269), n=5) y de tipo silvestre (264 (235, 266), n=5) analizados a P0 (datos no mostrados).

En conclusión, estos resultados sugieren que la cantidad reducida de OT amidada detectada en hipotálamos de Magel2 KO en neonatos podría ser la consecuencia de una disfunción en la transformación de formas intermedias

de OT a OT amidada, conduciendo a una acumulación de estas formas intermedias. Este defecto no se observa para AVP.

La inyección de un antagonista del receptor de oxitocina impide la alimentación en neonatos de tipo silvestre e induce la letalidad postnatal

- 5 Tomando en cuenta todos los datos previos, teníamos la hipótesis de que la deficiencia de OT podría ser responsable del fenotipo de Magel2 KO en el nacimiento. Por consiguiente, decidimos inyectar el compuesto SSR 126768A, un antagonista específico de OT (OTA, del Inglés "OT antagonist") con alta afinidad con el receptor OT (Serradeil-Le Gal, C., et al., 2004). Procedimos a una inyección simple de 3 µg (20 µl) en 68 recién nacidos C57B16/J de tipo silvestre (9 camadas), 1 a 1,5 horas después del nacimiento. Paralelamente, en las mismas
- 10 condiciones, inyectamos el vehiculizante (20 µl) en 48 recién nacidos C57B16/J de tipo silvestre (7 camadas). A continuación, 12 (+/- 3) horas después del tiempo de inyección, observamos que el 54 % (37/68) de los recién nacidos inyectados con OTA no tenían leche en su estómago frente al 4 % (2/48) de recién nacidos inyectados con vehiculizante. A P1 (24 a 36 h de edad), observamos que el 48 % (33/68) de los recién nacidos inyectados con OTA se murieron frente al 4 % (2/48) de los recién nacidos inyectados con control vehiculizante. Concluimos que el OTA
- 15 SSR 126768A tenía un efecto significativo en los recién nacidos C57B16/J de tipo silvestre, impidiendo que la mitad de ellos se alimentasen correctamente y conduciendo a la letalidad a P1. Sin embargo, cuando inyectamos el OTA SSR 126768A (3 µg en 20 µl) en 42 crías de tipo silvestre, 12 a 24 horas después del nacimiento, todos ellos sobrevivieron 48 horas después y parecían saludables. Por tanto, el OTA SSR 126768A a una dosis de 3 µg parecía tener un efecto específico, impidiendo el proceso de alimentación y conduciendo a la muerte, solamente cuando se
- 20 inyectaba en una ventana específica de tiempo después del nacimiento, después de que se iniciara la actividad de lactancia. Este fenotipo simula el fenotipo de alimentación Magel2 KO en el nacimiento.

El fenotipo de déficit de iniciación de lactancia y la letalidad resultante de una falta de Magel2 se puede rescatar por inyección de oxitocina

- 25 Los resultados obtenidos con la inyección de OTA SSR 126768A nos deja pensar que podríamos restaurar un comportamiento alimentario normal en recién nacidos Magel2 KO con una inyección de OT justo después del nacimiento. La manipulación neonatal temprana de OT está informada en la bibliografía sin alteraciones del desarrollo postnatal (Cushing, B.S., et al., 2003; Yamamoto, Y., et al., 2004; Saito, O., et al., 2007). Inicialmente, 28 recién nacidos de tipo silvestre se inyectaron con una solución salina isotónica (20 µl) y 4 de ellos murieron a P1. Otra cohorte de 28 recién nacidos de tipo silvestre, en el mismo se observaron en los núcleos hipotalámicos una
- 30 hora después de la inyección (Cushing, B.S., et al., 2003; Yamamoto, Y., et al., 2004). A continuación, decidimos inyectar 2 µg de OT en recién nacidos Magel2 KO y de tipo silvestre, 3 a 5 horas después del nacimiento, el tiempo cuando los recién nacidos de tipo silvestres comenzaron a mamar, pero no los neonatos mutantes. En una primera etapa, usando dos cohortes de crías de tipo silvestre (n=28), se comprobó que una inyección subcutánea (s.c) de solución salina (20 µl de NaCl al 0,9 %) y una inyección s.c de solución de oxitocina (2 µg en 20 µl de NaCl al 0,9 %) no indujeron letalidad. El nivel de letalidad es similar después de una inyección de solución salina (4/28 crías
- 35 muertas) u oxitocina (3/28 crías muertas) y está en el intervalo de letalidad normalmente observada en cohortes de tipo silvestre. En una segunda etapa, diez camadas que incluían un total de 37 neonatos de tipo silvestre y 40 de Magel2 KO, se inyectaron con una solución de oxitocina. A P2, observamos que el 95 % (35/37) de recién nacidos de tipo silvestre y el 93 % (37/40) de mutante Magel2 sobrevivieron con leche previamente detectada en su estómago a P1. Paralelamente, controlamos que el rescate de neonatos Magel2 KO era específicamente debido a la
- 40 inyección de oxitocina y no a la fuerza de inyección y/o manipulación de los neonatos. En un experimento control realizamos una inyección s.c de vehiculizante en 33 neonatos de mutante Magel2 y 37 de tipo silvestre. A P1 estimamos a 48,5 % (16/33) la letalidad entre individuos Magel2 KO aunque solamente murió 1 (2,7 %) cría de tipo silvestre. Notablemente la muerte de estos 16 mutantes Magel2 se correlaciona con una falta de leche en el estómago de los cadáveres. El alto porcentaje (48,5 %) de letalidad observada en crías de Magel2 pero no en crías de tipo silvestre, siendo inyectadas ambas con solución salina, es comparable con la letalidad observada en recién
- 45 nacidos Magel2 no tratados.

Experimentos similares se realizaron con inyecciones AVP pero a cualquier dosis inyectada, AVP no rescató el fenotipo de neonatos deficientes en Magel2.

