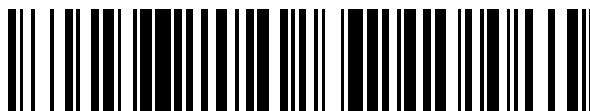


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 763**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/US2012/025055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12746811 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2675275**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de obesidad y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

14.02.2011 US 201161442558 P

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

19.03.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (100.0%)
1600 Huron Parkway 2nd Floor
Ann Arbor, Michigan 48109, US**

72 Inventor/es:

**SALTIEL, ALAN R. y
DECKER, STUART**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 763 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de obesidad y trastornos relacionados

Campo

5 En la presente invención se proporciona el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece obesidad, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, diabetes, síndrome metabólico, inflamación crónica del hígado, o inflamación crónica en un tejido adiposo.

Antecedentes

10 En general, la obesidad se define como un exceso de tejido adiposo. Desde el punto de vista clínico, se define, en general como la cantidad de adiposidad que supone un riesgo para la salud. Incluso la obesidad ligera, que supone estar 20% por encima del peso deseable según las tablas de peso-altura convencionales, puede aumentar el riesgo de padecer enfermedades y una muerte prematura. Aunque la etiología de la obesidad y la diabetes no se superponen totalmente, en la actualidad está muy claro que ambas comparten componentes bioquímicos y fisiológicos apreciables.

15 La incidencia de los trastornos metabólicos de la diabetes y la obesidad ha alcanzado niveles epidémicos. Se ha calculado que más de 120 millones de estadounidenses tienen sobrepeso clínico y más de 25 millones padecen diabetes, que incluyen 1,9 millones de nuevos casos en 2010 entre la población con 20 o más años. La obesidad y la diabetes pueden provocar o contribuir al desarrollo o, al menos, pueden afectar al tratamiento de otras enfermedades y trastornos, tales como enfermedades cardiovascular, ictus, hipertensión, insuficiencia renal, asma y cáncer. Se ha calculado que solo la carga económica de la diabetes fue de más de 174.000 millones de dólares anuales en 2007. La obesidad y la diabetes tienen un impacto importante en la salud humana y en los diversos sistemas de cuidados sanitarios nacionales a lo largo del mundo.

20 En fechas recientes, los fármacos para la pérdida de peso lanzados han fracasado o han demostrado una eficacia limitada y unos efectos secundarios indeseables. De modo similar, a pesar de la tremenda necesidad médica, la industria farmacéutica solo ha tenido un éxito limitado en el desarrollo de productos terapéuticos para gestionar la diabetes. Los productos terapéuticos más habituales (sulfonilureas) no son eficaces, y los nuevos fármacos más prometedores (tiatzolidindionas) han mostrado unos efectos secundarios poco habituales, pero mortales. Por tanto, hay una necesidad urgente de una comprensión más profunda de la base molecular de la obesidad y la diabetes, de ensayos que permitan la detección temprana de predisposiciones a los trastornos, y de productos farmacéuticos más eficaces para prevenir y tratar las enfermedades y las afecciones.

Sumario

25 En el presente documento se proporciona el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece obesidad, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, diabetes, síndrome metabólico, inflamación crónica del hígado, o inflamación crónica en un tejido adiposo. Por ejemplo, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables que emplean el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes y/o intervenciones médicas, para su uso en el tratamiento, la prevención y la gestión de dichas enfermedades y afecciones.

30 En el presente documento se describen procedimientos de tratamiento que comprenden: administrar una cantidad farmacéuticamente aceptable de amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otro agente, a un sujeto con una afección asociada con la obesidad o la resistencia a la insulina. En algunos casos, la administración provoca uno o más de: una reducción o la eliminación de uno o más síntomas de la afección, la prevención de que aumente la gravedad de uno o más síntomas de la afección y/o la reducción, la prevención o la eliminación de otras enfermedades o afecciones.

35 En ciertas realizaciones, la resistencia a la insulina se produce en las células de adipocitos, las células hepáticas o las células musculares del sujeto. En realizaciones concretas, la resistencia a la insulina provoca que el sujeto tenga un metabolismo alterado de la glucosa. En otros casos, la administración provoca un aumento en el metabolismo de la glucosa por los adipocitos y la corrección en la aparición de macrófagos del tejido adiposo del sujeto. En algunas realizaciones, el aumento en el metabolismo de la glucosa es provocado por un aumento de la señalización del receptor de insulina en respuesta a la insulina.

