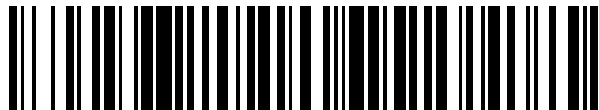


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 590**

51 Int. Cl.:

A23L 33/17 (2006.01)

A23L 33/175 (2006.01)

A23K 20/142 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2005 PCT/US2005/039657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2006 WO06050432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2005 E 05817085 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1807069**

54 Título: **Métodos para regular el peso y tamaño de los animales con glicina**

30 Prioridad:

02.11.2004 US 624228 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**ORAGENICS, INC. (100.0%)
13700 PROGRESS BOULEVARD
ALACHUA, FL 32615, US**

72 Inventor/es:

**HILLMAN, JEFFREY DANIEL;
CHOJNICKI, ERIC W.T. y
ORUGUNTY, RAVI SHANKAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 628 590 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 para regular el peso y tamaño de los animales con glicina

- 5 La presente invención se refiere a una composición de dieta de alto contenido en glicina que comprende del 10 % en peso al 30 % en peso de glicina, basado en la composición de dieta para su uso en la reducción del peso en un animal obeso o con sobrepeso.

10 En los Estados Unidos se estima que el 60 % de los adultos satisface los requerimientos clínicos para considerarse con sobrepeso o clínicamente obesos, dando como resultado 300.000 muertes anualmente. Véase, Eberhardt et al., *Urban and rural health chartbook. 2001, Health*, United States Hyattsville (MD): NCHS. pág. 296; *General, The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity: 2001*, R.M. U.S. Department Health and Human Services, Editor, 2001. En 2001, el director de los servicios estatales de salud pública de los Estados Unidos emitió un llamamiento a la acción para prevenir y disminuir la incidencia y frecuencia de individuos con sobrepeso o clínicamente obesos. *The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity: 2001*, R.M. U.S. Department Health and Human Services, Editor, 2001. Curiosamente, en este informe no se menciona la aplicación o el uso de una propuesta farmacéutica al problema. Sin embargo, hay un gran interés en el desarrollo de una propuesta farmacéutica por instituciones de investigación tanto industriales como académicas. La propuesta farmacéutica es atractiva puesto que hay una gran probabilidad de mayor conformidad debido a la probable facilidad de aplicación y uso.

25 Estudios epidemiológicos en todo el mundo han demostrado una correlación indiscutible entre mortalidad y obesidad. El progreso que se ha realizado durante los últimos 50 años en conseguir nuestros objetivos de salud respecto a la prevención y control de enfermedades infecciosas, cardiopatía, diabetes y ciertos tumores malignos se ha destruido en gran parte por el crecimiento de la epidemia de la obesidad. En 2001, aproximadamente el 25 % de los niños y adolescentes tenía sobrepeso, más de dos veces el porcentaje de hace 20 años. Actualmente, se encuentra más del 60 % de adultos con sobrepeso u obesos y más de 300.000 muertes al año pueden atribuirse directamente a estas afecciones solamente en los EE.UU. Estos hallazgos sobrepasan todas las razas, edades, grupos étnicos y ambos géneros, aunque ciertos grupos, en particular grupos minoritarios y de bajo nivel socioeconómico, son claramente más propensos que otros. *The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity: 2001*, R.M. U.S. Department Health and Human Services, Editor, 2001.

35 El sobrepeso, definido como un índice de masa corporal (IMC que oscila de 25-29,9 kg/m²) y la obesidad (IMC > 30 kg/m²), se han correlacionado con muerte prematura, diabetes tipo 2, cardiopatía, apoplejía, hipertensión, coleciostopatía, artrosis, apnea del sueño, asma, diversos problemas respiratorios, ciertos tumores malignos, alto colesterol en sangre, complicaciones del embarazo, riesgo quirúrgico aumentado, trastornos psicológicos y otras afecciones patológicas demasado numerosas para enumerarse. *The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity: 2001*, R.M. U.S. Department Health and Human Services, Editor, 2001; NHLBI, *Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults*, N. NIH, Editor. 1998, HHS, PHS. pág. 29-41. Los individuos obesos presentan un 50-100 % de riesgo aumentado de muerte prematura de todas estas causas comparado con personas con un IMC en el intervalo normal (20-25 kg/m²). Incluso una pérdida de peso moderada (5-15 % de peso corporal total de exceso) reduce los factores de riesgo para al menos algunas de estas enfermedades, en particular cardiopatía, a corto plazo. NHLBI, *Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults*, N. NIH, Editor. 1998, HHS, PHS. pág. 29-41. La evidencia actual sugiere que el efecto puede presentar beneficios a largo plazo también. Véase ídem; NIDDK, *Study of health outcomes of weight-loss (SHOW) trial*, NIDDK, Editor. 2001, Instituto Nacional de Salud, EE.UU.

50 El llamamiento a la acción de 2001 del director de los servicios estatales de salud pública para prevenir y disminuir el sobrepeso y la obesidad hace énfasis en los cambios obvios en el estilo de vida americano durante varias décadas pasadas, con una creciente dependencia de fuentes de mala nutrición y un estilo de vida sedentario aumentado. Su principal llamamiento a la acción es para fomentar la educación en los colegios y por toda la comunidad para alentar a comer sano y hacer ejercicio adecuado y regular. En este punto en el proceso en curso, parece muy probable que la inmensa mayoría de los ciudadanos de los EE.UU. presente al menos un conocimiento superficial de este importante mensaje. Sin embargo, la tendencia actual a la obesidad no muestra signos de remitir, y, de hecho, se prevé que empeore con el tiempo. Claramente, el principal obstáculo para la superación es la necesidad de cumplimiento de dieta y ejercicio según las directrices dirigidas por la población general, que representa una perspectiva poco prometidora.

60 Una característica interesante del informe de 2001 del director de los servicios estatales de salud pública de los EE.UU. es que esencialmente no menciona propuestas farmacéuticas para la prevención y cura del sobrepeso y la obesidad. Obviamente, este es un área de gran interés entre las instituciones tanto académicas como industriales, puesto que dicha propuesta podía reducir potencialmente la necesidad de cumplimiento del paciente. Se ha hecho un enorme progreso en los últimos años en el entendimiento de las responsabilidades y funciones del tejido adiposo (revisado por Frayn et al., *Integrative physiology of human adipose tissue. Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. 27 (8): pág. 875-88), tanto desde el punto de vista de regulación de almacenaje de energía como como una célula secretora. La imagen que se ha presentado es muy compleja, puesto que implica la actividad del sistema nervioso

autónomo, el suministro de mezclas complejas de sustratos y hormonas, retroalimentación de efectores autocrinos y paracrinos segregados por adipocitos y también suministro vascular al tejido graso. Además, factores tales como leptina y adiponectina segregados por adipocitos presentan un efecto general sobre el metabolismo general. Véase, Guerre-Millo, *Adipose tissue hormones. J Endocrinol Invest*, 2002. 25 (10): 855-61; Kishida, *Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 306 (1): 286-92; Miner, *The adipocyte as an endocrine cell. J Anim Sci*, 2004. 82 (3): 935-41; Rabin, et al., *Adiponectin: linking the metabolic syndrome to its cardiovascular consequences. Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2005. 3 (3): 465-71; Houseknecht et al., *The biology of leptin: a review. J Anim Sci*, 1998. 76 (5): 1405-20; Mantzoros, *The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. Ann Intern Med*, 1999.130 (8): 671-80.

A partir de esto, es evidente que se requiere una propuesta holística muy integradora para lograr un completo entendimiento de los estados normales y patológicos que forman la base para el problema actual con el sobrepeso y la obesidad descrito anteriormente.

Se usan muchos tipos de animales para investigación, agricultura y compañía. En algunos casos, los costes de alojamiento y alimentación de estos animales son grandes. Costaría menos alimentar y alojar a animales de menor tamaño que los animales de tamaño normal. Por tanto, las composiciones y los métodos para producir animal o animales de tamaño reducido y/o animal o animales de peso reducido pueden ser ventajosos. Además, la obesidad en los animales de compañía es un problema. La obesidad puede producir una esperanza de vida disminuida y muchas de las mismas enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente para los seres humanos.

En este contexto, Sullivan et al., (Sullivan, M. X. et al.; *Studies on the Biochemistry of Sulphur, Public Health Reports*, 47 (2); 1932; págs. 75-83) describen, entre otros, composiciones de dieta que comprenden varias cantidades de glicina. Además, Kelley et al., (Kelley, B. et al.; *The Lipotropic Effect of Folic Acid on Rats Receiving Various Purified Diets; The Journal of Biological Chemistry*, 187; 1950; págs. 529-535) describe, entre otros, los efectos de una dieta que contiene glicina en ratas destetadas. Además, El Hafidi et al., (El Hafidi, M. et al.; *Glycine Intake Decreases Plasma Free Fatty Acids, Adipose Cell Size and Blood Pressure in Sucrose-fed Rats; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287; 2004; págs. R1387-R1393) describe el efecto de la ingesta de glicina sobre los ácidos grasos libres del plasma, el tamaño de las células adiposas y la tensión arterial en ratas.

La presente invención se refiere a una composición de dieta de alto contenido en glicina que comprende del 10 % en peso al 30 % en peso de glicina basado en la composición de dieta para su uso en la reducción del peso en un animal obeso o con sobrepeso.

En una realización preferida de la composición de dieta de alto contenido en glicina para su uso de la presente invención, el animal obeso o con sobrepeso es un animal adulto.

Además, en el presente documento se describe un método para inducir la apoptosis en tejido adiposo de un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende aproximadamente del 10 a aproximadamente 30 % de glicina al animal. Una dieta de alto contenido en glicina puede comprender glicina, análogos de glicina o una combinación de glicina y análogos de glicina.

En el presente documento se describe un método para reducir el tejido adiposo en un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina al animal.

En el presente documento se describe un método para reducir la fosforilación de BAD en la posición 136 de aminoácido en el tejido adiposo de un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina al animal.

En el presente documento se describe un método para reducir el tamaño de las células adiposas en un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina al animal.

En el presente documento se describe un método para reducir el contenido en grasa abdominal en un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina al animal.

En el presente documento se describe un método para producir la pérdida de peso en un animal que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina al animal. El método puede comprender además una terapia complementaria de pérdida de peso tal como un régimen de ejercicio, una dieta baja en grasa, una dieta baja en calorías, una dieta baja en hidratos de carbono, intervención quirúrgica, terapia conductual, farmacoterapia o una combinación de los mismos.

En el presente documento se describe un método para producir un animal de tamaño reducido o de peso reducido y después devolverlo a su tamaño normal. El método comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina a

un animal inmaduro para producir un animal de tamaño reducido o de peso reducido y después administrar una dieta normal al animal para producir un animal de tamaño normal o de peso normal.

5 En el presente documento se describe un método para producir un animal de tamaño reducido o de peso reducido que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina a un animal inmaduro para producir un animal de tamaño reducido o de peso reducido.

10 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos y de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % de una dieta baja en calorías.

15 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos y de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % de una dieta baja en grasa. La dieta baja en grasa puede ser una dieta baja en grasa saturada.

20 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos y de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % de una dieta baja en hidratos de carbono.

25 En el presente documento se describe un método para producir un animal de tamaño reducido o de peso reducido o tanto de tamaño reducido como de peso reducido, que comprende administrar una dieta de alto contenido en glicina que comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de glicina a un animal inmaduro.

30 En el presente documento se describe un método para inducir la apoptosis en un adipocito blanco, *in vivo* o *in vitro*, que comprende administrar uno o más análogos de glicina o una combinación de glicina y análogos de glicina al adipocito.

Finalmente, en el presente documento se describe un método para reducir la fosforilación de BAD en la posición 136 de aminoácido en un adipocito blanco, *in vivo* o *in vitro*, que comprende administrar uno o más análogos de glicina o una combinación de glicina y análogos de glicina al adipocito.

35 Las figuras muestran:

La Figura 1 muestra el efecto de una dieta al 5 % en glicina, una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre peso en ratas Fisher macho, adultas.

40 La Figura 2 muestra el efecto de una dieta al 5 % en glicina, una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el contenido de grasa abdominal en ratas Fisher macho, adultas.

La Figura 3 muestra el efecto de una dieta al 5 % en glicina, una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el peso de ratas Fisher hembra, adultas.

45 La Figura 4 muestra el efecto de una dieta al 5 % en glicina, una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el contenido de grasa abdominal en ratas Fisher hembra, adultas.

La Figura 5 muestra el efecto de una dieta al 5 % en glicina, una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el consumo de alimento en ratas Fisher macho, adultas.

La Figura 6 muestra el efecto de una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el peso de ratas ODZ macho.

50 La Figura 7 muestra el efecto de una dieta al 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el contenido en grasa abdominal de ratas ODZ.

La Figura 8 muestra el efecto de una dieta al 5 %, 10 %, 15 % y 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el peso de ratas Sprague-Dawley hembra.

La Figura 9 muestra el efecto de una dieta al 5 %, 10 %, 15 % y 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el consumo de alimento de ratas Sprague-Dawley.

55 La Figura 10 muestra el efecto de una dieta al 5 %, 10 %, 15 % y 20 % en glicina y una dieta no complementada sobre el contenido de grasa abdominal en ratas Sprague-Dawley hembra.

La Figura 11A-B muestra la fosforilación de BAD en la tirosina 136 en tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo.

60 Figura 11A: Calle 1: Marcador de peso molecular; Calle 2: BAD fosforilada por Akt como control positivo; Calle 3: BAD fosforilada de rata de control; Calle 4: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 5 % en glicina; Calle 5: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 20 % en glicina). Figura 11B: Calle 1: BAD fosforilada por Akt como control positivo; Calle 2: BAD fosforilada de ratas de control; Calle 3: BAD fosforilada de rata alimentada con dieta al 5 % de glicina; Calle 4: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 20 % de glicina).

65 La Figura 12 muestra la fosforilación de BAD en tejido hepático de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina. Calle 1: BAD fosforilada por Akt como control positivo; Calle 2: BAD fosforilada de

rata de control; Calle 3: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 5 % en glicina; Calle 4: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 15 % en glicina.

La Figura 13 muestra la fosforilación de BAD en tejido muscular de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina. Calle 1: Marcador de peso molecular; Calle 2: BAD Fosforilada por Akt como control positivo; Calle 3: BAD fosforilada de rata de control; Calle 4: BAD fosforilada de ratas alimentadas con dieta al 5 % de glicina; Calle 5: BAD fosforilada de una rata alimentada con dieta al 5 % de glicina. Calle 6: BAD fosforilada de una rata alimentada con dieta al 15 % en glicina).

La Figura 14 muestra los resultados de experimentos de marcaje doble de proteínas marcadas con fluoróforo Cy3 obtenidas del tejido adiposo de animales de control.

La Figura 15 muestra resultados de experimentos de marcaje doble de proteínas marcadas con fluoróforo Cy3 obtenidas del tejido adiposo de animales tratados con un 20 % de glicina en la dieta. Los círculos amarillos indican regulación negativa frente al control, mientras que los círculos rojos indican regulación positiva cuando es discernible por inspección visual.

La Figura 16A-B muestra resultados representativos del método CL/EM de la cuantificación de glicina. El trazado superior de la Figura 16A es la CIT (corriente iónica total) del material compuesto obtenida para glicina, prolina, fenilalanina, lisina y leucina, cada una a 78,125 pM en la columna. El trazado medio es el cromatograma de la CIT extraído para glicina. El trazado del fondo es el obtenido por longitud de onda del material compuesto controlado por MFD (Matriz de fotodiodos). La Figura 16B muestra la curva patrón obtenida para glicina cuando el área bajo el pico de la CIT extraída para glicina se utiliza para construir la curva de calibración. Se usaron inyecciones por triplicado en cada nivel de calibración para construir la curva de calibración.

La Figura 17 muestra un proceso (Marcador de afinidad codificado por isótopos).

La Figura 18 muestra la respuesta a la dosis del peso de rata hembra inmadura para glicina.

La Figura 19 muestra la respuesta a la dosis de la longitud de rata hembra inmadura para glicina.

La Figura 20 muestra la respuesta a la dosis del peso de rata macho inmadura para glicina.

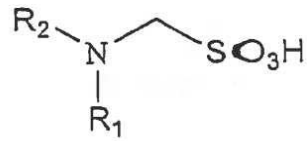
La Figura 21 muestra la respuesta a la dosis de la longitud de rata macho inmadura para glicina.