- 50 Concluimos que una inyección simple de OT, en una ventana específica de tiempo, 3 a 5 horas después del nacimiento, era capaz de rescatar eficazmente el índice de muerte debido al déficit alimentario observado en recién nacidos Magel2 KO.

Ejemplo 2: Administración de oxitocina en pacientes adultos con SPW

Material y métodos

- 55 Los inventores diseñaron un estudio piloto controlado placebo, doble ciego aleatorio (identificador ClinicalTrials.gov: NCT01038570) para ser conducido en un centro dedicado a SPW, donde los pacientes son regularmente admitidos durante un mes y viven en un ambiente controlado. Los pacientes saben que no tienen acceso libre a la comida pero no tienen dudas sobre el tiempo y el contenido de las comidas. Para cada estancia, se admiten 16 pacientes con

SPW y toman parte en actividades de grupo ocupacionales y físicas diariamente planeadas. También reciben atención médica si es necesario y soporte psicológico. Los 24 pacientes incluidos en este estudio (16 mujeres, 8 hombres, media de edad de 28,5 años [18,7 a 43,6], IMC medio de 43 kg/m² [19,4 a 67,4]) se estratificaron por género y IQ (IQ medio=51 [45 a 75]). La diagnosis de SPW se confirmó genéticamente usando el ensayo de metilación de ADN estándar y el análisis molecular posterior mostró una distribución clásica de genotipo. Diecinueve pacientes tenían una delección (79 %), tres (12,5 %) una UPD, y en dos casos (8,5 %) se desconocía el subtipo genético. Los pacientes, así como los padres o cuidadores daban su consentimiento por escrito antes de entrar en el estudio. Los criterios de exclusión eran un ECG anormal y otros problemas cardiovasculares graves. Los pacientes eran bien conocidos para el equipo. Cada pareja de pacientes del mismo género y el mismo intervalo IQ se evaluaba el mismo día. Los dos pacientes de la pareja recibieron OT o placebo en una aleatorización doble ciega. Los pacientes estaban incluidos en el estudio durante el transcurso de tres series de estancias.

Cada paciente recibió una administración intranasal simple de o bien placebo (solución salina) u OT (Syntocinon®/-Spray, Novartis, Basel, Suiza) con tres soplos por fosa nasal (24 UI). La dosis de 24 UI es lo más frecuentemente informado en la bibliografía. Ya que los inventores no tuvieron éxito en obtener frascos vacíos de Syntocinon® de Novartis, los inventores usaron un frasco diferente y el fármaco fue administrado por una enfermera de otro departamento del hospital. Esta enfermera no conocía ni los pacientes ni el estudio.

El comportamiento de los pacientes era cuidadosamente controlado, puntuado diariamente por el psicólogo del equipo, y documentado en la forma de informe del caso durante los dos días antes de la administración de fármaco, a la mitad del día después de la administración (efectos tempranos) y durante los dos días después de la administración del fármaco (efectos tardíos). Tanto el personal como el investigador no eran conscientes del estado del tratamiento. Actualmente no hay cuadrículas validadas que evalúen las características de comportamiento específicas de pacientes con SPW que querían estudiar particularmente, es decir, tendencias hacia el aislamiento, tristeza, y depresión, autodespresión, automutilación, conflictos con otros, conducta disruptiva, interés en la amistad, interés en los asuntos amorosos, y confianza con otros. Por esta razón, usaron una cuadrícula interna desarrollada por los cuidadores y basada en la observación rutinaria de estos pacientes en este centro dedicado a SPW con experiencia reconocida (17, 18). Los criterios que el personal usó para rellenar la cuadrícula se explican en la Tabla 1. Los pacientes eran bien conocidos por el equipo, pero el estado de comportamiento medio se volvió a evaluar durante la primera semana de admisión usando la misma cuadrícula. Las características de comportamiento de los pacientes se puntuaron como no cambiado, moderadamente cambiado, o gravemente cambiado. Para cada criterio, una puntuación negativa reflejaba deterioro en el estado de comportamiento medio del paciente mientras que una puntuación positiva reflejaba un mejoramiento. El comportamiento alimentario también se puntuó usando tres categorías: normal, mejor que normal o peor, en base al análisis de cada comida. Se evaluó lo siguiente: cantidad de ingesta de alimento por comida, cantidad de alimento requerido por comida, duración de la comida, y comportamiento desde/durante/después de la comida. Para evaluar el efecto temprano de OT, analizamos solamente la primera comida después de la administración del fármaco.

Cuarenta y cinco minutos después de la administración intranasal, se administraron tres ensayos que evalúan el entendimiento de los códigos sociales, los cuales duraron una hora. Al contrario de la cuadrícula de comportamiento, no hubo evaluación pre-administración. La prueba de Sally y Ann valora la capacidad de uno de entender las situaciones simples al contar historias e imágenes. También se usaron dibujos que representaban situaciones sociales más complejas diseñados para la evaluación de niños autistas ("Cartoons", ensayo no publicado). El ensayo "lectura de la mente en los ojos" (LMO) valora la capacidad de leer emociones de expresiones faciales eficaces sutiles, especialmente en los ojos. Se eligió un ensayo acortado con 19 imágenes de la versión revisada de 36 puntos por el psicólogo del equipo. En estos tres ensayos, TOM es necesario para entender y analizar las situaciones sociales que se presentan. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Mann-Whiney, el ensayo Wilcoxon o el ensayo chi².

Cuatro pacientes en el grupo OT y tres en el grupo placebo estuvieron recibiendo medicaciones psicotrópicas.

Resultados

Pacientes en el grupo OT mostraron confianza significativamente incrementada en otros ($P=0,02$), tendencias menores hacia la tristeza ($P=0,02$) y menos conducta disruptiva ($P=0,03$) en los dos días después de la administración intranasal del fármaco. También mostraron una tendencia hacia menores conflictos con colegas ($P=0,07$) a medio día después de la administración intranasal. La Tabla 2 muestra estos resultados en detalle. Digno de mención, no había diferencia entre los dos grupos antes de la administración intranasal para cualquier punto.

En el grupo de los 19 pacientes con delecciones (9 en el grupo OT, 10 en el grupo placebo), también se encontró un efecto significativo de OT intranasal sobre la conducta disruptiva ($P=0,04$), así como una tendencia hacia más confianza en otras ($P=0,05$) menores tendencias a la tristeza ($P=0,07$) y más interés en la amistad ($P=0,05$) (datos no mostrados). El bajo número de pacientes con no delección ($n=5$) no permitieron análisis estadístico (datos no mostrados).

El mismo análisis se realizó excluyendo los siete pacientes que recibieron medicaciones psicotrópicas (4 pacientes en el grupo OT y 3 en el grupo placebo) y mostraron que el grupo OT tenía menos conducta disruptiva ($P=0,04$) en los dos días después de la administración intranasal del fármaco (datos no mostrados).

5 La diferencia entre antes y después (pre-post), la cual se calculó como la “puntuación del efecto tardío después de administración” menos la “puntuación antes de administración”, era significativa en el grupo OT para los puntos de conducta disruptiva ($P=0,01$) y automutilación ($P=0,047$), mientras que no había diferencia en el grupo placebo (Tabla 3). Había una tendencia ($P=0,07$) hacia una evolución diferente en la diferencia entre antes y después entre los dos grupos para el punto de conducta disruptiva.

10 No se observó diferencia estadística en las puntuaciones que valoraban el comportamiento alimentario entre los dos grupos. No obstante, cinco pacientes en el grupo OT (45 %) y uno en el grupo placebo (10 %) dijeron que no sentían hambre y ligeramente disminuyeron su ingesta de alimento durante los dos días después de la administración intranasal.

15 Las pruebas que evalúan las herramientas sociales mostraron una tendencia hacia el mejoramiento en el grupo OT ($n=12$). Ochenta y tres por ciento de los pacientes en este grupo completaron con éxito la prueba de Sally y Ann en comparación con el 50 % en el grupo placebo ($n=12$) ($P=0,19$, Fig. 1). La misma tendencia se observó con la prueba “Cartoons”, con una puntuación mayor obtenida en el grupo OT que en el grupo placebo: 3,75 (1 a 18) frente a 6 (0 a 12) ($P=0,56$). No había diferencia significativa en la puntuación de LMO total entre los dos grupos: 7 (4 a 9) en el grupo OT frente a 5,5 (1 a 11) ($P=0,18$).

20 La tolerancia de OT era excelente sin efecto sobre el electrocardiograma y PSA. No se observaron casos adversos durante el estudio.

Puntos de comportamiento	Criterios de puntuación
Tendencias al aislamiento	jugar juegos solitarios, tomar paseos solo
Tendencias a la tristeza	estado de humor expresado por lágrimas, quejas, frustración, irritación con otros
Tendencias depresivas	permanencia en la cama, abandono del autocuidado, mostrar poca motivación o interés, apartado
Autodesprecio	auto menosprecio, señalar sus propias incapacidades y fallos, expresar baja autoestima
Automutilación	mutilaciones: arañazos o raspaduras de la piel, arrancar el pelo o las cejas
Conflictos con otros	oposición a otros, disputas verbales o físicas, quejas dirigidas a otros, realizar amenazas
Comportamiento disruptivo	autoaislamiento en la habitación, romper cosas, etc., en respuesta a un conflicto o frustración
Interés en la amistad	hacer amigos con otros pacientes, tomar parte en las actividades del grupo
Interés en asuntos amorosos	mostrar interés en tener una relación especial con alguien del sexo opuesto (o no)
Confiar en otros	dar paseos, saludar espontáneamente a otros, introducirse a asimismo a cuidadores o preguntar por ayuda, etc.

Tabla 1: Criterios usados por el personal para rellenar la cuadrícula de comportamiento

Variable	Grupo Placebo	Grupo OT	Valor P
Tendencias al aislamiento			
Pre-administración	-0,111±0,296	-0,083±0,289	0,580
Efecto temprano	-0,250±0,452	-0,083±0,289	0,284
Efecto tardío	-0,111±0,217	0±0	0,070

Tabla 1 (continuación)

Variable	Grupo Placebo	Grupo OT	Valor P
Tendencias a la tristeza			
Pre-administración	-0,208±0,276	-0,194±0,407	0,513
Efecto temprano	-0,083±0,289	-0,083±0,289	>0,99
Efecto tardío	-0,347±0,379	-0,083±0,289	0,021
Tendencias depresivas			
Pre-administración	-0,028±0,096	-0,056±0,192	0,952
Efecto temprano	0±0	0±0	>0,99
Efecto tardío	-0,125±0,311	0±0	0,149
Autodesprecio			
Pre-administración	-0,028±0,096	-0,056±0,192	0,952
Efecto temprano	0±0	-0,083±0,289	0,317
Efecto tardío	-0,083±0,289	0±0	0,317
Automutilación			
Pre-administración	-0,069±0,166	-0,278±0,468	0,271
Efecto temprano	-0,083±0,289	-0,083±0,289	>0,99
Efecto tardío	-0,028±0,096	-0,083±0,195	0,482
Conflictos con otros			
Pre-administración	-0,208±0,276	-0,319±0,359	0,467
Efecto temprano	-0,250±0,452	0±0	0,07
Efecto tardío	-0,125±0,237	-0,111±0,205	0,939
Conducta disruptiva			
Pre-administración	-0,361±0,354	-0,431±0,344	0,744
Efecto temprano	-0,250±0,452	-0,167±0,389	0,623
Efecto tardío	-0,306±0,382	-0,042±0,144	0,031
Interés en amistad			
Pre-administración	0,806±0,324	0,875±0,433	0,349
Efecto temprano	0,833±0,389	0,917±0,515	0,683
Efecto tardío	0,778±0,410	1,028±0,234	0,088
Interés en asuntos amorosos			
Pre-administración	0,847±0,579	0,972±0,531	0,589
Efecto temprano	0,833±0,389	0,917±0,515	0,683
Efecto tardío	0,847±0,441	0,903±0,411	0,714