Se ha descubierto que un aminoácido común, la glicina, que cuando se añade a la dieta de animales de laboratorio presenta el efecto de producir una pérdida de peso dependiente de la dosis. El efecto se ha observado en una serie de cepas de roedores y en perros. En dosis óptimas, y por supuesto en dosis superóptimas, no se observaron efectos secundarios perjudiciales durante la administración prolongada. La glicina es un aminoácido no esencial sintetizado por la mayoría de los mamíferos a partir de serina que surge de la ruta glucolítica como parte del metabolismo intermediario normal. Es un compuesto que se ha estudiado extensamente en sus formas original y derivada con respecto a su responsabilidad en el origen y posible tratamiento de varios trastornos mentales, en particular la esquizofrenia (véase, por ej., Waziri y Baruah, *A hyperglycineric rat model for the pathogenesis of schizophrenia: preliminary findings*. *Schizophr Res*, 1999. 37 (3): 205-15; Waziri, *Glycine therapy of schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 1988. 23 (2): 210-1; Waziri, *Glycine therapy of schizophrenic: some caveats*. *Biol Psychiatry*, 1996. 39 (3): 155-6; Javitt, *Glycine therapy of schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 1996. 40 (7): 684-6; Javitt, *Glycine modulators in schizophrenia*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002. 3 (7): 1067-72; Shoham et al., *Chronic high-dose glycine nutrition: effects on rat brain cell morphology*. *Biol Psychiatry*, 2001. 49 (10): 876-85; Javitt, *Management of negative symptoms of schizophrenia*. *Curr Psychiatry Rep*, 2001. 3 (5): 413-7; Shoham et al., *High dose glycine nutrition affects glial cell morphology in rat hippocampus and cerebellum*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1999. 2 (1): 35-40; Shoham, et al., *Glycine and D-cycloserine attenuate vacuous chewing movements in a rat model of tardive dyskinesia*. *Brain Res*, 2004. 1004: (1-2). 142-7; Tuominen et al., *Glutamatergic drugs or schizophrenia: a systematic review and meta-analysis*. *Schizophr Res*, 2005. 72 (2-3): 225-34). En varios de estos informes, se observa que un efecto de la administración de glicina presenta un impacto pequeño pero significativo sobre el peso de animales o individuos de ensayo, pero esta observación nunca llegó a ser objeto de especulación o análisis adicional. Esto es probablemente debido a que los efectos observados fueron relativamente pequeños, sin duda debido al hecho de que las concentraciones y los tiempos de exposición a glicina utilizados en estos estudios fueron normalmente menores que los que se encontró que se requerían para inducir una pérdida de peso significativa o drástica. Petzke et al. (1987) indicaron que la glicina presenta un efecto termogénico relativamente alto cuando se compara con otros aminoácidos, azúcares y grasas, que se correlaciona con la absorción de oxígeno aumentada. Petzke y Albrecht, [The effect of nutrition on the metabolism of glycine]. *Nahrung*, 1987. 31 (2): 157-72; Petzke et al., *Utilization of [1-14C] carbon of glycine of high glycine diet fed young and old rats*, *Zfa*, 1987. 42 (6): pág. 323-8; Petzke et al., *the effect of oral administration of glycine on metabolism*. *Nahrung*, 1987. 31 (3): pág., 207-15. Su grupo observó una reducción dependiente de la dosis en el crecimiento de ratas experimentales, pero no pudo proporcionar una base bioquímica para el posible mecanismo. Además de reproducir su hallazgo, como se describe a continuación, se ha demostrado que los animales adultos muestran una pérdida de peso dependiente de la dosis con el enriquecimiento en glicina de sus dietas. La glicina o análogos de glicina pueden usarse para combatir la obesidad sin efectos secundarios adversos observables. Adicionalmente, la glicina actúa para inducir la apoptosis específicamente en células adiposas, probablemente usando una ruta no reconocida hasta ahora.

Glicina y análogos de glicina

La glicina es un aminoácido no tóxico, fácilmente disponible. Puede usarse glicina, análogos de glicina o una combinación de los mismos. Puede usarse cualquier análogo de glicina que induzca la apoptosis, directamente o indirectamente, en células adiposas, tales como las células adiposas blancas. Un análogo de glicina puede

comprender la Fórmula I.



5

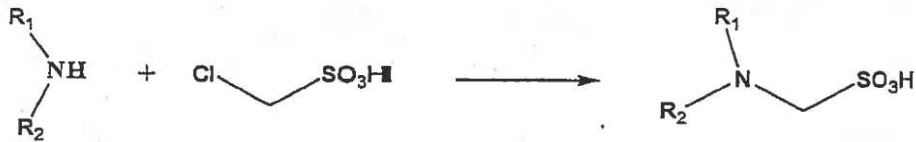
Fórmula I

Por ejemplo, en la Fórmula I:

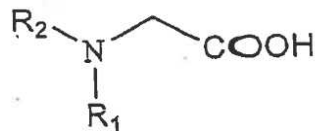
- 10 R1 y/o R2 pueden ser un H;
 R1 y/o R2 pueden ser un Me, Et o Pr;
 R1 y/o R2 pueden ser un Bn;
 R1 y/o R2 pueden ser un (CH₂)₂₋₅;

La Fórmula I puede sintetizarse por, por ejemplo, el siguiente esquema:

15



Otros análogos de glicina pueden comprender la Fórmula II:



20

Fórmula II

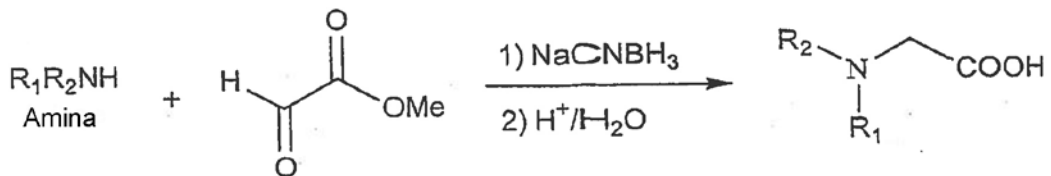
Por ejemplo, en la Fórmula II:

25

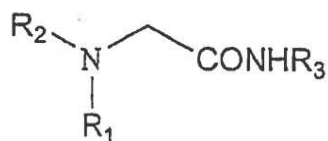
- R1 y/o R2 pueden ser un H;
 R1 y/o R2 pueden ser un Me, Et o Pr;
 R1 y/o R2 pueden ser un Bn;
 R1 y/o R2 pueden ser un (CH₂)₂₋₅;

30

La Fórmula II puede sintetizarse por, por ejemplo, el siguiente esquema:



35 Los análogos de glicina pueden comprender la Fórmula III:

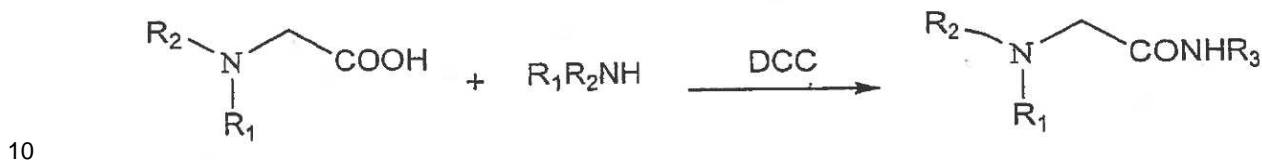


Fórmula III

En la Fórmula III:

- R1 y/o R2 pueden ser H y R3 puede ser H, Me, Et, Pr o Bn;
- R1 y/o R2 pueden ser Me, Et o Pr y R3 puede ser Me, Et, Pr o Bn;
- 5 R1 puede ser H; R2 puede ser Bn o Me y R3 puede ser Me, Et, Pr o Bn;
- R1 y/o R2 pueden ser (CH₂)₂₋₅ o Me, R3 puede ser Me, Et, Pr o Bn.

La Fórmula III puede sintetizarse por, por ejemplo, el siguiente esquema:



Dieta de alto contenido en glicina

15 Una "dieta de alto contenido en glicina" es una dieta rica en glicina, un análogo o análogos de glicina o combinaciones de los mismos o altas dosis de complementos de glicina, complementos de análogo de glicina o combinaciones de los mismos. Los análogos de glicina o análogos de glicina combinados con glicina producen un efecto fisiológico casi igual al que se obtiene cuando se administra una dieta que comprende solamente glicina. Es decir, los análogos de glicina o la asociación de glicina y análogos de glicina producen una concentración fisiológica de glicina en el animal que es casi la misma que la concentración fisiológica de glicina en el animal cuando se administra glicina al animal en una dieta de alto contenido en glicina. En algunos casos se pueden administrar análogos de glicina o análogos de glicina en asociación con glicina en un porcentaje menor que glicina sola para conseguir un efecto similar a cuando se usa glicina sola. Por ejemplo, pueden administrarse análogos de glicina o análogos de glicina en asociación con glicina en una dieta a aproximadamente el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, por ciento o más en peso.

25 La glicina y los análogos de glicina pueden mezclarse en la dieta o administrarse por otras vías. Los complementos pueden ser líquidos, semisólidos, sólidos o cualquier otra forma. Una dieta de alto contenido en glicina comprende aproximadamente el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40 % o más en peso de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos. Una dieta de alto contenido en glicina puede comprender de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 % o más, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 %; de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 %; de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 25 % de glicina o análogos de glicina o combinaciones de los mismos.

35 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 % o más, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 %; de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 %; de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % o de aproximadamente el 20 % al 25 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos (es decir, aproximadamente el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40 % o más en peso de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos) y de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 95 % (es decir, aproximadamente el 95, el 90, el 89, el 88, el 87, el 86, el 85, el 84, el 83, el 82, el 81, el 80, el 75, el 70, el 65 o el 60 %) de una dieta que es baja en calorías.

45 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 % o más; de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o más; de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 %; de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % o de aproximadamente el 20 % al 25 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos, (es decir, aproximadamente el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40 % o más en peso de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos) y de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 95 % (es decir, aproximadamente el 95, el 90, el 89, el 88, el 87, el 86, el 85, el 84, el 83, el 82, el 81, el 80, el 75, el 70, el 65 o el 60 %) de una dieta que es baja en grasa. La dieta baja en grasa puede ser una dieta baja en grasa saturada.

55 En el presente documento se describe una composición de dieta para la reducción de peso en un animal que comprende de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 % o más; del 10 % a aproximadamente el 40 % o más; de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 %; de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % o de aproximadamente el 20 % al 25 % de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos (es decir, aproximadamente el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40 % o más en peso de glicina, análogos de glicina o combinaciones de los mismos) y de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 95 % (es decir, aproximadamente el 95, el 90, el 89, el 88, el 87, el 86, el 85, el 84, el 83, el 82, el 81, el 80, el 75, el 70, el 65 o el 60 %) de una dieta que es baja en grasa.

86, el 85, el 84, el 83, el 82, el 81, el 80, el 75, el 70, el 65 o el 60 %) de una dieta que es baja en hidratos de carbono.

Métodos

5 La administración de una dieta de alto contenido en glicina a un animal macho o hembra, tal como un ser humano, puede inducir la apoptosis en el tejido adiposo, en particular, el tejido adiposo blanco del animal. Por tanto, la dieta de alto contenido en glicina puede reducir el tejido adiposo o reducir el tamaño de la célula adiposa o ambos en el animal. Los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar una dieta de alto contenido en glicina a un animal para inducir la apoptosis en el tejido adiposo, reducir el tejido adiposo, reducir el tamaño de la célula adiposa o combinaciones de los mismos en el animal.

15 Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que la inducción de la apoptosis en el tejido adiposo es producida por el efecto directo o indirecto de la glicina. Este mecanismo de acción está respaldado por los efectos observados que una dieta de este tipo presenta sobre BAD, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2. La capacidad de BAD para promover la muerte celular es inhibida por la fosforilación en la posición 136. La administración de una dieta de alto contenido en glicina reduce o elimina la fosforilación de BAD en la posición 136 en el tejido adiposo, lo que indica que la pérdida de tejido adiposo observada cuando se administra una dieta de alto contenido en glicina o su equivalente tiene lugar por inducción de la apoptosis.

20 La administración de una alta concentración de glicina en la dieta (es decir, por vía oral) o por otros medios de administración puede reducir el contenido de grasa abdominal en un animal. Adicionalmente, la administración de glicina en la dieta o por otros medios de administración a un animal puede producir la pérdida de peso en el animal. Sin embargo, en la administración inicial de una dieta complementada con glicina, puede observarse una ganancia de peso. Sin desear desea quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que esta observación puede ser un resultado de la pérdida de tejido graso y la ganancia de tejido muscular.

30 Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para producir animales de tamaño reducido y/o de peso reducido. Por ejemplo, animales que son aproximadamente un 3 %, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 % o un 75 % más pequeños que los animales de tamaño normal o aproximadamente un 3 %, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 % o un 75 % más ligeros que los animales de peso normal. Un animal de tamaño normal o de peso normal es un animal que se encuentra dentro de un promedio o intervalo de peso o tamaño típico para la especie animal donde se considera la edad y el estado de salud general.

35 Se describen en el presente documento métodos para producir animales de tamaño reducido o de peso reducido o tanto de tamaño reducido como de peso reducido, que comprenden administrar al animal una dieta de alto contenido en glicina. Para animales de tamaño reducido, se alimenta una dieta de alto contenido en glicina a animales inmaduros. La dieta de alto contenido en glicina puede administrarse diariamente. El animal puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, una rata, un ratón, un conejo, una cobaya, un bóvido, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un caballo, un pájaro o un pez.

45 Se describen en el presente documento métodos para producir un animal de tamaño reducido como se describió anteriormente seguido por devolver al animal a un tamaño normal. Los métodos comprenden administrar una dieta de alto contenido en glicina a un animal inmaduro para producir un animal de tamaño reducido y después administrar una dieta normal al animal para producir un animal de tamaño normal. Una dieta normal es una dieta que no está complementada con glicina, pero contiene cantidades normales de glicina.

50 Se describen en el presente documento métodos para producir un animal de peso reducido y después devolver al animal a un peso normal, que comprenden administrar una dieta de alto contenido en glicina al animal maduro o inmaduro para producir un animal de peso reducido y después administrar una dieta normal al animal para producir un animal de peso normal.

55 En el presente documento se describe un método para producir un animal de tamaño reducido permanentemente y/o de peso reducido por la administración de una dieta de alto contenido en glicina a un animal inmaduro para producir un animal de tamaño reducido permanentemente o de peso reducido. La administración de una dieta de alto contenido en glicina puede ser continuada durante toda la vida del animal o hasta que se previene más crecimiento por los procesos fisiológicos que normalmente se asocian al cese del crecimiento.

60 Los métodos y las composiciones, descritos en el presente documento, también pueden usarse para producir pérdida de peso en un animal tal como un animal inmaduro o maduro. Puede conseguirse una pérdida de peso de aproximadamente el 3 %, el 5 %, el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 % o el 75 %.

65 En el presente documento se describe un método para producir pérdida de peso en un animal que comprende administrar al animal una dieta de alto contenido en glicina como se describió anteriormente. El animal puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, una rata, un ratón, un conejo, una cobaya, un bóvido, un cerdo,

una oveja, una cabra, un perro, un gato, un caballo, un pájaro, un pez o un invertebrado, en una realización de la invención, el animal está sano y no experimenta problemas o cuestiones de salud. En otra realización de la invención el animal solamente presenta un problema de salud de sobrepeso u obesidad y ningún otro problema o cuestión de salud.

5 Puede administrarse una dieta de alto contenido en glicina con una terapia de pérdida de peso complementaria tal como un régimen de ejercicio, una dieta baja en grasa, una dieta baja en calorías, una dieta baja en hidratos de carbono, una intervención quirúrgica tal como la gastroplastia, la partición gástrica y el bypass gástrico, terapia conductual, farmacoterapia (por ej., uso de sibutramina, MERIDIA® (HCl monohidratado de sibutramina), XENICAL®
10 (orlistat) y combinaciones de los mismos), agentes auxiliares dietéticos naturales o productos para perder peso de venta libre (DVL) y combinaciones de los mismos.

Una dieta baja en grasa es una dieta que comprende aproximadamente el 3 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 % o el 80 % menos de grasa que la cantidad de grasa recomendada normal en una dieta para una determinada especie de una determinada edad, peso y estado de salud general.

15 Por ejemplo, una dieta baja en grasa en seres humanos puede comprender una dieta que consista en aproximadamente el 0 %, el 3 %, el 5 %, el 7 %, el 10 %, el 13 %, el 15 %, el 20 % o el 25 % de grasa.

20 Una dieta baja en calorías es una dieta que comprende aproximadamente el 3 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 % o el 80 % menos de calorías que la cantidad recomendada normal de calorías para una cierta especie de una determinada edad, peso y estado de salud general.

25 Una dieta baja en hidratos de carbono es una dieta que comprende aproximadamente el 3 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 % o el 80 % menos de hidratos de carbono que la cantidad recomendada normal de calorías para una cierta especie de una determinada edad, peso y estado de salud general.

30 La terapia conductual incluye estrategias que ayudan a superar barreras para el cumplimiento del tratamiento dietético y/o el tratamiento con ejercicio. Dichas estrategias incluyen, por ejemplo, autocontrolar los hábitos alimenticios y el ejercicio, gestión del estrés, control de estímulos, resolución de problemas (por ejemplo, autocorrecciones de áreas problemáticas relacionadas con la alimentación y el ejercicio), gestión de la contingencia (por ejemplo, uso de recompensas para acciones deseables específicas, reestructuración cognitiva (por ejemplo, modificación de objetivos no realistas y creencias erróneas) y soporte social.

35 Puede administrarse glicina y análogos de glicina, por ejemplo, por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral, por inhalación o pulverización o por vía rectal usando formulaciones que contengan excipientes, adyuvantes y/o vehículos, farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, convencionales. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular (por ej., intravenosa), intramuscular o intratecal y similares. Además, pueden combinarse glicina y análogos de glicina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden estar presentes glicina y análogos de glicina en asociación con uno o más vehículos, excipientes, agentes colorantes, agentes conservantes, agentes aromatizantes, diluyentes, adyuvantes o combinaciones de los mismos, farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, y si se desea otros principios activos. La glicina y los análogos de glicina pueden estar en cualquier forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires.

50 En el presente documento se describe un método para inducir la apoptosis en un adipocito blanco, in vivo o in vitro, que comprende administrar uno o más análogos de glicina o una combinación de glicina y análogos de glicina al adipocito.

55 En el presente documento se describe un método para reducir la fosforilación de BAD en la posición 136 del aminoácido en un adipocito blanco, *in vivo* o *in vitro*, que comprende administrar uno o más análogos de glicina o una combinación de glicina y análogos de glicina al adipocito.

Puede añadirse glicina a un adipocito en una concentración de aproximadamente 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/ml o más.

60 Los siguientes ejemplos ilustran aspectos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

65 Se dividieron ratas de manera aleatoria, se enjaularon por separado y se alimentaron con agua a voluntad y dieta TD 80406 (Harlan Teklad, Madison, Wisconsin). La composición de dieta se muestra en la Tabla 1. La dieta TD 80406

tiene aproximadamente un 1-2 % de glicina presente en el componente de lactalbúmina y se considera una dieta no complementada.

Tabla 1

Dieta TD 80406	
	g/kg
Lactalbúmina (Productos lácteos de Nueva Zelanda)	200,0
Almidón de maíz	620,0
Azúcar glass	50,0
Aceite de semilla de algodón	30,0
Celulosa	60,0
Mezcla de minerales, MIT 200 (Teklad TD 70191)	30,0
Mezcla de vitaminas, (Teklad 40060)	10,0

5 Se asignaron de manera aleatoria ratas Fisher macho, adultas (de 180 días), en grupos de tratamiento de 10 ratas en cada grupo a dietas que comprenden el 5 % o el 20 % de glicina en su pienso o a una dieta no complementada. Véase la Figura 1. Se obtuvieron mediciones del peso de los animales y el alimento en el día indicado del estudio. Al analista que realizaba la medición del peso se le ocultó la dieta del animal para el que se estaba registrando la observación. Las barras representan un error típico de ± 1 de los pesos de las ratas en cada grupo en el día de observación indicado. Las ratas alimentadas con una dieta al 20 % en glicina fueron estadísticamente más ligeras que las ratas alimentadas con una dieta al 5 % en glicina o una dieta que no estaba complementada con glicina durante el periodo de 14-30 días del tratamiento. Una vez que las ratas alimentadas con una dieta al 20 % en glicina se devolvieron a una dieta no complementada el día 30, ganaron rápidamente peso y sus pesos llegaron a ser similares a los de las ratas alimentadas con una dieta no complementada. No hubo diferencia estadística entre los pesos de los animales del control y el grupo con 20 % de glicina después del día 32 de los estudios.

20 Se eligieron cinco ratas de cada grupo de tratamiento al azar y se sacrificaron el día 30 del estudio. Se obtuvieron mediciones del contenido en grasa abdominal de cada rata en la necropsia (Figura 2). Al analista que realizaba la medición del se le ocultó el grupo de tratamiento del animal para el que se estaba registrando la observación. Se analizaron los datos usando un análisis de la varianza de una vía y se sometieron a análisis *post-hoc* usando el ensayo de comparación múltiple de Dunnett. Las ratas alimentadas con dieta al 20 % en glicina presentaron menos grasa abdominal estadísticamente significativa que aquéllas que fueron alimentadas con una dieta al 5 % en glicina o una dieta no complementada.

25 Se realizó el experimento idéntico con ratas Fisher adultas, hembra (de 180 días). Los resultados obtenidos fueron en general similares excepto porque el efecto de la glicina fue en realidad algo más pronunciado en las hembras que en los machos, con respecto tanto a la pérdida de peso como al contenido en grasa abdominal (Figura 3 y Figura 4). Se observó que el peso de las ratas hembra tratadas no se recuperaba al nivel de los animales de control al final de la Fase de recuperación y que la reducción observada en grasa abdominal fue mayor que la observada para el macho. No se observaron diferencias significativas entre grupos en las cantidades de alimento o agua consumidas durante el desarrollo del experimento.

35 Se obtuvieron mediciones del consumo de alimento en los días indicados de estudio. Véase la Figura 5. Estos datos indican que la pérdida de peso observada no es un resultado de la restricción calórica debido a la ingesta reducida de alimento. Adicionalmente, la reducción de peso observada no es un resultado del contenido calórico reducido del alimento ya que las dietas se analizaron mediante calorimetría de bomba (véase la Tabla 2) y se demostró que no eran significativamente diferentes en contenido calórico.

40 Tabla 2: Contenido calórico de la dieta TD 80406 (Harlan Teklad, Madison, Wisconsin) complementada con la cantidad indicada de glicina.

ID de la Muestra	Resultados (cal/g)
Dieta de Control Harlan TD 80406 Complemento de glicina del 0 %	4189,7
Dieta de Control Harlan TD 80406 Complemento de glicina del 5 %	2987,8
Dieta de Control Harlan TD 80406 Complemento de glicina del 10 %	4094,3
Dieta de Control Harlan TD 80406 Complemento de glicina del 15 %	3716,9
Dieta de Control Harlan TD 80406 Complemento de glicina del 20 %	3859,5

Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola de las ratas en estudio y se enviaron a los Laboratorios Charles River para someter a ensayo el perfil de múltiples analitos. Los resultados de estos ensayos indicaron que las ratas con una dieta de alto contenido en glicina presentaban una reducción estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en sus niveles en suero de triglicéridos, HDL y colesterol. Estos resultados se corresponden con los resultados en la bibliografía de otros que realizan investigación con glicina. Véase, Hafidi et al., *Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 287 (6): R1387-93; Aust et al., *The hypolipaeamic action of a glycine rich diet in rats*. *Nahrung*, 1980. 24 (7): 663-71; Sugiyama et al., *Dietary sulfur-containing amino acids and glycine as determinant factors in plasma cholesterol regulation in growing rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*, 1985. 31 (1): 121-5; Senthilkumar et al., *Glycine modulates hepatic lipid accumulation in alcohol-induced liver injury*. *Pol J Pharmacol*, 2003. 55 (4): 603-11; Park et al., *Dietary taurine or glycine Supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a cholesterol-free diet*. *Nutrition Research*, 1999. 19 (12), 1777-1789; Toshida et al., *Effect of addition of arginine, cystine, and glycine to the bovine milk-simulated amino acid mixture on the level of plasma and liver cholesterol in rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*, 1988. 34 (6): 567-76; Olson et al., *Effect of amino acid diets upon serum lipids in man*. *Am J Clin Nutr*, 1970. 23 (12): 1614-25; Ryzhenkov et al., *[Hypolipidemic activity of glycine and its derivatives]*. *Vopr Med Khim*, 1984. 30 (2): 78-80; Yagasaki et al., *Effects of dietary methionine, cystine and glycine on endogenous hypercholesterolemia in hepatomabearing rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*, 1986. 32 (6): 643-51; Emi et al., *Missense mutation (Gly—Glu188) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency*. *J Biol Chem*, 1990. 265 (10): 5910-6. Se observó una disminución de los niveles de leptina, que tendía a ser significativa, como se esperaría cuando disminuye el tejido adiposo blanco (TAB). Se observó que los niveles de adiponectina aumentaban en una manera que tendía a ser significativa como se esperaría cuando está disminuyendo el TAB. Los datos demostraron que una dieta de alto contenido en glicina daba como resultado un efecto positivo sobre estos biomarcadores de la patogenia de la obesidad.

25 Ejemplo 2

Se asignaron de manera aleatoria ratas obesas diabéticas Zucker (ODZ), macho, adultas, en grupos de tratamiento de 3 ratas en cada grupo, a dietas que comprendían un 20 % de glicina en su pienso o a una dieta no complementada. Las ratas ODZ eran obesas, hiperlipidémicas y resistentes a insulina. Se obtuvieron mediciones del peso en el día indicado del estudio. Véase la Figura 6. Al analista que realizaba la medición del peso se le ocultó la dieta del animal para el que se estaba registrando la observación. Las barras representan un error típico de ± 1 de los pesos de las ratas en cada grupo en el día de observación indicado. Se analizaron los datos usando un análisis de la varianza de una vía y se sometieron a análisis *post-hoc* usando el ensayo de comparación múltiple de Dunnett. Las ratas alimentadas con dieta al 20 % en glicina presentaron una disminución estadísticamente significativa en el peso desde el día 15 al día 36 del estudio con respecto a las ratas alimentadas con una dieta no complementada. De nuevo, no se observó diferencia entre los grupos en el consumo de alimento. Se obtuvieron mediciones del contenido en grasa abdominal de cada rata en la necropsia (Figura 7). Las ratas alimentadas con dieta al 20 % en glicina presentaron menos grasa abdominal de forma estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) que las que fueron alimentadas con una dieta al 5 % en glicina o una dieta no complementada.

40

Ejemplo 3

Se asignaron de manera aleatoria ratas Sprague-Dawley, hembra, adultas, en grupos de tratamiento de 3 ratas en cada grupo, a dietas que comprendían el 5, el 10, el 15 o el 20 % de glicina en su pienso o a una dieta no complementada. Véase la Figura 8. Se obtuvieron mediciones del peso en el día indicado del estudio. Al analista que realizaba la medición del peso se le ocultó la dieta del animal para el que se estaba registrando la observación. Las barras representan un error típico de ± 1 de los pesos de las ratas en cada grupo en el día de observación indicado. Los pesos de las ratas alimentadas con una dieta al 20 % en glicina fueron menores que los de las ratas alimentadas con una dieta no complementada. Se analizaron los datos usando un análisis de la varianza de una vía y se sometieron a análisis *post-hoc* usando el ensayo de comparación múltiple de Dunnett. Las ratas alimentadas con dieta al 20 % en glicina presentaron una disminución estadísticamente significativa en el peso desde el día 15 al día 36 del estudio con respecto a las ratas alimentadas con una dieta no complementada.

55 Ejemplo 4

Se asignaron de manera aleatoria ratas Sprague-Dawley, hembra, adultas, en grupos de tratamiento de 3 ratas en cada grupo, a dietas que comprendían el 5, el 10, el 15 o el 20 % de glicina en su pienso o a una dieta no complementada. Véase la Figura 9. Se obtuvieron mediciones del consumo de alimento en los días indicados del estudio. Al analista que realizaba la medición se le ocultó la dieta del animal para el que se estaba registrando la observación. Estos datos indican que la pérdida de peso observada no es un resultado de la restricción calórica debido a una ingesta de alimento reducida. Adicionalmente, la reducción de peso observada no es un resultado de un contenido calórico reducido del alimento ya que las dietas se analizaron por calorimetría de bomba (Véase la Tabla 2) y se demostró que no eran significativamente diferentes en contenido calórico.

65

Ejemplo 5

Se asignaron de manera aleatoria ratas Sprague-Dawley, hembra, adultas, en grupos de tratamiento de 3 ratas en cada grupo, a dietas que comprendían el 5, el 10, el 15 o el 20 % de glicina en su pienso o a una dieta no complementada. Se sacrificaron las ratas en cada grupo de tratamiento el día 30 del estudio. Las mediciones del contenido en grasa abdominal de cada rata se obtuvieron en la necropsia. Véase la Figura 10. Al analista que realizaba la medición se le ocultó el grupo de tratamiento del animal para el que se estaba registrando la observación. Se analizaron los datos usando un análisis de la varianza de una vía y se sometieron a análisis *post-hoc* usando el ensayo de comparación múltiple de Dunnett. Las ratas alimentadas con una dieta que contenía las cantidades indicadas de glicina del 5 % al 20 % presentaron menos grasa abdominal estadísticamente significativa que las que fueron alimentadas con una dieta no complementada.

Ejemplo 6

Se alimentaron ratas Sprague-Dawley, de 24 días, con una dieta al 15 % en glicina y al 85 % en TD80406. No se notificaron lesiones o anomalías globales relacionadas con el tratamiento, distintas del peso, en la necropsia de los animales alimentados con la dieta que contenía el 15 % de glicina y el 85 % de TD80406 durante 6 semanas. No se observaron diferencias en la química de la sangre y los recuentos sanguíneos completos entre los animales de control alimentados con el 100 % de TD80406 y los animales alimentados con una dieta que contenía el 15 % de glicina y el 85 % de TD80406 durante 6 semanas. Se realizó el examen histopatológico de los tejidos recogidos de un animal alimentado con una dieta complementada con alto contenido en glicina. Un examen microscópico de tejidos cortados, tratados, embebidos, cortados con microtomo y teñidos con hematoxilina y eosina no revelaron resultados destacables para el cerebro, pulmón, hígado, glándula adrenal, riñones, vejiga urinaria, corazón, estómago, intestino grueso o intestino delgado. En resumen, no hubo cambios microscópicos de la histología normal.

Ejemplo 7

Se asignaron de manera aleatoria ratas Sprague-Dawley, macho, adultas, en grupos de tratamiento de 3 ratas en cada grupo, a dietas que comprendían el 5 % o el 20 % de glicina en su pienso o una dieta no complementada. Se sacrificaron los animales el día 20 del estudio y se obtuvo el tejido adiposo en la necropsia. Se extrajeron las proteínas totales del tejido adiposo. Para demostrar que el tejido adiposo procedente de las ratas alimentadas con una dieta de alto contenido en glicina experimentaba apoptosis, se sometió a ensayo en los extractos de animales alimentados con dietas de control o con dietas conteniendo glicina la capacidad para fosforilar BAD en la posición 136. Como se observa en la Figura 11A y 11B, los datos demostraron claramente una disminución dependiente de la dosis en la fosforilación de BAD en la tirosina 136 en (TAB), al tiempo que no se observó dicha disminución en el tejido adiposo pardo (TAP), lo que indica que una dieta de alto contenido en glicina conduce a la apoptosis en tejido adiposo blanco. La Figura 12 y la Figura 13 demuestran claramente que no se observó dicha disminución en el estado de fosforilación de BAD en la tirosina 136 cuando se sometieron a ensayo extractos de tejido hepático (Figura 12) o muscular (Figura 13) del mismo animal.

Los datos demostraron claramente una disminución dependiente de la dosis de la fosforilación de BAD en la tirosina 136, lo que indica que una dieta de alto contenido en glicina conduce a la apoptosis en tejido adiposo.

El ensayo sobre los extractos de tejido de la capacidad para fosforilar BAD en la posición 136 de serina se realizó como se indica a continuación: Se añadió un mg de extracto de tejido a agarosa BAD (Upstate, Waltham, MA). Se ajustó el volumen de reacción a 1 ml usando tampón RIPA (con anti-fosfatasa y anti-proteasas) (Tris-HCl [pH 7,4] 50 mM; NP-40 al 1 %; desoxicolato de Na al 0,25 %; NaCl 150 mM; AEDT 1 mM; PMSF 1 mM; Detención de proteasa 100 μ l; ortovanadato de sodio 1 mM; fluoruro de sodio 1 mM) y se incubó durante 0,5 h a 30 °C. Se recogieron las perlas de agarosa por centrifugación (5 s a 12.000 x g). Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las perlas 3 veces con TBS enfriado con hielo. Se volvió a suspender la BAD-agarosa en 40 μ l de tampón de muestra, se hirvió durante 5 min y se centrifugó (5 min a 12.000 x g). Se sometieron a electroforesis siete microlitros de muestra en un gel al 15 % (Tris-Glicina). Se transfirió la proteína por transferencia western a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con NFM al 5 % en TTBS a 4 °C con agitación. Se lavó la membrana con NFM al 2 % en TTBS. Se manchó cada calle con anticuerpo anti-fosfo-BAD 136 de conejo a (1:1000 en NFM/TTBS al 2 %) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las manchas tres veces durante 5 min con TTBS. Se incubaron las manchas con anti-Conejo-HRP de cabra (1:5000 en NFM/TTBS al 2 %). Se lavaron las manchas 3 veces durante 5 min con TTBS y 2 veces, 5 min, con TBS. La visualización de BAD fosforilada se realizó con un sustrato quimioluminiscente (Pierce Super-Signal Substrate™).