Tabla 1 (continuación)

Variable	Grupo Placebo	Grupo OT	Valor P
Confianza en otros			
Pre-administración	0,833±0,389	0,861±0,332	0,929
Efecto temprano	0,917±0,289	0,833±0,389	0,546
Efecto tardío	0,764±0,366	1,028±0,096	0,023

- 5 Tabla 2: puntuaciones del comportamiento antes y después de la administración de OT en los grupos placebo y OT; la puntuación de pre-administración es la media de las puntuaciones informadas en los dos días antes de la administración; Efecto temprano es la puntuación intermedia registrada medio día después de la administración y el Efecto tardío es la media de las puntuaciones informadas en los dos días después de la administración (se excluyó la puntuación intermedia registrada medio día después de la administración).

10

Cambio en las puntuaciones de comportamiento	Grupo placebo			Grupo OT			OT frente a Placebo	
	Media	SD	valor P (Mann Whitney)	Media	SD	valor P (Mann Whitney)	valor P (Wilcoxon*)	
Tendencias al aislamiento	-0,000	0,402	0,723	0,083	0,289	0,317	0,404	
Tendencias a la tristeza	-0,139	0,324	0,260	0,111	0,533	0,343	0,217	
Tendencias depresivas	-0,097	0,230	0,158	0,056	0,192	0,317	0,088	
Autodesprecio	-0,056	0,192	0,317	0,056	0,192	0,317	0,166	
Automutilación	0,042	0,203	0,530	0,194	0,354	0,047	0,236	
Conflictos con otros	0,083	0,314	0,735	0,208	0,498	0,150	0,532	
Comportamiento disruptivo	0,056	0,457	0,812	0,389	0,385	0,011	0,070	
Interés en amistad	-0,028	0,497	0,690	0,153	0,379	0,183	0,245	
Interés en asuntos amorosos	-0,000	0,632	1,000	-0,069	0,429	0,600	0,704	
Confianza en otros	-0,069	0,399	0,850	0,167	0,333	0,084	0,222	

Tabla 3: diferencias entre antes y después (pre-post) en las puntuaciones de comportamiento de los dos grupos y la comparación del cambio entre el tratamiento con OT y placebo.

* la prueba de Wilcoxon está basada en los cambios individuales

REFERENCIAS

Altstein, M., Dudai, Y. & Vogel, Z. Angiotensin-converting enzyme associated with Torpedo californica electric organ membranes. *J Neurosci Res* 18, 333-340 (1987).

Andrieu, D., et al. Expression of the Prader-Willi gene *Necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and *p75NTR* expression. *Gene Expr Patterns* 3, 761-765 (2003).

Andrieu, D., et al. Sensory defects in *Necdin* deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol* 6, 56 (2006).

Ben-Barak, Y., Russell, J.T., Whitnall, M.H., Ozato, K. & Gainer, H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Neurosci* 5, 81-97 (1985).

Bittel, D. C. and M. G. Butler (2005). "Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology." *Expert Rev Mol Med* 7(14): 1-20.

Boksa, P. Early developmental profiles of plasma corticosterone are altered by birth condition in the rat: a comparison of vaginal birth, cesarean section, and cesarean section with added anoxia. *Pediatr Res* 41, 34-43 (1997).

Carter, C.S. Developmental consequences of oxytocin. *Physiol Behav* 79, 383-397 (2003).

Cassidy, S. B. and D. J. Driscoll (2009). "Prader-Willi syndrome." *Eur J Hum Genet* 17(1): 3-13.

Cushing, B.S., Yamamoto, Y., Hoffman, G.E. & Carter, C.S. Central expression of *c-Fos* in neonatal male and female prairie voles in response to treatment with oxytocin. *Brain Res Dev Brain Res* 143, 129-136 (2003).

de Smith, A. J., C. Purmann, et al. (2009). "A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism." *Hum Mol Genet* 18(17): 3257-65.

Delaney, A.L. & Arvedson, J.C. Development of swallowing and feeding: prenatal through first year of life. *Dev Disabil Res Rev* 14, 105-117 (2008).

Dickinson, H., Walker, D.W. & Castillo-Melendez, M. Onset of feeding at birth--perinatal development of the hypothalamic mechanisms that induce appetite and feeding in the newborn. *Neurosci Lett* 436, 1-6 (2008).

Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Dietrich, P. Huntingtin-associated protein 1 (Hap1) mutant mice bypassing the early postnatal lethality are neuroanatomically normal and fertile but display growth retardation. *Hum Mol Genet* 13, 3115-3125 (2004).

Girard, J., Ferre, P., Pegorier, J.P. & Duce, P.H. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72, 507-562 (1992).

Goldstone, A. P. (2004). "Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment." *Trends Endocrinol Metab* 15(1): 12-20.

Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K. & Naruse, I. Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol Neonate* 78, 293-299 (2000).

Lesage, J., Bernet, F., Montel, V. & Dupouy, J.P. Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. *Neurochem Res* 21, 87-96 (1996).

Liu, X., Tribollet, E., Ogier, R., Barberis, C. & Raggenbass, M. Presence of functional vasopressin receptors in spinal ventral horn neurons of young rats: a morphological and electrophysiological study. *Eur J Neurosci* 17, 1833-1846 (2003).

Manning Maurice, Stoytcho Stoev, Bice Chini, Thierry Durroux, Bernard Mouillac and Gilles Guillon. Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Progress in Brain Research*, 2008, Vol. 170 ISSN 0079-6123.

Muscatelli, O. D. a. F. (2008). Prader-Willi Syndrome. *Obesity. Genomics and Postgenomics*. K. C. a. T. Sorensen, Informa Healthcare: 179-193.