Con el fin de dilucidar además el mecanismo de acción por el cual la glicina provoca los efectos biológicos observados se usó Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE, por sus siglas en inglés). La 2D-DIGE es un poderoso método que permite la valoración rápida de diferencias de expresión en proteomas de tejidos de diferentes estados biológicos. Véase, Patton, *Detection technologies in proteome analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002. 771 (1-2): 3-31; Unlu et al., *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis*, 1997. 18 (11): 2071-7; Von Eggeling et al., *Fluorescent dual*

colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software. Int J Mol Med, 2001. 8 (4): 373-7.

5 Se obtuvieron resultados preliminares de dobles experimentos de marcaje de las proteínas extraídas de tejido
 obtenido de control (Figura 14) y tratado con glicina al 20 % (Figura 15) en la preparación para realizar futuros
 experimentos de 2D-DIGE. Las proteínas marcadas con fluoróforo Cy3 obtenidas del tejido adiposo de animales
 de control se presentan en la Figura 14. La Figura 15 presenta los resultados obtenidos con proteína obtenida marcada
 con fluoróforo Cy5 de tejido adiposo de animales tratados con un 20 % de glicina en la dieta. Los círculos de color
 amarillo indican la regulación negativa frente al control mientras que los círculos de color rojo indican la regulación
 10 positiva según se discierne por inspección visual.

Análisis 2D-DIGE de tejido adiposo de ratas Sprague-Dawley, hembras, alimentadas con una dieta de control o dieta
 complementada con glicina al 20 % en peso. Se homogeneizaron las muestras de tejido en hielo usando un
 homogeneizador PowerGen 125 Modelo FTH115 provisto de sondas generadoras reutilizables de minipunta 7X110 y
 15 se extrajeron las proteínas usando un kit de extracción de proteínas totales (EPT) (Genotech, 92-Weldon Parkway,
 San Louis, MO 63043-9989 EE.UU.) de acuerdo con el protocolo suministrado con el kit. Todos los tampones
 contenían cóctel de detención de proteasa (Genotech, 92-Weldon Parkway, San Luis, MO 63043-9989 EE.UU.) para
 minimizar la degradación de proteínas durante la extracción y almacenamiento previamente a su uso. Se
 precipitaron las proteínas extraídas usando el kit de limpieza Bio Rad 2D (N.º del catálogo 163-2130) y se volvieron a
 20 suspender en tampón de marcaje de Cy (Tris-HCl 30 mM pH 8,5, CHAPS al 4 %, urea 8 M). Se marcaron cantidades
 iguales de proteína (50 ug) obtenidas de los animales de control y animales tratados, cada una con 400 pmoles de
 fluoróforo Cy3 o Cy5 diluido en DMF según las especificaciones del fabricante. Se llevaron a cabo reacciones de
 marcaje en la oscuridad durante 30 min sobre hielo y se enfrió rápidamente por adición de lisina 1 mM. Las dos
 poblaciones de proteínas marcadas se mezclaron con anfolitos Biolyte (Bio Rad n.º del catálogo 163-1112) y tampón
 25 de rehidratación (Bio Rad cat. 163-2083). Después se cargó la mezcla sobre tiras GPI rehidratadas (Bio Rad n.º del
 catálogo 163-2099) durante la noche a temperatura ambiente. Se concentraron las proteínas en las tiras GPI
 rehidratadas en un aparato de Biorad Protean IEF Gel y se hizo funcionar en la segunda dimensión en un aparato de
 Bio Rad Protean Slab Gel de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La visualización de las proteínas
 marcadas con Cy3 y Cy5 en los geles se realizó usando una KODAK Image Station 2000MM usando filtros de
 30 excitación a 535 y 620 nm y emisión a 600 y 670 nm, respectivamente.

Ejemplo 8

Ensayo sensible para la medición precisa de la concentración de glicina en sangre y tejidos (adiposos)

35 El desarrollo de los modelos farmacocinético y farmacodinámico para glicina con respecto a la reducción de masa de
 tejido adiposo requerirá un método preciso para la medición de la concentración de la glicina administrada.
 Idealmente, el método será capaz de seguir la adsorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de la glicina
 administrada exclusiva de glicina endógena. Adicionalmente, el método desarrollado debería poder ser modificado
 40 fácilmente para aplicación a futuros estudios con los análogos de glicina. Puede usarse un método de CL/EM para
 este fin. Esta propuesta permite la utilización de Glicina-C₁₃ en estudios que permiten la determinación simultánea
 de la ADME de Glicina-C₁₃ y glicina endógena, dosificada.

En resumen, la metodología consiste en una etapa de limpieza de la muestra en la que se retiran contaminantes de
 45 proteínas y ácidos nucleicos por precipitación ácida previamente a análisis por CL/EM. Se preparan muestras CC
 previamente a la iniciación de cada estudio conteniendo cantidades conocidas de glicina/Glicina-C₁₃ en una matriz
 de muestra (es decir, plasma o extracto de tejido dializado de animales no tratados). La precipitación ácida de las
 muestras se realizará por la adición de 100 µl de ácido perclórico al 10 % (vol/vol) enfriado en hielo que contenía
 50 ácido metafosfórico al 1 % a 100 µl de una muestra de plasma en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, pardo, que
 se incubaba sobre hielo durante 10 min previamente a centrifugación a 12.000 X g durante 5 min a 4 °C. Se filtrará
 después el sobrenadante resultante por un filtro de 0,2 µm y se secará al vacío en un Savant SC110 Speedvac (o
 equivalente). El estudio y la muestra CC se almacenarán a -80 °C hasta que sean sometidos a análisis. Previamente
 al análisis, se calentarán las muestras a temperatura ambiente y se reconstituirán en 50 µl de agua de calidad
 55 CL/EM desionizada (CL/EM-ddH₂O) y se transferirán a viales autoinyectores de vidrio que se cargarán después en el
 autoinyector Micro AS (Thermo Electron). Se inyectarán veinte µl de cada muestra sobre una columna de 50 X 2,1
 mm Hypercarb™ (Thermo Electron Corporation) en un Sistema de HPLC Surveyor Plus (Thermo Electron Corp.)
 acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ XP (Thermo Electron Corp.) a través de
 una fuente de IEN (ionización por electrospray). La separación cromatográfica se conseguirá barriendo un
 60 gradiente de ácido perfluoropentanoico 20 mM en CL/EM-ddH₂O a 15 % de acetonitrilo en CL/EM-ddH₂O en 10 min,
 después a 26 % de acetonitrilo en CL/EM-ddH₂O en unos 10 min adicionales y después a un 50 % de acetonitrilo
 final en CL/EM-ddH₂O durante 10 min. Se mantendrán las condiciones al 50 % de acetonitrilo final y ácido
 perfluoropentanoico 20 mM en CL/EM-ddH₂O durante 10 min seguido de un retorno a 100 % de ácido
 perfluoropentanoico 20 mM en CL/EM-ddH₂O durante 5 min previamente a la siguiente inyección.

65 La Figura 16 muestra un cromatograma representativo y na curva patrón para su uso en la cuantificación de glicina.
 Los datos se obtuvieron usando un patrón conocido que contenía los 24 aminoácidos comunes cargados en la

columna y monitorización selectiva de iones (MSI) para glicina, prolina, fenilalanina, lisina y leucina. Los resultados indican claramente que la prueba presenta la sensibilidad requerida para el fin deseado en la investigación propuesta. La prueba puede perfeccionarse adicionalmente y puede validarse con Glicina-C₁₃.

5 Ejemplo 9

Perfil farmacocinético de una sola dosis y biodisponibilidad oral para glicina en alta dosis

Se puede usar el siguiente diseño experimental para determinar el perfil farmacocinético y la biodisponibilidad oral de la glicina. Se pueden usar ratas Sprague-Dawley, adultas (de 180 días), con catéteres en la vena yugular implantados quirúrgicamente y pesando entre 200-225 g de laboratorios Charles River. Se dividieron de manera aleatoria dieciocho ratas en 3 grupos de 6 ratas (3 machos, 3 hembras) y se asignaron al azar a cada uno de tres grupos de dosificación: Alta (5 mg/kg), Media (2,5 mg/kg) y Baja (0,25 mg/kg). El análisis preliminar de muestras de plasma obtenidas en la necropsia después de un ayuno de 24 h de ratas ODZ macho, alimentadas con una dieta que consistía en 20 % de glicina en peso indicó un nivel de 16,9 µg/ml de glicina. El nivel de estado estacionario real de la glicina se apreció probablemente mayor previamente a que los animales estuvieran en ayunas. Las dosis elegidas deberían dar como resultado niveles de plasma máximos de ~ 150 µg/ml, grupo de alta dosis, 75 µg/ml, grupo de dosis media y grupo de dosis baja de 7,5 µg/ml. La glicina se disolverá en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2 y se administrará primero por bolo IV. Se extraerán muestras de plasma (0,1 ml) en tubos vacutainer de parte superior azul claro conteniendo citrato (BD n.º 363080) en los siguientes instantes de tiempo T= 0 min, T= 0,5 min, T= 1 min, T= 5 min, T= 15 min, T= 30 min, T= 1 h, T= 2 h, T= 4 h, T= 8 h, T= 6 h, T= 24 h y T= 4 h. El plasma separado recogido en cada instante de tiempo se congelará ultrarrápido en nitrógeno líquido y se almacenará a -80 °C hasta que se haya analizado. Se permitirá que los animales se recuperen durante un periodo de siete días, se volverán a pesar y se tratarán después con dosis alta, media y baja de glicina por alimentación por sonda oral. Se extraerán muestras de plasma, 0,1 ml, como se describió previamente para la administración de bolo IV en un vacutainer con parte superior azul claro en los siguientes instantes de tiempo. T= 0 min, T= 30 min, T= 1 h, T= 2 h T= 4 h, T= 6 h, T= 8 h, T= 16 h, T= 24 h, T= 48 h, T= 72 h y T= 96 h. El plasma separado recogido en cada instante de tiempo se congelará ultrarrápido en nitrógeno líquido y se almacenará a -80 °C hasta que sea analizado. Se analizarán los datos usando el programa informático WinNonlin® versión 4.1 para análisis farmacocinético. El modelo farmacocinético resultante de estos experimentos se usará para diseñar los regímenes de dosificación múltiple que se tienen que usar en experimentos posteriores. Adicionalmente, este modelo servirá como un modelo de base para su uso en la selección de análogos para desarrollo adicional.

Ejemplo 10

Farmacocinética de dosis múltiple de glicina

En los estudios preliminares, se administró glicina por vía oral como parte de la dieta normal de los animales de ensayo. Este método de administración no proporcionó precisión y reproductibilidad de la dosificación necesaria para la construcción de un modelo farmacodinámico de acción de glicina con respecto a la inducción de la apoptosis en tejido adiposo. Para realizar este trabajo debemos desarrollar un régimen de dosificación que nos permitirá reflejar con precisión el efecto farmacológico observado (es decir, inducción de la apoptosis en tejido adiposo). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los estudios para definir el perfil farmacocinético de dosis única y la biodisponibilidad oral de glicina en alta dosis se usarán para diseñar regímenes de dosificación múltiple para glicina en alta dosis. El régimen que se desarrolla se usará para mantener la glicina en niveles en la sangre de los animales de ensayo a niveles iguales a $\pm 10\%$ de los observados en animales que se alimentaron con una dieta que consistía en el 20 %, el 10 % y el 5 % de glicina en peso en su dieta. Una descripción detallada del número de animales en cada grupo de dosificación y sincronización de las muestras se determinará basándose en los parámetros farmacocinéticos y la variabilidad de los parámetros establecidos a partir de los estudios previos de dosis única. Sin embargo, se prevé que el diseño del estudio requeriría menos de 10 animales (5 machos, 5 hembras) por grupo de dosificación para validar el régimen. Se usará la función simulación de WinNonlin® en el diseño del régimen de dosificación y para desarrollar los instantes de tiempo a los que muestrear para obtener los datos que se han de usar para validar el régimen.

El programa informático WinNonlin® proporciona una excelente serie de herramientas para utilizar la simulación en el diseño de pautas de dosificación múltiple y esquemas de muestreo para validar el plan de dosificación. Se usará GraphPad StatMate versión 2.00 para Windows para confirmar que el número de animales en cada grupo de dosificación sea el requerido para conseguir la potencia apropiada para demostrar validez estadística. El análisis estadístico se realizará usando GraphPad InStat versión 3.06 32 bit para Windows. Se considera que el régimen de dosificación es válido si se demuestra que los parámetros FC y los niveles de circulación de glicina en la sangre no difieren de una manera estadísticamente significativa de los obtenidos de forma experimental.

Se sacrificaron los animales de estudio y se realizaron necropsias al final del estudio. Se determinará el estado de fosforilación de BAD en ser-136 en el tejido adiposo por inmunoprecipitación y análisis por transferencia western con anticuerpo anti-BAD ser-136 o por análisis de CL/EM con captura por afinidad. Véase, Papac y Shahrokh, *Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. Pharm Res*, 2001. 18 (2): 131-45; Creaser et al.,

Immunoaffinity chromatography combined on-line with high-performance liquid chromatography – mass spectrometry for the determination of corticosteroids. J Chromatogr A, 1998. 794 (1-2): 37-43; Gallo et al., *Development of a liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramfenicol residues in milk after alfa-1-acid glycoprotein affinity chromatography. Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. 19 (4): 574-9. También se someterá al tejido adiposo a tinción inmunohistoquímica para la proteína TUNEL como un marcador de la apoptosis activa. Véase, Pavlovsky y Vagunda, [*Apoptosis-selected methods of detection of apoptosis and associated regulatory factors on tissue sections of tumors*]. *Cesk Patol*, 2003. 39 (1): pág. 6-10; Heatwole, V. M., *TUNEL assay for apoptotic cells. Methods Mol Biol*, 1999. 115: 141-8; Stadelmann y Lassmann, *Detection of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Res*, 2000. 301 (1): 19-31.

También se recogerán los órganos principales y se observará para detectar cualquier signo evidente de toxicidad y se conservarán para su análisis adicional si se encuentra cualquier signo evidente de toxicidad.

Ejemplo 11

Un FC/FD (modelo farmacocinético/farmacodinámico) vinculado para glicina con respecto a su capacidad para inducir la pérdida de peso por la inducción de la apoptosis en tejido adiposo

La farmacodinámica se refiere a la relación entre la concentración de fármaco en el sitio de acción y la respuesta farmacológica, incluyendo los efectos bioquímicos y fisiológicos que influyen en la interacción. Véase, Shargel y Yu, *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 4ª ed. 1999, Nueva York: McGraw-Hill. 573-605.

La forma del modelo farmacodinámico depende del mecanismo por el cual el fármaco impone su acción farmacológica. De este modo, la información obtenida en este modelo proporcionará información útil con respecto a cómo la glicina provoca su efecto biológico en el tejido adiposo. En los estudios preliminares para la investigación propuesta en esta solicitud de concesión actual se demostró que una dieta de alto contenido en glicina daba como resultado que BAD en la ser-136 estuviera en un estado desfosforilado. Se propone usar el estado de fosforilación de BAD en la ser-136 como un marcador de la apoptosis para el modelado farmacodinámico. Se construirá un modelo de vinculación FC/FD para la acción de glicina con respecto a su efecto en el estado de fosforilación de BAD. Un modelo de vinculación FC/FD asume parámetros farmacocinéticos fijados para modelar la concentración local del fármaco en el sitio de acción que se ha de usar por el modelo FD. Jusko, *Corticosteroid pharmacodynamics: models for a broad array of receptor-mediated pharmacologic effects. J Clin Pharmacol*, 1990. 30 (4): 303-10; Dayneka et al., *Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. J Pharmacokinetic Biopharm*, 1993. 21 (4): 457-78. Se usará el modelo farmacocinético procedente de los estudios de dosis única y dosis múltiple para suministrar los parámetros FC fijados para el modelo vinculado FC/FD. Se usará cultivo de órganos *ex vivo* de tejido adiposo blanco (TAB) para modelar la porción FD del modelo FC/FD vinculado. También se describen los métodos y procesos para establecer cultivos *ex vivo* de TAB. Véase, Moustaid-Moussa y Fried, *Culture of Adipose Tissue and Isolated Adipocytes, in Adipose Tissue Protocols*, G. Ailhaud, Editor, 2001, Humana Press, Inc.: Totowa, NJ. pág. 197-213; Livingston et al., *Insulin-dependent regulation of the insulin-sensitivity of adipocytes. Nature*, 1978. 273 (5661): 394-61; Bernstein, *Improved insulin responsiveness in rat adipose tissue pieces cultured with charcoal-treated albumin and oxygen. J Lipid Res*, 1982. 23 (2): 360-3; Bernstein, *Insulin insensitivity and altered glucose utilisation in cultured rat adipose tissue. J Lipid Res*, 1979. 20 (7): 848-56; Maloff et al., *Direct effects of growth, hormone on insulin action in rat adipose tissue maintained in vitro. Endocrinology*, 1980. 107 (2): 538-44. Se usarán cultivos de órganos de TAB en estos experimentos, a diferencia de adipocitos aislados, debido a que los cultivos de órganos reflejan más completamente la compleja biología de TAB dando como resultado un modelo FD de concentración frente al efecto que refleja más el estado *in vivo*. Papac y Shahrokh, *Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. Pharm Res*, 2001. 18 (2): 131-45.

En resumen, se obtendrá TAB a los 10 minutos del sacrificio por escisión quirúrgica de las capas de grasa retroperitoneales, inguinales y gonadales de cada una de las ratas Sprague-Dawley, 3 machos y 3 hembras, que pesan 200-225 g. Se obtendrán aproximadamente 12-15 g de TAB de cada animal. El TAB de los animales del mismo sexo se combinará y se picará grueso en tubos de centrifuga de plástico cónicos (3 g por tubo) que contienen M199 (Gibco-BRL; líquido, tamponado con bicarbonato, complementado con glutamina y HEPES 25 mM) a temperatura ambiente, estéril, y 50 µg/ml de gentamicina. Se realizará todo el tratamiento adicional del material de un modo aséptico en una campana de flujo laminar como se describe por Fried y Moustaid-Moussa (*Culture of Adipose Tissue and Isolated Adipocytes, in Adipose Tissue Protocols*, G. Ailhaud, Editor, 2001, Humana Press, Inc.: Totowa, NJ. pág. 197-213). El TA se picará más en fragmentos de 5-10 mg usando unas tijeras afiladas. Una vez que el tejido se pica finamente puede permanecer a TA durante hasta 1 hora (mientras se están picando los otros tubos de tejido). No se reemplazará el tejido a 37 °C, para evitar aumentar su velocidad metabólica en esta coyuntura. Los cultivos de órganos de TAB se lavarán después hasta quedar libres de gotitas de lípidos y sangre para verter el contenido de cada uno de los tubos a través de una malla de nailon (colocada en un embudo), que se colocará en la parte superior de un frasco de ~500 ml. Esto irá seguido de un lavado de al menos 300 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) a 37 °C, sobre el tejido en el embudo. Se colocará después el tejido lavado en una placa de Petri tarada, estéril, y se retirará todo coágulo de sangre grande con fórceps. La placa de Petri tarada, que contiene el cultivo de órganos de TAB se cerrará para mantener la esterilidad y se pesará después. Se colocará después el TAB igualmente (~ 0,5 g de peso húmedo/pocillo) en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos

usando fórceps o una cuchara perforada. Después se añadirá inmediatamente M199 (Gibco-BRL; líquido, tamponado con bicarbonato, complementado con glutamina y HEPES 25 mM) recién preparado y 50 µg/ml de gentamicina y se mantendrán los cultivos en una incubadora a 37 °C humidificada, en una atmósfera de CO₂ al 5 % - aire al 95 % durante 48 horas para asegurar la ausencia de contaminación y la esterilidad.

5 Los pocillos por triplicado que contienen cultivos de órganos de TAB procedentes de ratas Sprague-Dawley, machos y hembras, preparados como se describió anteriormente se lavarán 3 veces con M199 (Gibco-BRL; líquido, tamponado con bicarbonato, complementado con glutamina y HEPES 25 mM) recién preparado y 50 µg/ml de gentamicina. El experimento se iniciará por la adición de medio M199 recién preparado complementado con la
10 siguiente concentración de glicina. Los pocillos de control recibirán medio recién preparado sin glicina adicional añadida, los pocillos experimentales recibirán medio M199 complementado con glicina a cinco concentraciones igualmente espaciadas con la concentración más alta igual a dos veces el nivel de circulación de glicina en la sangre del grupo de dosis más alta del estudio FC de dosis múltiple. Se repondrá el medio sobre una dosis diaria durante un periodo de 3 días. Se recogerán después los cultivos y se lavarán 5 veces con PBS enfriada con hielo. Se
15 prepararán las muestras para cuantificación de glicina por el método de CL/EM, como se describió previamente.

Ejemplo 12

Ensayo bioquímico rápido para la detección sistemática de análogos bioactivos de glicina

20 La glicina dietética en altos niveles (20 % en peso) da como resultado una pérdida de peso significativa. Esta pérdida de peso puede ser un resultado de la capacidad de la glicina para inducir la apoptosis en TAB. Esto se basa en datos preliminares que demuestran que los extractos de proteínas obtenidos a partir de TAB de animales tratados no presentaban la capacidad para fosforilar BAD en la posición 136 de serina (Figuras 11, 12 y 13). Véase, Masters
25 et al., *14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. Mol Pharmacol*, 2001. 60 (6): 1325-31; Thompson y Thompson, *Putting the rap on akt. J Clin Oncol*, 2004. 22 (20): 4217-26.

Como se indicó previamente, otros han observado circunstancialmente que la glicina puede inducir la pérdida de peso. Sin embargo, el mecanismo por el que esto tiene lugar sigue sin explicarse. Se cree que la glicina presenta un
30 efecto bioquímico directo sobre el TAB por regulación del estado de fosforilación de BAD conduciendo a la inducción de la apoptosis. Esto se basa en las observaciones de los experimentos preliminares de que no se observaba dicha desfosforilación de BAD en la ser-136 en BAD o no tenía lugar una pérdida significativa de tejido de TAP. Además, se observó que altas concentraciones de glicina en el medio de células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos demostraban un aumento de la tinción para TUNEL cuando se comparaban con células no tratadas. Véase,
35 Heatwole, *TUNEL assay for apoptotic cells. Methods Mol Biol*, 1999. 115: 141-8. Un objeto de este ejemplo es desarrollar un bioensayo rápido que pueda usarse para identificar sistemáticamente análogos bioactivos de glicina.

Se ha descubierto que las ratas Sprague-Dawley, hembras, son particularmente sensibles a los efectos de alto contenido en glicina en la dieta, experimentando una rápida pérdida de peso significativa. De este modo, sería
40 posible usar una pérdida de peso significativa en ratas Sprague-Dawley, hembras, para identificar sistemáticamente la actividad de análogos de glicina. Sin embargo, esta prueba requiere mucho tiempo, requeriría la síntesis a gran escala de análogos y no sería eficaz para la identificación sistemática de grandes cantidades de compuestos. Se propone desarrollar un ensayo *in vitro* biológico, rápido, usando estirpes celulares 3T3-L1 diferenciadas y mediciones del estado de fosforilación de BAD en la ser-136. Gaillard et al., *Growth of preadipocyte cell lines and cell strains from rodents in serum-free hormone-supplemented medium. In Vitro*, 1984. 20 (2): 79-88.
45

Con el fin de que se use dicha prueba con confianza se debe demostrar que los adipocitos de células 3T3-L1 diferenciadas responden a altos niveles de glicina de una manera similar a los adipocitos *in vitro*. Los siguientes experimentos se destinan a demostrar la utilidad y validez del uso de la desfosforilación de BAD en la Ser 136 en
50 células 3T3-L1 diferenciadas para este fin.

Se obtendrán adipocitos de TAB por modificación del proceso de purificación descrito anteriormente para cultivo de órganos de TAB. En resumen, el TAB se aislará como se describió previamente y se someterá a las siguientes etapas adicionales para obtener adipocitos aislados y fracciones estromales-vasculares. Se obtendrán adipocitos
55 aislados y fracciones estromales sometiendo el TAB picado a digestión con colagenasa tipo I a una concentración de 1 mg/ml en medio M199 a 37 °C durante 60 min. Después se filtrará el tejido tratado con colagenasa por un filtro de nailon estéril (malla de 350 µm) en un tubo de centrifuga estéril. Se centrifugará esta suspensión a 500 X g durante 1 min dando como resultado la separación de la fracción estromal-vascular (sedimento) de la fracción que contiene adipocitos. Se lavarán las respectivas fracciones celulares tres veces adicionales en solución salina equilibrada de Hank. Después de contarán los respectivos adipocitos y fracciones estromales-vasculares, se diluirán con medio
60 M199 recién preparado y se cultivarán en los pocillos de placas de cultivo de seis pocillos. Se incubarán las células durante la noche en una incubadora a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % - aire al 95 %. Se observarán las células para asegurar la viabilidad y la falta de contaminación y se iniciará el experimento por la adición de medio M199 recién preparado complementado con las siguientes concentraciones crecientes de glicina en el medio. Los
65 pocillos de control recibirán medio recién preparado sin glicina adicional añadida, los pocillos experimentales recibirán medio M199 complementado con glicina en las mismas concentraciones de glicina usadas para los

experimentos FD. Se repondrá el medio diariamente durante un periodo de 3 días. Se recogerán después los cultivos y se lavarán 5 veces con PBS enfriado con hielo. Se lisarán las células por exposición a un tampón hipotónico, se aclararán por centrifugación y se congelarán instantáneamente alícuotas de lisado en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso. El contenido en glicina intracelular de las muestras se determinará por el método CL/EM. El estado de fosforilación de BAD en la Ser-136 se determinará usando un ELISA para BAD-Ser 136 o por análisis CL/EM por captura por afinidad. Se cultivarán pocillos por triplicado de cada estado de la muestra y se realizará la tinción inmunohistoquímica para TUNEL para demostrar la apoptosis activa. Se cree que los siguientes experimentos proporcionarán evidencia concluyente de que la glicina actúa de manera directa sobre los adipocitos procedentes de TAB.

10 Ejemplo 13

15 **La glicina actúa sobre los adipocitos procedentes de células 3T3-L1 diferenciadas para inducir la desfosforilación de BAD y la apoptosis**

Se cultivarán células 3T3-L1 en cultivo y se diferenciarán en adipocitos por metodología clásica. Véase, Négrel y Dani, *Cultures of Adipose Precursor Cells and Cells of Clonal Lines from Animal White Adipose Tissue, in Adipose Tissue Protocols*, G. Ailhaud, Editor, 2001, Humana Press, Inc.: Totowa, NJ. pág. 225-227. Previamente a la iniciación del experimento se tripsinizarán los adipocitos 3T3-L1 y se lavarán 5 veces en dDMEM [que contiene 1 g/l de glucosa y 110 mg/l de piruvato de Na, complementado con 3,7 g/l de bicarbonato de Na, biotina 33 µM, pantotenato 17 µM, antibióticos (62 mg/l de penicilina y 50 mg/l de estreptomina o 10 mg/l de tetraciclina), insulina 17 nM y T3 2 nM y FBS al 10 %]. Se pondrán en placas las células en los pocillos de placas de cultivo de seis pocillos a una densidad de $8,5 \times 10^3$ células/cm². Se observarán las células para asegurar la viabilidad y la ausencia de contaminación y se iniciará el experimento por la adición de medio dDMEM recién preparado complementado con las siguientes concentraciones crecientes de glicina en el medio. Los pocillos de control recibirán medio recién preparado sin glicina adicional añadida, los pocillos experimentales recibirán medio dDMEM complementado con glicina en las mismas concentraciones de glicina que las usadas para los experimentos FD. Se repondrán los medios diariamente durante un periodo de 3 días. Se recogerán después los cultivos y se lavarán 5 veces con PBS enfriado con hielo. Se lisarán las células por exposición a un tampón hipotónico, se clarificarán por centrifugación y se congelarán instantáneamente alícuotas de lisado en nitrógeno líquido para almacenamiento a -80 °C hasta su uso. El contenido en glicina intracelular de las muestras se determinará por el método CL/EM. El estado de fosforilación de BAD en Ser-136 se determinará usando un ELISA para BAD-Ser 136 o por análisis CL/EM con captura por afinidad. Los experimentos preliminares indican que la glicina en concentraciones en el medio equivalentes a x 2 los niveles de circulación normales en la sangre producen que los adipocitos 3T3-L1 experimenten apoptosis como se pone en evidencia por la tinción de TUNEL positiva. Se pondrán en placas pocillos por triplicado de cada condición de muestra y se realizará tinción inmunohistoquímica para TUNEL para demostrar apoptosis activa.

40 Ejemplo 14

45 **Análisis de 2D-Gel y MAD1 (marcador de afinidad codificado por isótopos) para confirmar que el tratamiento de glicina provoca una respuesta biológica equivalente en adipocitos procedentes de TAB y en células 3T3-L1 diferenciadas**

La utilidad de los adipocitos procedentes de la diferenciación de células 3T3-L1 se verificará adicionalmente demostrando que los patrones de proteínas expresadas diferencialmente provocados por el tratamiento con glicina son similares al patrón observado en extractos de proteínas de TAB tratadas con glicina usando análisis de 2D-gel y MAD1. Véase, Patton et al., *Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? Curr Opin Biotechnol*, 2002. 13 (4): pág. 321-8.

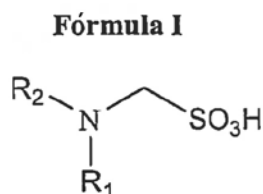
En resumen, los adipocitos procedentes de TAB y 3T3-L1 se obtendrán como se describió previamente. El control y la concentración de glicina en pocillos experimentales se tratarán como se describió anteriormente. Las muestras para análisis se prepararán como se describió previamente y se someterán cantidades iguales de las muestras a análisis por análisis de 2D-Gel y MAD1 para demostrar que los adipocitos 3T3-L1 y los adipocitos procedentes de TAB responden de una manera biológicamente equivalente al tratamiento con glicina. El análisis por MAD1 puede proporcionar un punto de partida para elucidar el mecanismo de acción por el cual la glicina induce la apoptosis en adipocitos de TAB. El MAD1 es un método potente capaz de identificar qué proteínas difieren entre glicina y células tratadas en un modo cuantificable. La metodología MAD1 se presenta en modo de diagrama en la Figura 17.

60 Ejemplo 15

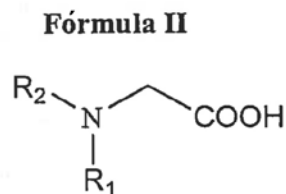
65 **Síntesis de una biblioteca de análogos estructurales de glicina e identificación sistemática previa de los compuestos para detectar la capacidad de inducir la apoptosis de los adipocitos 3T3**

La glicina es un aminoácido no tóxico, fácilmente disponible. La glicina, los análogos de glicina o una combinación de los mismos, deberían inducir la pérdida de peso por la inducción de la apoptosis en TAB. Pueden sintetizarse las

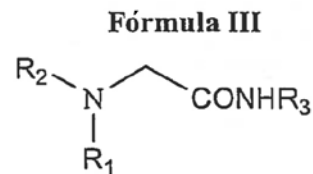
siguientes series de análogos de glicina:



R1=R2=H;
Et, Pr, Bn
R1=R2=Me, Et, Pr
R3= Me, Et, Pr, Bn
R1=H, R2=Bn; R1
R3=Me, Et, Pr, Bn
R2=(CH₂)₅
=Me, Et, Pr o Bn.