Muscatelli, F., et al. Disruption of the mouse necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human prader-willi syndrome [In Process Citation]. *Hum Mol Genet* 9, 3101-3110 (2000).

Pitt Gary R. W., Andrzej R. Batt, Robert M. Haigh, Andrew M. Penson, Peter A. Robson, David P. Rooker, Andre' L. Tartar, Julie E. Trim, Christopher M. Yea and Michael B. Roe. Non-peptide oxytocin agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14 (2004) 4585-4589.

Reymond-Marron, I., Tribollet, E. & Raggenbass, M. The vasopressin-induced excitation of hypoglossal and facial motoneurons in young rats is mediated by V1a but not V1b receptors, and is independent of intracellular calcium signalling. *Eur J Neurosci* 24, 1565-1574 (2006).

Ring RH, Schechter LE, Leonard SK, Dwyer JM, Platt BJ, Graf R, Grauer S, Pulicicchio C, Resnick L, Rahman Z, Sukoff Rizzo SJ, Luo B, Beyer CE, Logue SF, Marquis KL, Hughes ZA, Rosenzweig-Lipson S. Receptor and behavioral pharmacology of WAY-267464, a non-peptide oxytocin receptor agonist. *Neuropharmacology*. 2010 Jan;58(1):69-77. Epub 2009 Jul 15.

Saito, O., Yamamoto, T. & Mizuno, Y. Epidural anesthetic management using ropivacaine in a parturient with multi-minicore disease and susceptibility to malignant hyperthermia. *J Anesth* 21, 113 (2007).

Sahoo, T., D. del Gaudio, et al. (2008). "Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster." *Nat Genet* 40(6): 719-21.

Serradeil-Le Gal Claudine, Ge' rard Valette, Lo'c Foulon, Guy Germain, Charles Advenier, Emmanuel Naline, Marc Bardou, Jean-Pierre Martinolle, Brigitte Pouzet, Danielle Raufaste, Corinne Garcia, Ele' onore Double-Cazanave, Maxime Pauly, Marc Pascal, Alain Barbier, Bernard Scatton, Jean-Pierre Maffrand, and Ge' rard Le Fur. SSR126768A (4-Chloro-3-[(3R)-()-5-chloro-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-N-ethyl-N-(3-pyridylmethyl)-benzamide, Hydrochloride): A New Selective and Orally Active Oxytocin Receptor Antagonist for the Prevention of Preterm Labor. *JPET* 309:414–424, 2004.

Swaab, D. F. (1997). "Prader-Willi syndrome and the hypothalamus." *Acta Paediatr Suppl* 423: 50-4.

Serradeil-Le Gal, C., et al. SSR126768A (4-chloro-3-[(3R)-(+)-5-chloro-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-N-ethyl-N-(3-pyridylmethyl)-benzamide, hydrochloride): a new selective and orally active oxytocin receptor antagonist for the prevention of preterm labor. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 414-424 (2004).

Su LL, Chong YS, Samuel M. Oxytocin agonists for preventing postpartum haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jul 18;(3):CD005457.

C. Vela, z. Diaz-cabiale, c. Parrado, m. Narvaez, r. Covenas, j.a. Narvaez. Involvement of oxytocin in the nucleus tractus solitarius on central cardiovascular control: interactions with glutamate. *Journal of physiology and pharmacology* 2010, 61, 1, 59-65.

Whitnall, M.H., Key, S., Ben-Barak, Y., Ozato, K. & Gainer, H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophyseal system. II. Immunocytochemical studies of the ontogeny of oxytocinergic and vasopressinergic neurons. *J Neurosci* 5, 98-109 (1985).

Yamamoto, Y., et al. Neonatal manipulations of oxytocin alter expression of oxytocin and vasopressin immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in a gender-specific manner. *Neuroscience* 125, 947-955 (2004).

Zelena, D., et al. Response of the adrenomedullary system to early postnatal stress in the Brattleboro rat. *Ann N Y Acad Sci* 1148, 456-461 (2008).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agonista del receptor de oxitocina para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un mamífero con síndrome de Prader-Willi, similar al síndrome de Prader-Willi o la enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT).
2. Un agonista del receptor de oxitocina para su uso según la reivindicación 1 en donde el agonista es la oxitocina o un fragmento activo de la misma.
3. El agonista para su uso según la reivindicación 1 o 2 en donde el mamífero es un ser humano.
- 10 4. El agonista para su uso según la reivindicación 3 en donde el agonista se administra a un ser humano en cualquier fase de la vida.
5. El agonista para su uso según la reivindicación 3 en donde el ser humano es un niño.
6. El agonista para su uso según la reivindicación 5 en donde el agonista se administra al niño en los tres primeros meses de su vida.
7. El agonista para su uso según la reivindicación 3 en donde el ser humano es un adulto.
- 15 8. El agonista para su uso según la reivindicación 1 a 7 en donde el agonista del receptor de oxitocina es la oxitocina, la carbetocina o la demoxitocina.
- 20 9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno alimentario con inicio temprano en un mamífero con síndrome de Prader-Willi, similar al síndrome de Prader-Willi o enfermedad del retraso no orgánico del crecimiento (NOFTT) que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor de oxitocina según las reivindicaciones 1, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