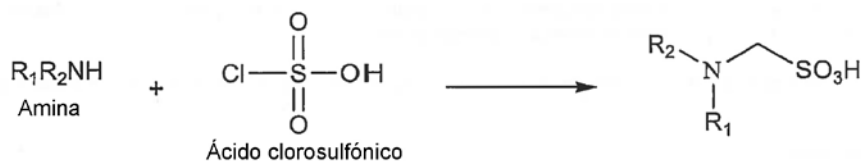


R1=R2=H
R1=R2=Me, Et, Pr
R1=H, R2=Bn
R1, R2=(CH₂)₅

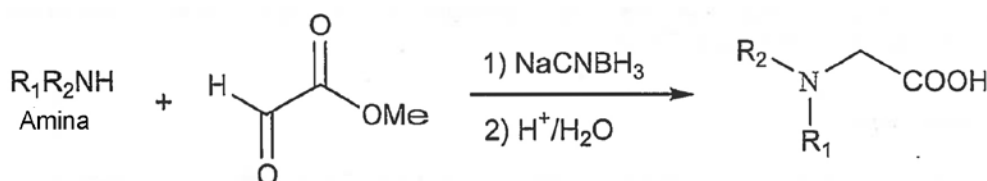


R1=R2=H y R3=H, Me,
R1=R2=Me, Et, Pr y
R1=H, R2=Bn o Me,
R1, R2=(CH₂)₅ o Me, R3

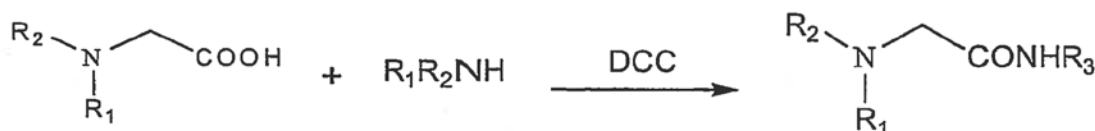
5 La serie de la Fórmula I puede sintetizarse, por ejemplo, por el siguiente esquema:



10 Los análogos de ácido aminosulfónico propuestos en el esquema anterior se sintetizarán tratando diversas dialquilaminas tales como dimetilamina con ácido clorometanosulfónico. La serie de Fórmula II puede sintetizarse por, por ejemplo, el siguiente esquema:



15 Los análogos mostrados anteriormente se sintetizarán por tratamiento de dialquilaminas o aminas primarias con éster metílico de ácido oxoacético en condiciones reductoras usando cianoborohidruro de sodio como agente reductor. Los productos se purificarán por cromatografía. La Fórmula III puede sintetizarse por, por ejemplo, el siguiente esquema:



20 El extremo carboxi libre de la N(alquil) o N,N-Dialquil glicina se amidará con una amina en presencia de Diciclohexilcarbodiimida (DCC) y dimetilaminopiridina (DMAP). En todos los casos se purificarán los productos por cromatografía. La identidad, pureza y cantidad se determinarán por espectrometría de masas, RMN, cromatografía
25 líquida analítica y cualquier otra metodología analítica según se requiera.

Los análogos sintetizados se someterán a una identificación sistemática primaria para determinar su capacidad para promover la desfosforilación de BAD en la Ser-136. El análogo se identificará sistemáticamente en la misma concentración con un control no complementado con glicina y control positivo de glicina en el medio en la misma

concentración y en una concentración eficaz conocida. Todos los ensayos se realizarán por triplicado. Todos los análogos positivos potenciales se someterán a una identificación sistemática repetida. La identificación sistemática secundaria de compuestos positivos identificados en ensayos *in vitro* para determinar sus propiedades químicas los convierte en buenos fármacos candidatos para el ensayo *in vivo*.

5

Ejemplo 16

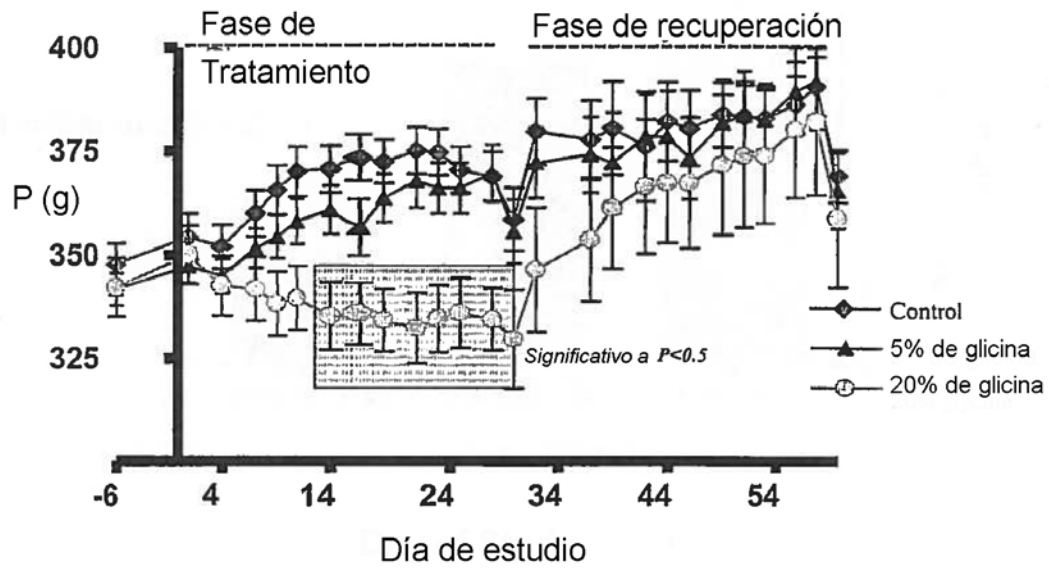
Animales inmaduros

- 10 Las Figuras 18 y 19 muestran que la adición de glicina a la dieta de ratas Sprague Dawley, hembras, inmaduras, dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de la ganancia de peso y el crecimiento, respectivamente. Los animales tratados durante 4 semanas con una dieta complementada con glicina se cambiaron a una dieta que no contenía complemento de glicina (Figura 18 y 19, del 10 % al 0 %). Esto dio como resultado un crecimiento y una ganancia de peso rápidos, de manera que, en un mes, tenían el mismo tamaño y peso que los animales de control del Grupo 1.
- 15 Las Figuras 20 y 21 muestran que la adición de glicina a la dieta de ratas Sprague Dawley, macho, inmaduras, daba como resultado una reducción dependiente de la dosis de la ganancia de peso y el crecimiento, respectivamente. Los animales tratados durante 4 semanas con una dieta complementada con glicina se cambiaron a una dieta que no contenía complemento de glicina (Figura 20 y 21, del 10 % a del 0 %). Esto dio como resultado un crecimiento y una ganancia de peso rápidos, de manera que, en un mes, tenían el mismo tamaño y peso que los
- 20 animales de control del Grupo 1.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de dieta de alto contenido en glicina que comprende del 10 % en peso al 30 % en peso de glicina sobre la base de la composición de dieta para su uso en la reducción del peso en un animal obeso o con sobrepeso.
5
2. La composición de dieta de alto contenido en glicina para el uso de la reivindicación 1, en la que el animal obeso o con sobrepeso es un animal adulto.

Figura 1. Efecto del tratamiento con dieta de glicina sobre ratas Fisher macho



Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el contenido en grasa abdominal en ratas Fisher macho.

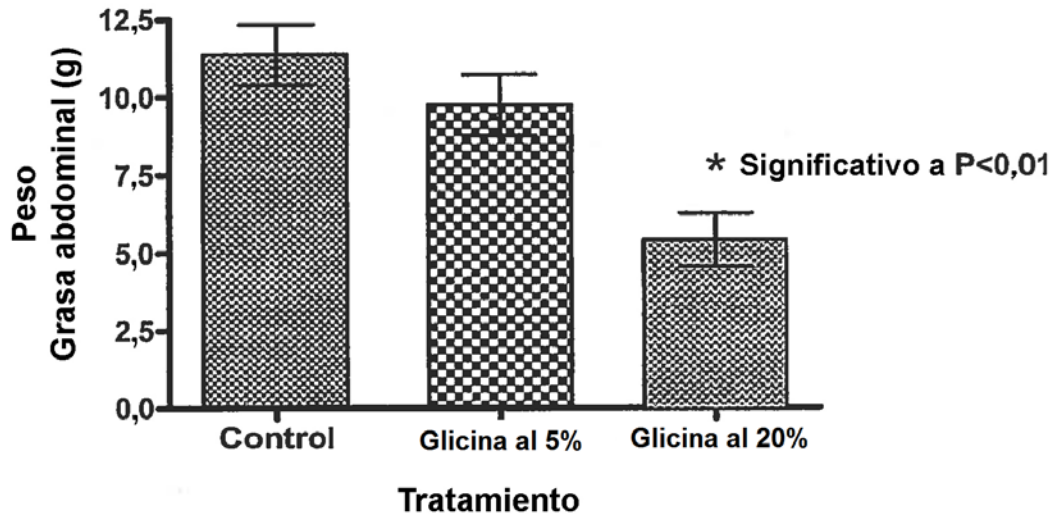


Figura 2

Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el peso de ratas hembra.

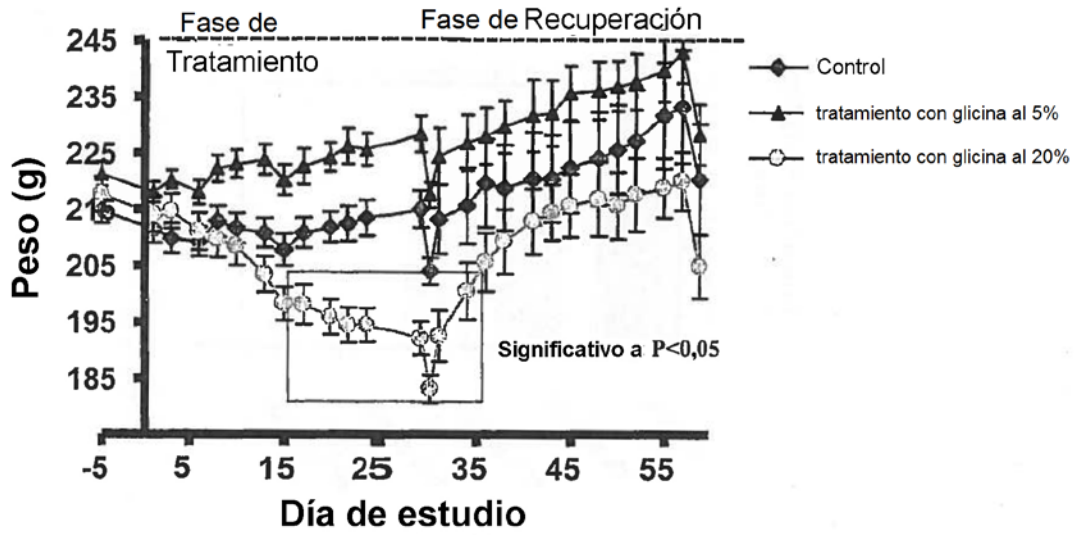


Figura 3

Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el contenido en grasa abdominal en ratas Sprague-Dawley hembras.

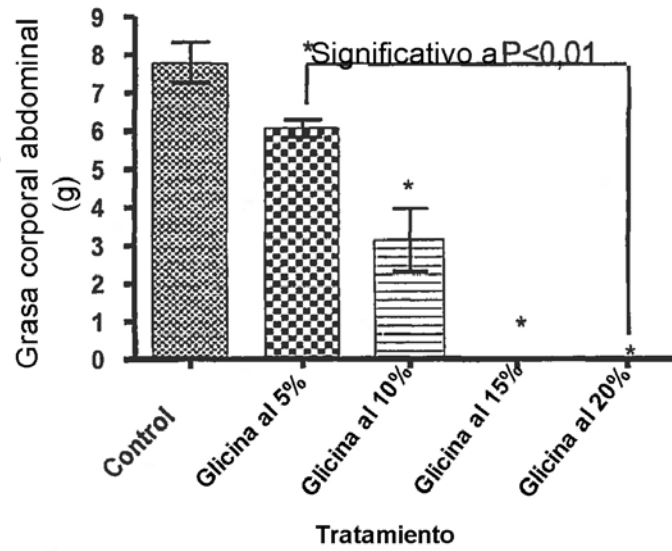


Figura 4

Consumo de alimento diario promedio en ratas Fisher macho

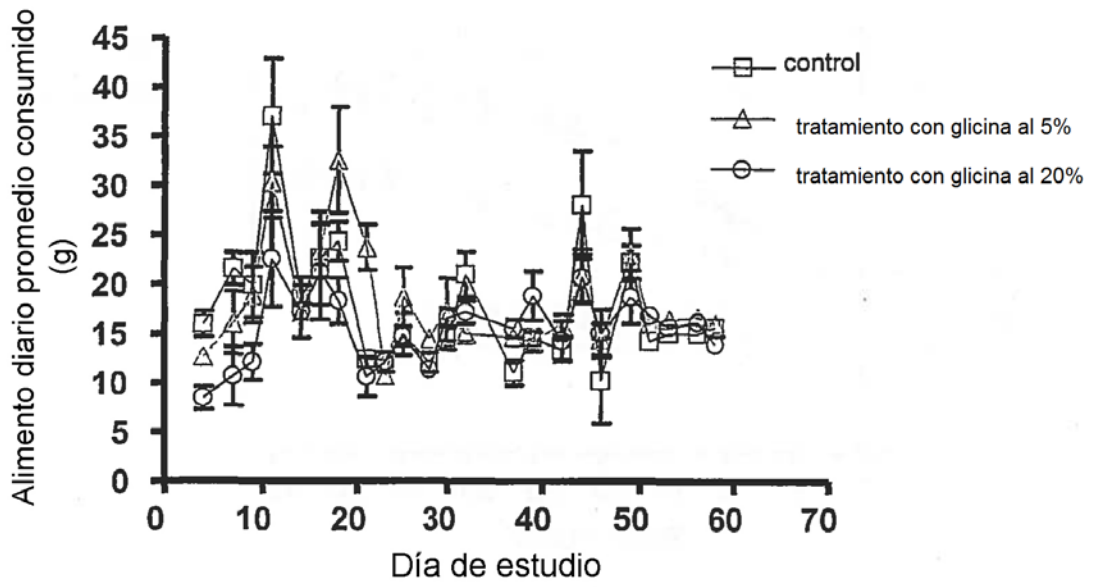


Figura 5

Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el peso de ratas ODZ

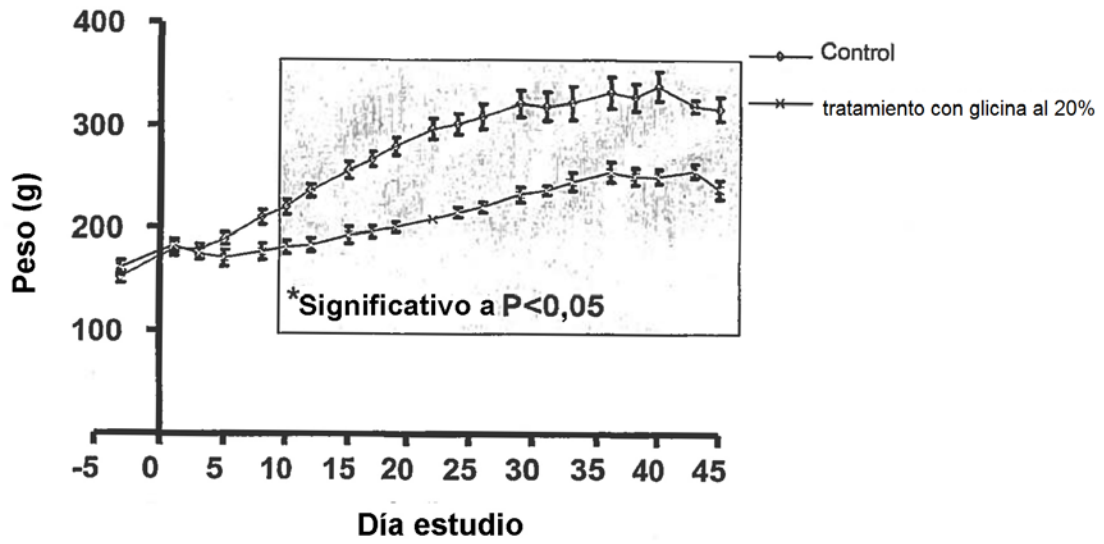


Figura 6

Efecto del tratamiento con glicina sobre el contenido en grasa en ratas ODZ macho.

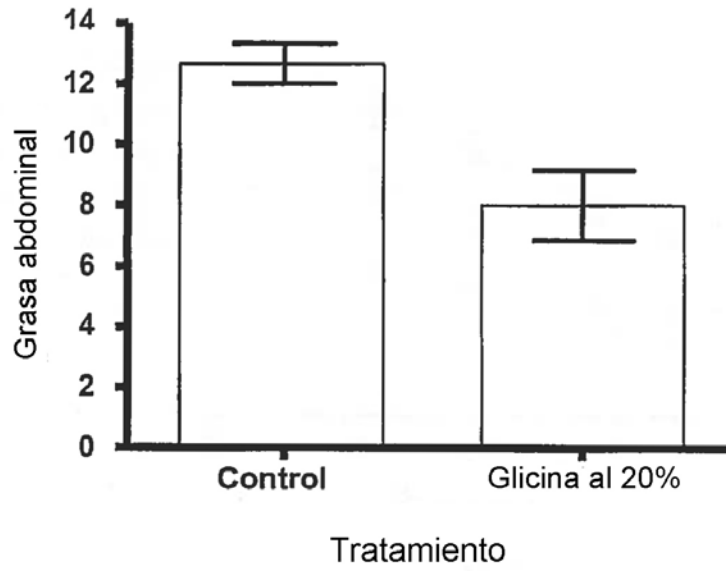


Figura 7

Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el peso de ratas Sprague-Dawley hembras.