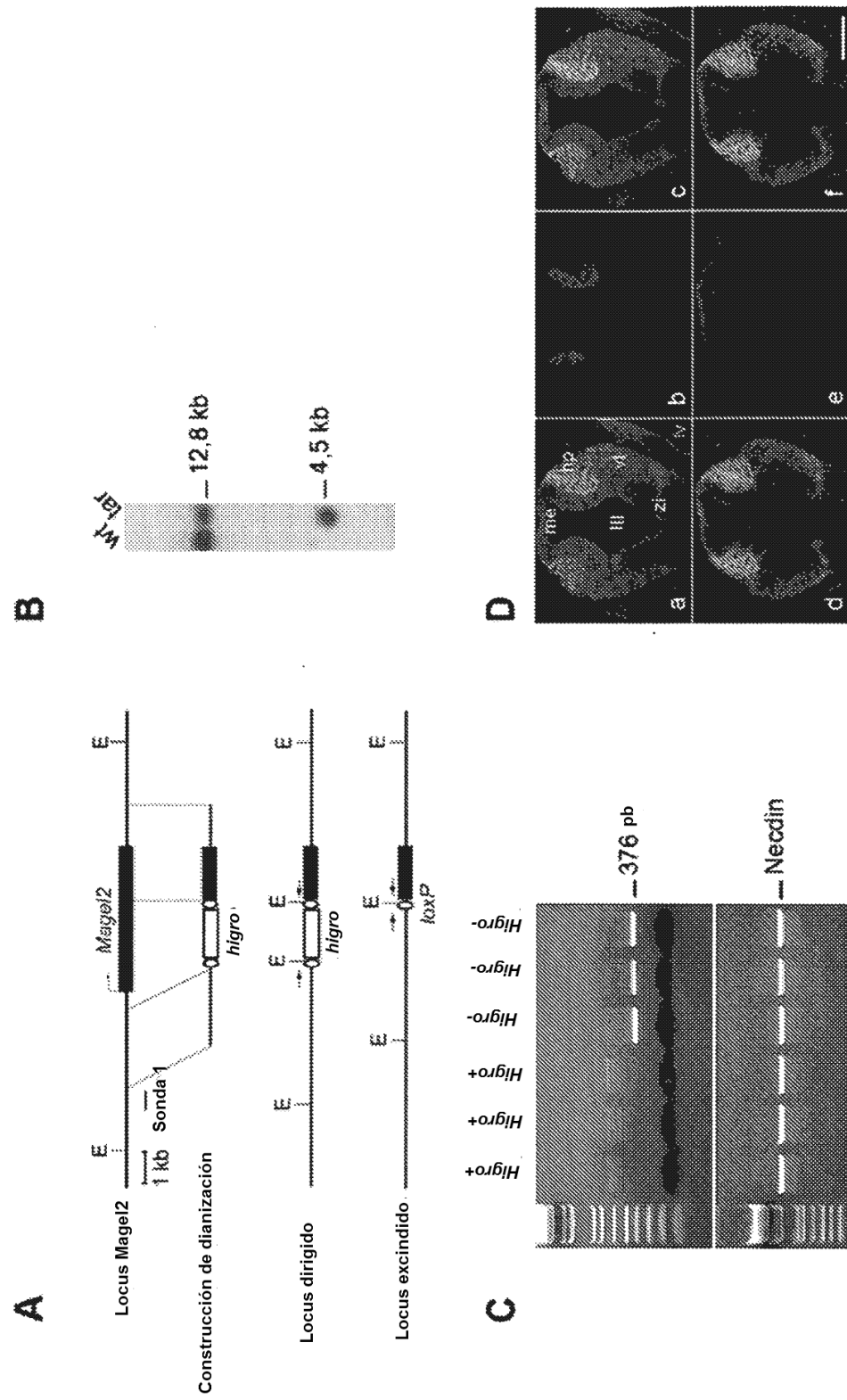


Figura 1

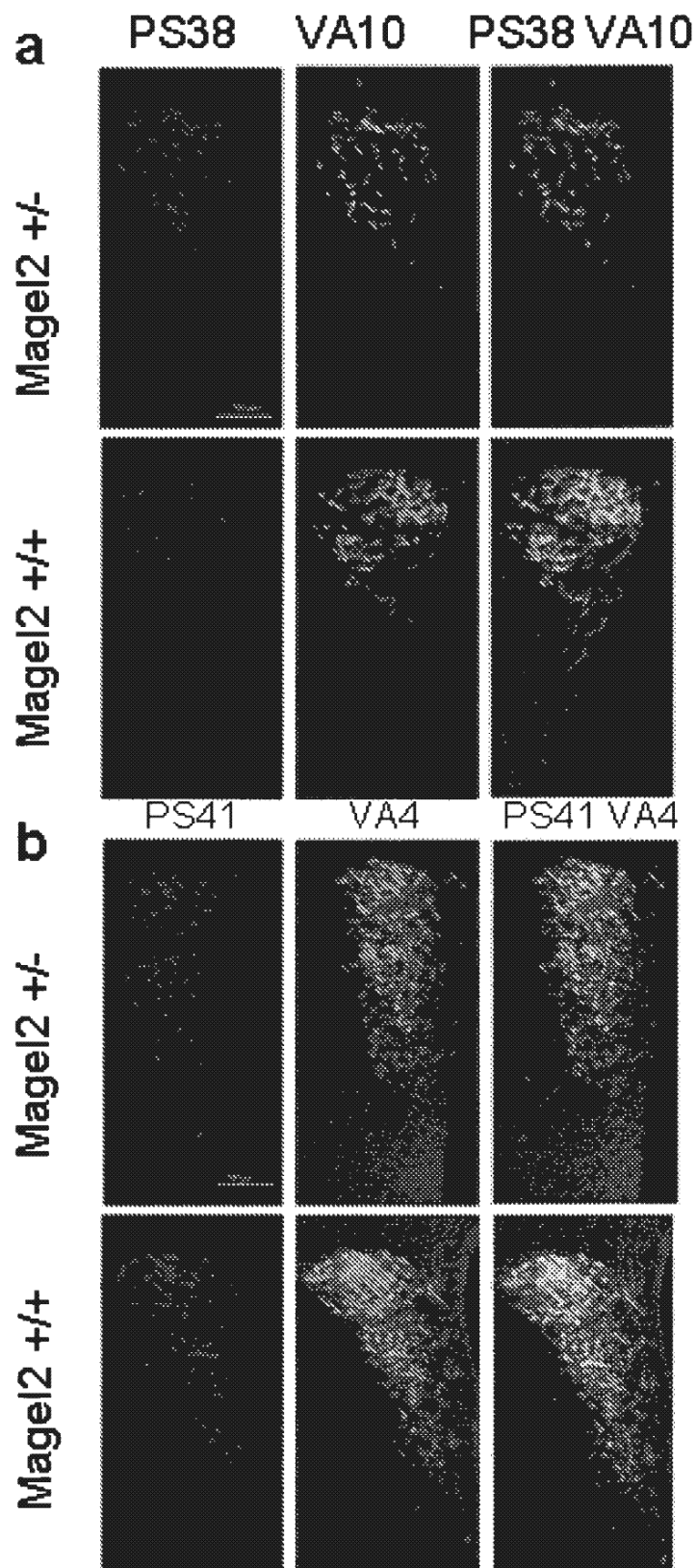