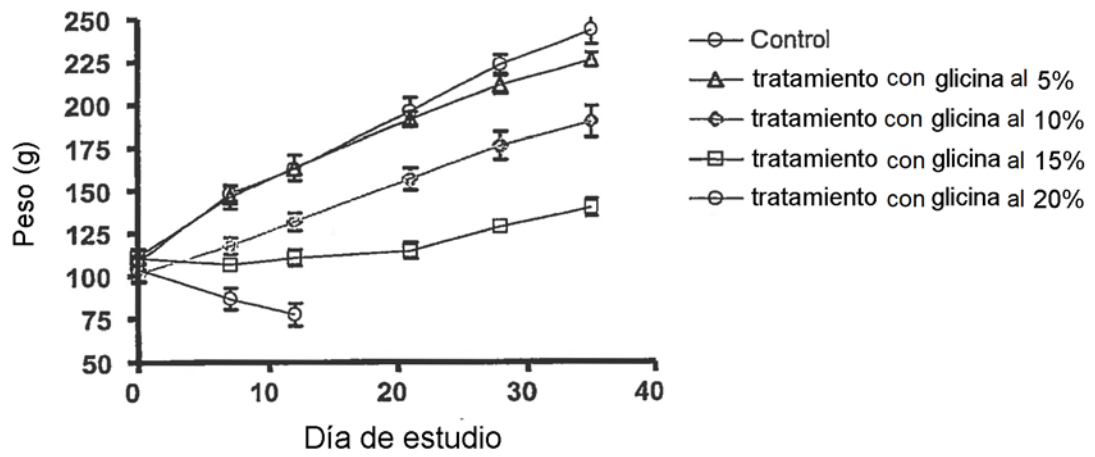


Figura 8

Consumo de alimento de dieta de glicina de ratas Sprague-Dawley.

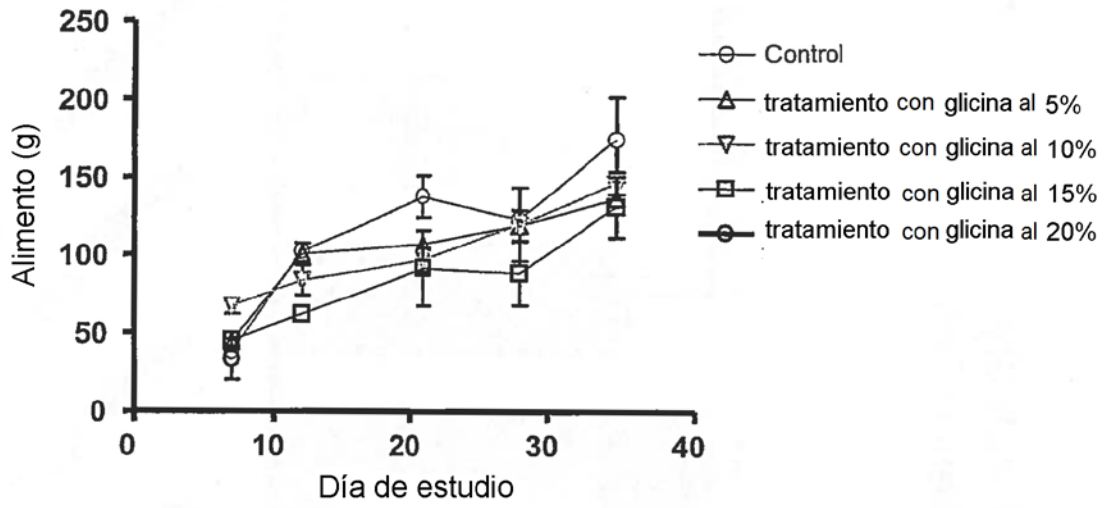
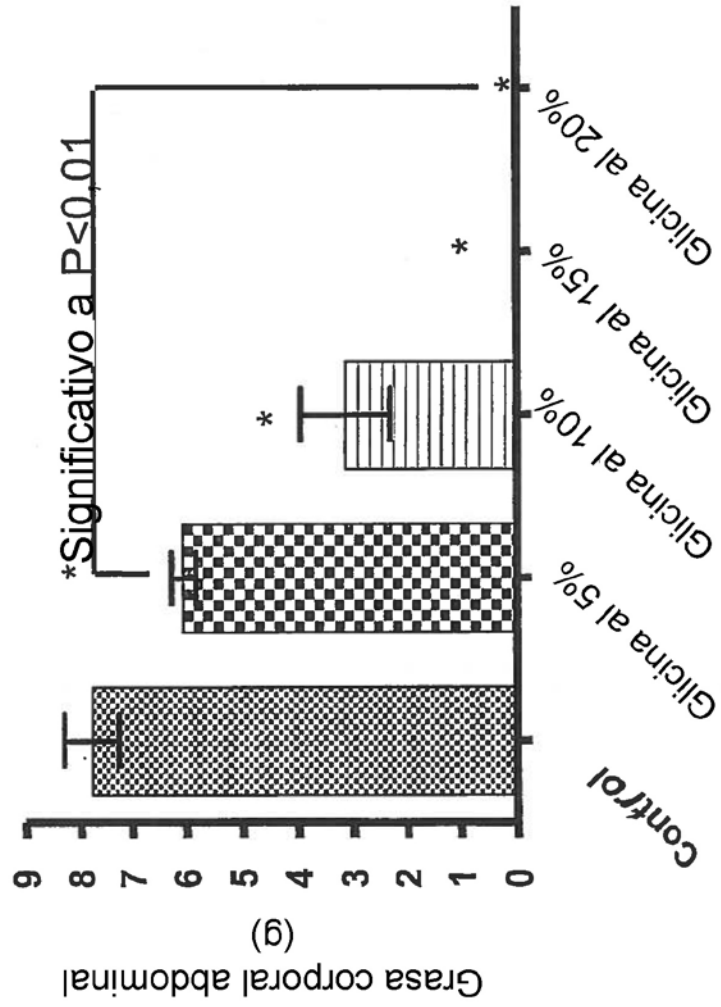


Figura 9

Efecto de una dieta de alto contenido en glicina sobre el contenido en grasa abdominal en ratas Sprague-Dawley hembras.



Tratamiento

Figura 10

Fig. 11A Fosforilación de BAD en tejido adiposo blanco de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina

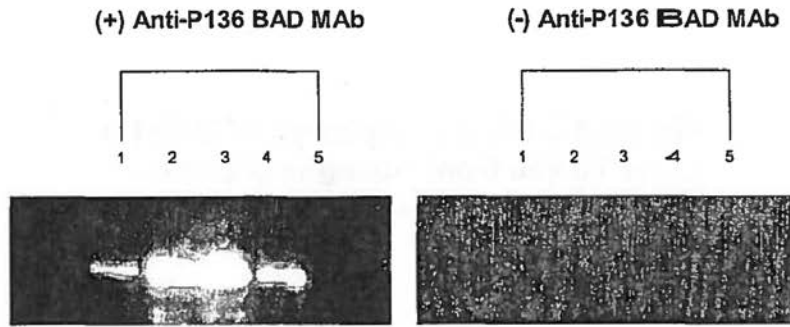


Fig. 11B Fosforilación de BAD en tejido adiposo pardo de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina

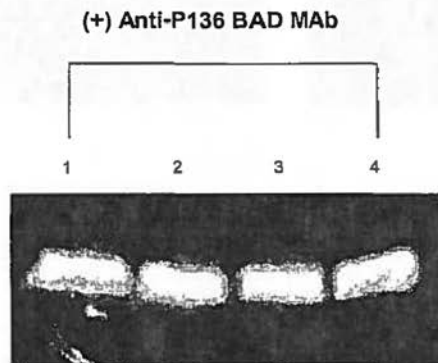


Figura 12. Fosforilación de BAD en tejido hepático de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina.

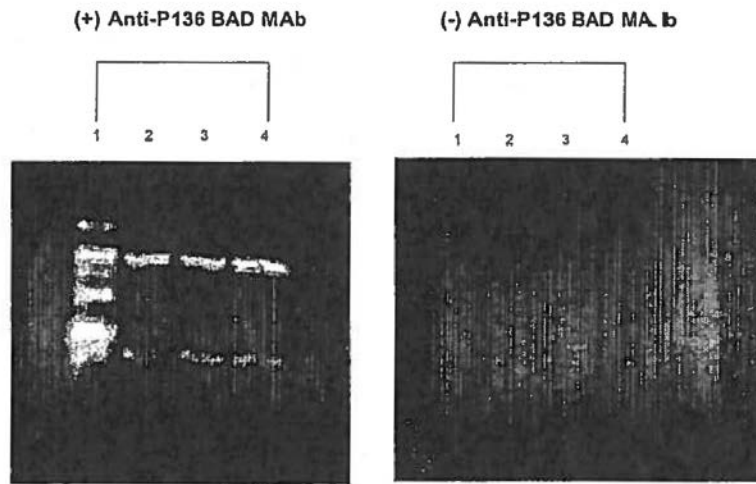


Figura 13. Fosforilación de BAD en tejido muscular de ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta de alto contenido en glicina