Figura 2

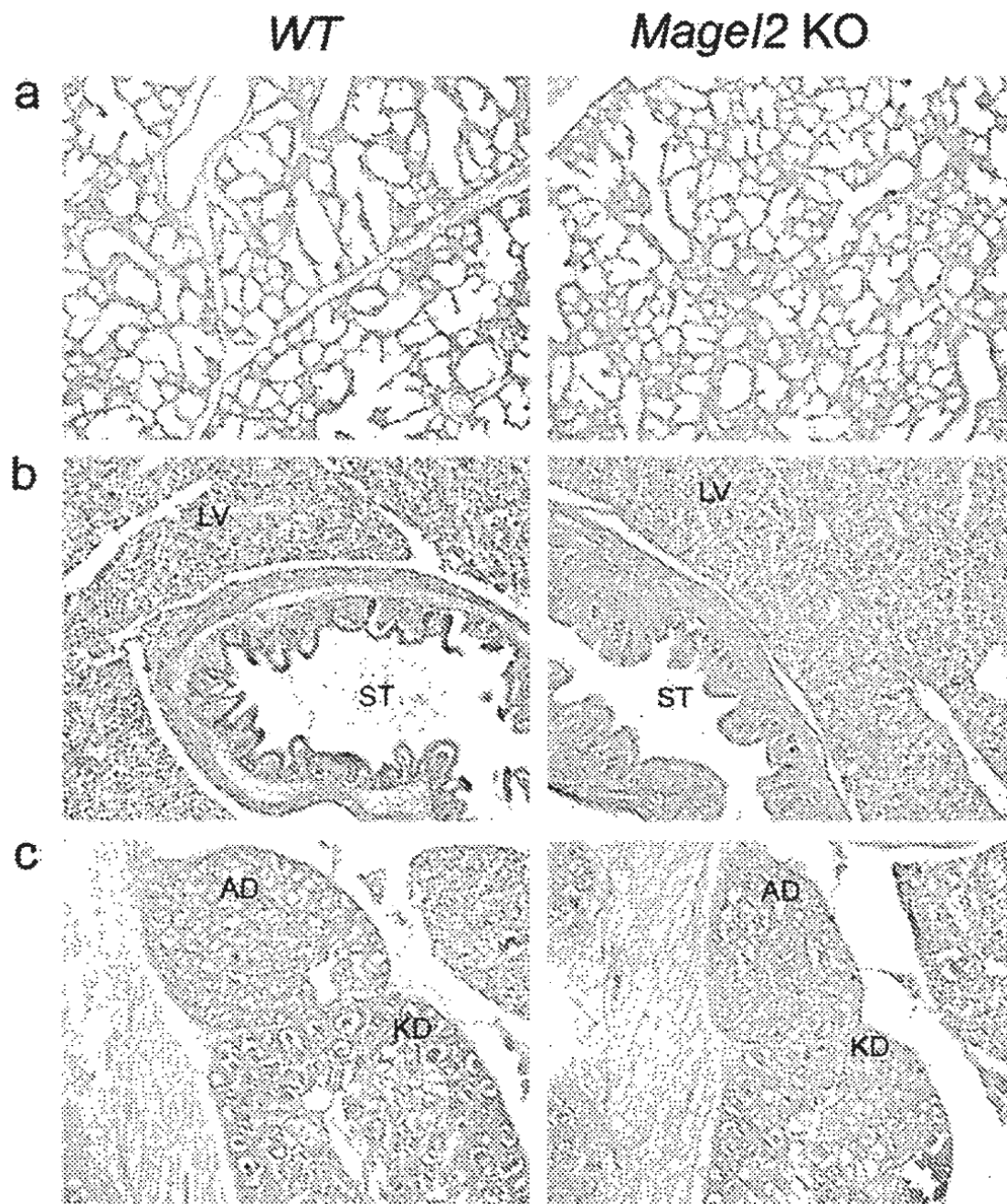


Figura 3

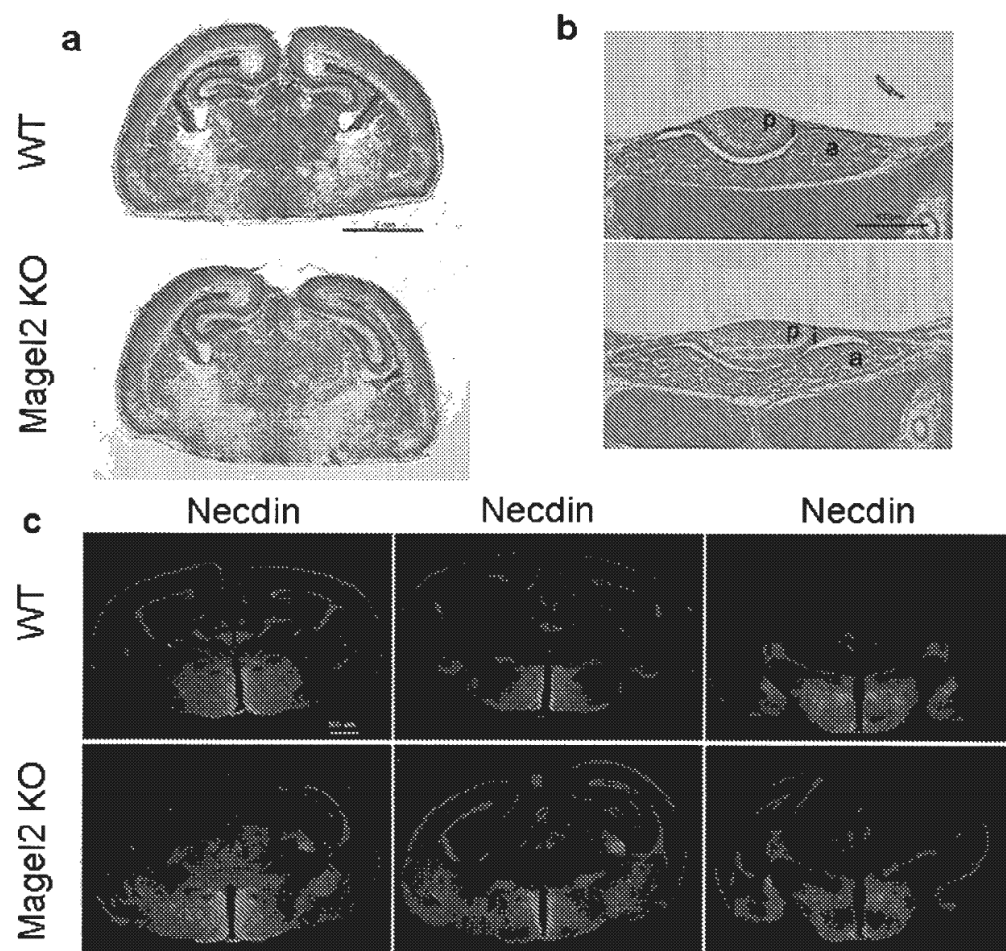


Figura 4

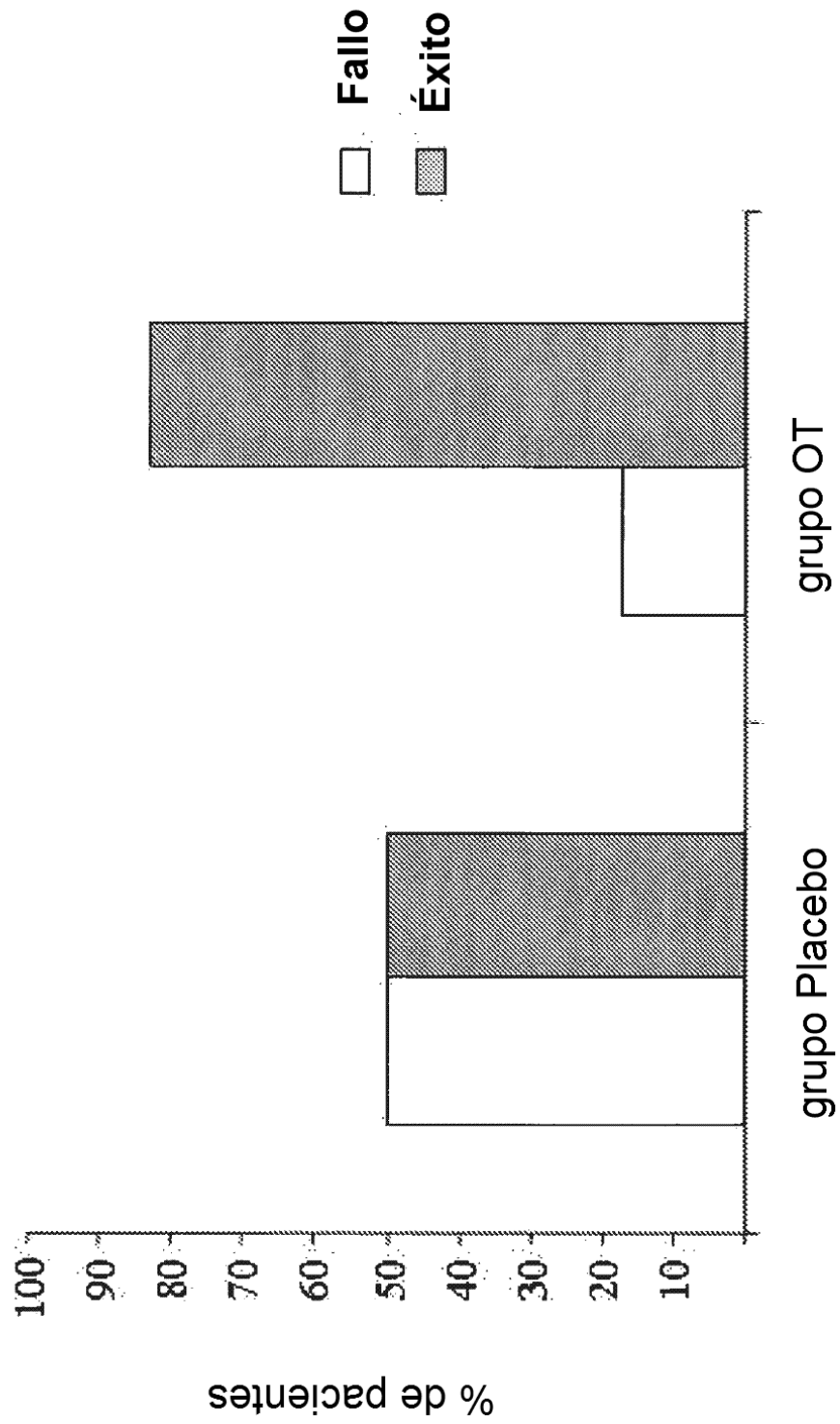


Figura 5