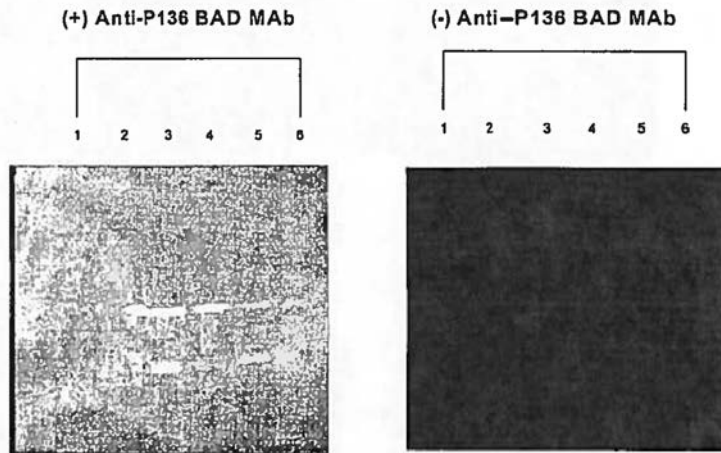


Figura 15: Dieta de glicina al 20%

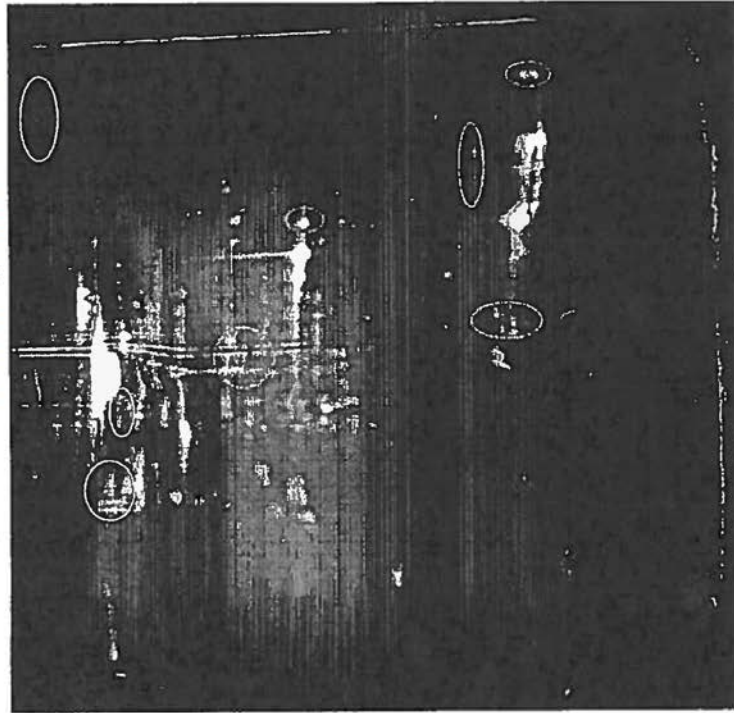


Figura 14: Control

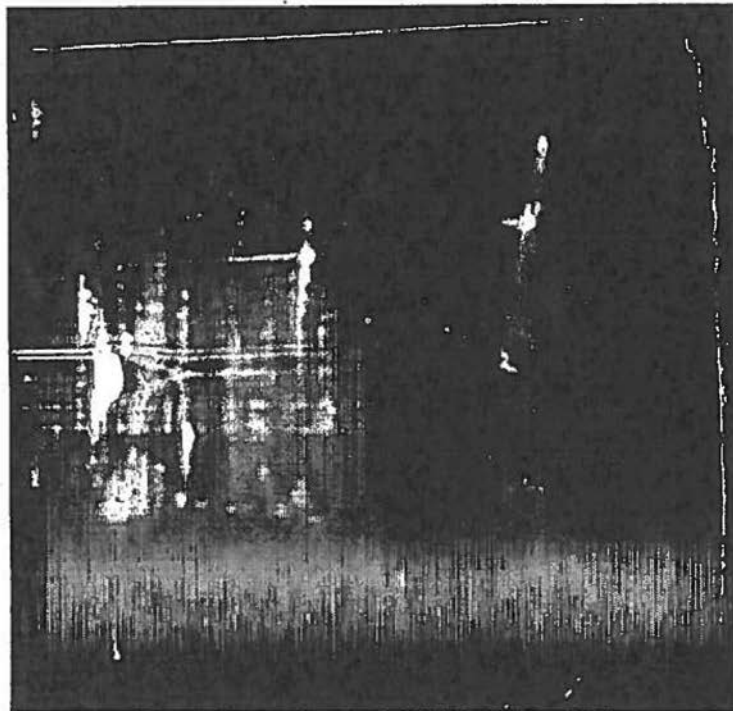


Figura 16

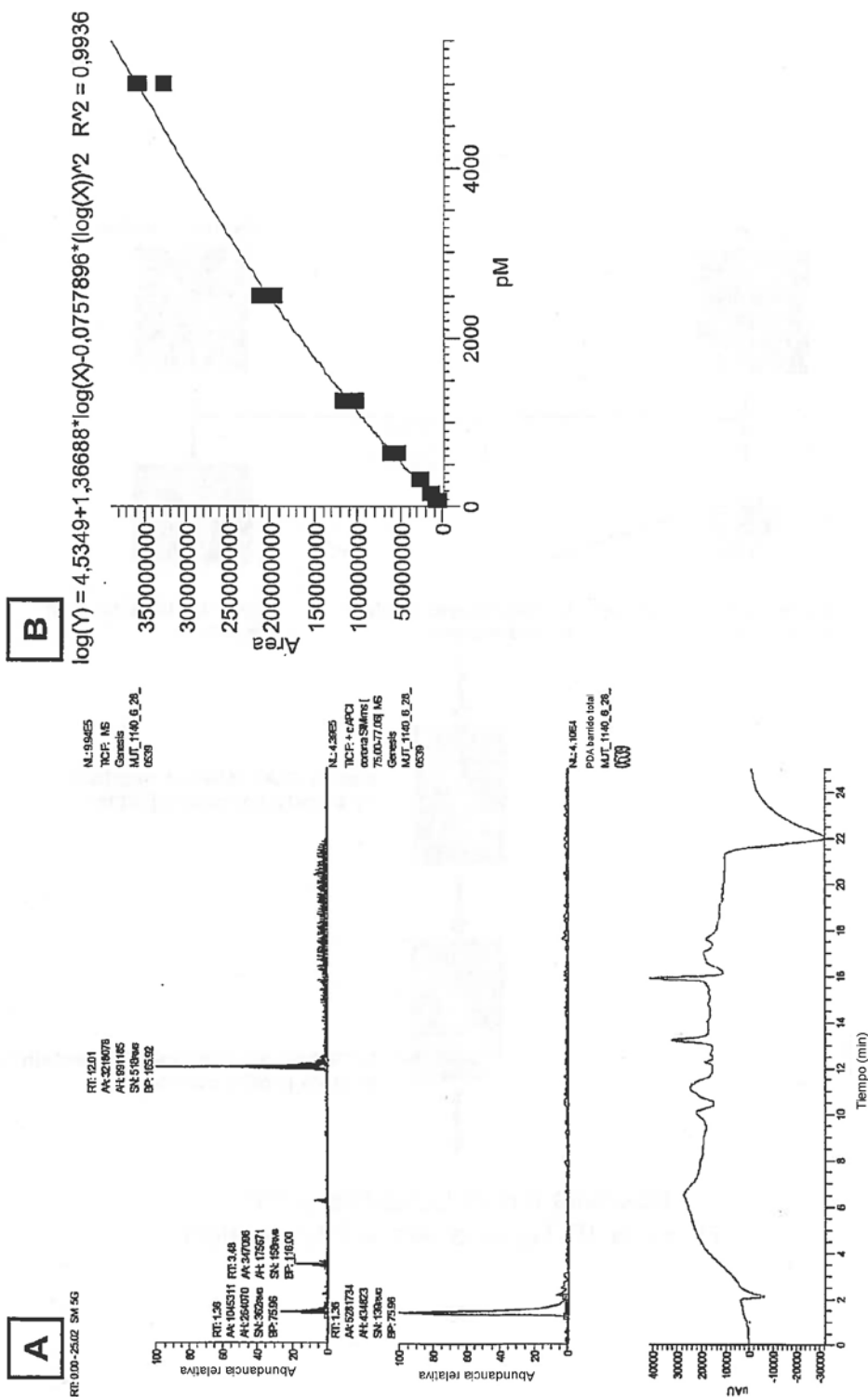


Figura 17

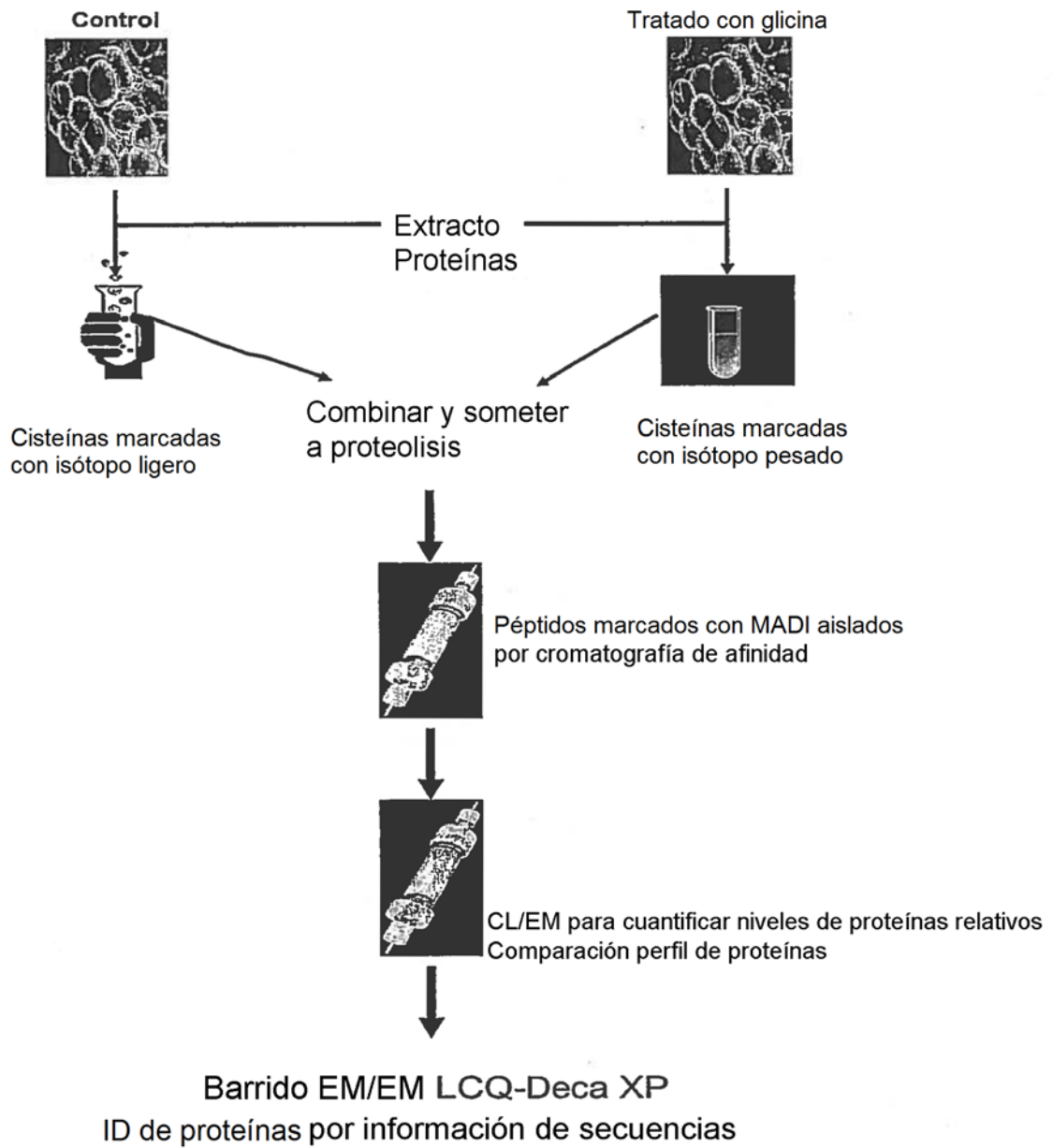


Figura 18. Respuesta a la dosis del peso de una rata hembra inmadura para glicina

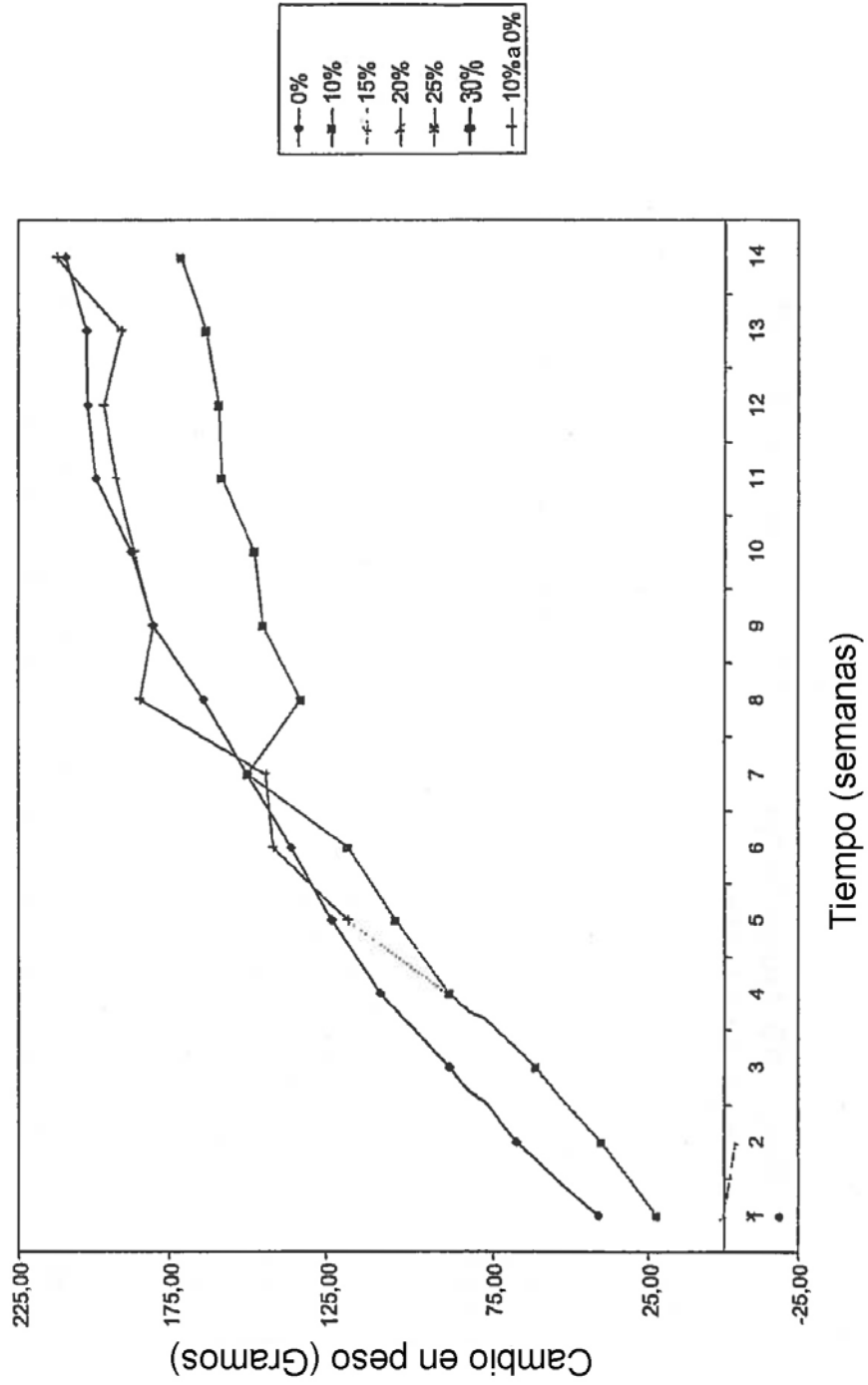


Figura 19. Respuesta a la dosis de la longitud de una rata hembra inmadura para glicina

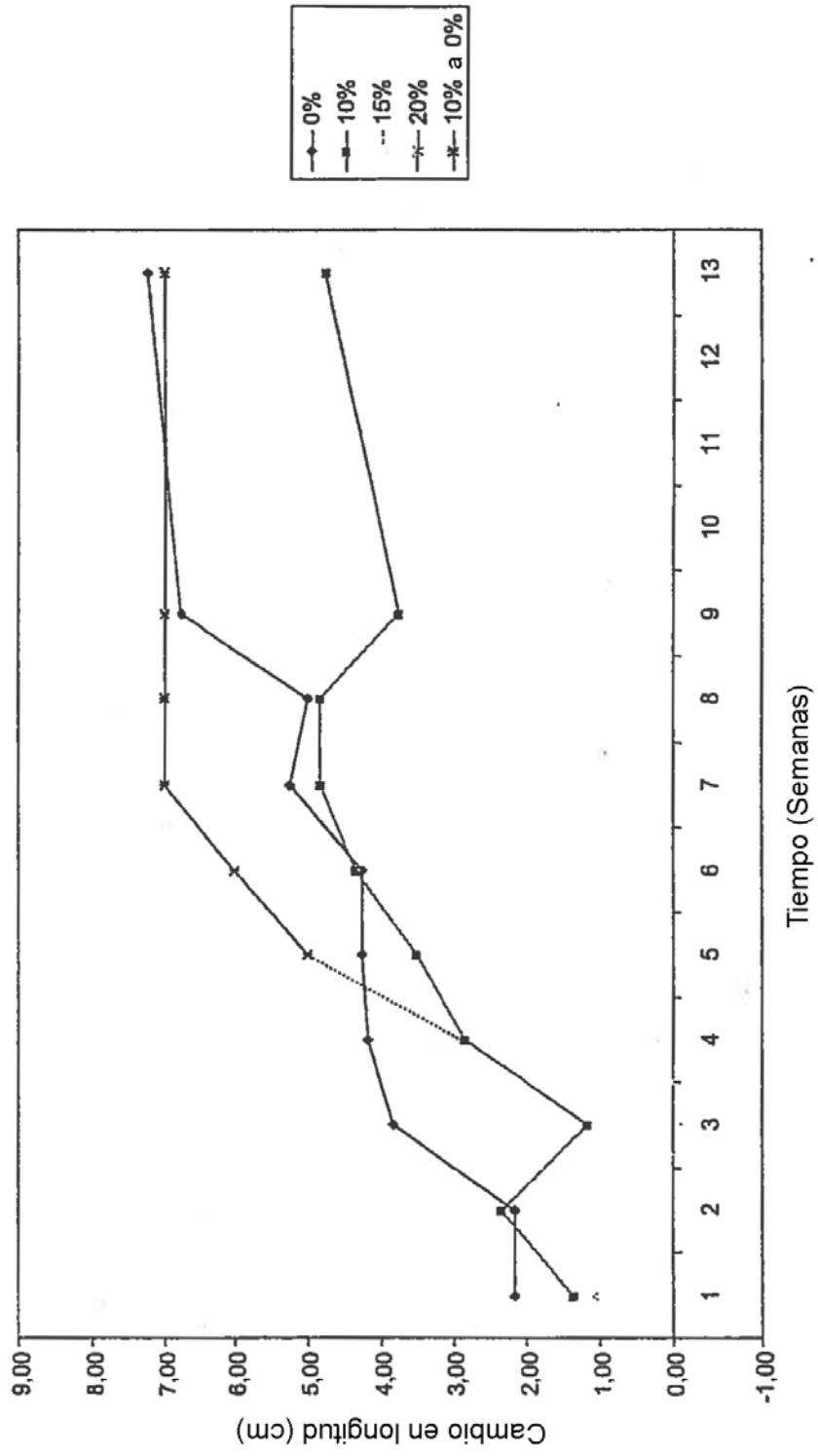


Figura 20. Respuesta a la dosis del peso de una rata macho inmadura para glicina

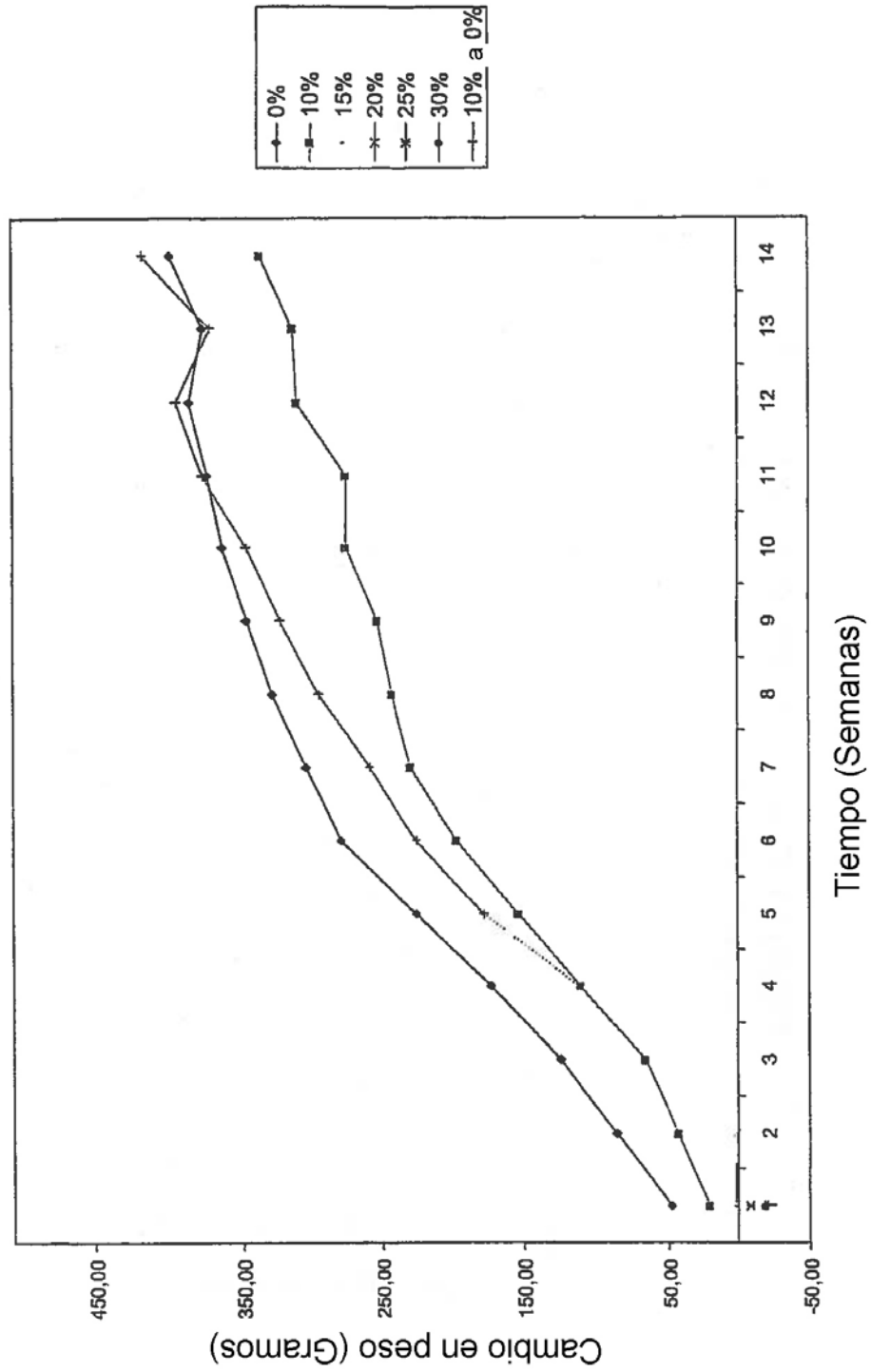


Figura 21. Respuesta a la dosis de la longitud de una rata inmadura para glicina