40 En casos concretos, la administración provoca una reducción de la grasa corporal del sujeto (por ejemplo, se reduce el tamaño de los adipocitos en el sujeto). En ciertos casos, la administración provoca que el paciente pierda al menos 10 libras (4,5 kg) (por ejemplo, 10, 15, 20, 35, 60, 100, 200 o más libras; 4,5, 6,8, 9,1, 15,9, 27,2, 45,3, 90,7 o más kg). En algunos casos, la administración provoca una reducción de al menos 5% en el peso corporal del paciente (por ejemplo, una reducción de al menos 7%, 10%, 20%, 30%, 50%, 75% o más).

En algunas realizaciones, la afección tratada es la obesidad. En otras realizaciones, la afección tratada es la diabetes (por ejemplo, de tipo II o ambos tipos I y II). En otras realizaciones, la afección tratada es la resistencia a la insulina.

5 En algunas realizaciones, el sujeto padece o está en riesgo de padecer obesidad, diabetes, y resistencia a la insulina. En algunas realizaciones, el tratamiento produce un resultado de un aumento en el metabolismo de la glucosa, una reducción en la grasa corporal, una falta de aumento en la grasa corporal, un aumento en la señalización del receptor de insulina, una reducción o una prevención de la inflamación crónica en el hígado, una reducción o una prevención de la inflamación crónica en el tejido adiposo, una reducción o una prevención de la esteatosis hepática, la estimulación del gasto de energía metabólica, una reducción en los ácidos grasos libres en la circulación y/o una reducción del colesterol.

15 Las afecciones y los estados de enfermedad que pueden ser tratados con amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyen, pero no se limitan a: diabetes mellitus, diabetes de tipo II, síndrome metabólico, síndrome de resistencia a la insulina, afecciones metabólicas de lípidos, y enfermedad de esteatosis hepática (también denominada enfermedad del hígado graso). La enfermedad del hígado graso puede variar de solo hígado graso (esteatosis) a un hígado graso asociado con inflamación (esteatohepatitis). Esta afección puede aparecer por el consumo de alcohol (hígado graso relacionado con el alcohol) o en ausencia de consumo de alcohol (enfermedad del hígado graso no alcohólica, "nonalcoholic fatty liver disease", NAFLD). Otros factores que pueden conducir a la enfermedad del hígado graso incluyen, pero no se limitan a fármacos (por ejemplo, amiodarona, tamoxifeno, metotrexato), alcohol, anomalías metabólicas (por ejemplo, galactosemia, enfermedades del almacenamiento de glucógeno, homocistinuria, tirosinemia), estados nutricionales (por ejemplo, nutrición excesiva, malnutrición severa, nutrición parenteral total ("total parenteral nutrition", TPN, régimen de hambre) u otros problemas de salud (por ejemplo, celiaquía, enfermedad de Wilson). Los individuos genéticamente predispuestos a la enfermedad del hígado graso pueden mostrar una composición corporal normal o de bajo peso.

25 El amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede emplearse en el tratamiento de sujetos con sobrepeso y/o para la prevención de la obesidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona la definición clínica más ampliamente aceptada de la obesidad. Bajo esta convención, para adultos, un sobrepeso de grado 1 (denominado habitual y sencillamente sobrepeso) consiste en un índice de masa corporal (IMC) de 25-29,9 kg/m². Un sobrepeso de grado 2 (denominado habitualmente obesidad) consiste en un IMC de 30-39,9 kg/m². Un sobrepeso de grado 3 (denominado habitualmente obesidad severa o mórbida) consiste en un IMC mayor o igual a 40 kg/m². La bibliografía quirúrgica a menudo emplea una clasificación diferente para reconocer, en particular, la obesidad severa. En este escenario, un IMC mayor 40 kg/m² se describe como obesidad severa, un IMC de 40-50 kg/m² se denomina obesidad mórbida, y un IMC mayor que 50 kg/m² se denomina superobesidad. La definición de la obesidad en niños implica unos IMC mayores que el 85^o (que se emplea habitualmente para definir el sobrepeso) o el 95^o (que se emplea habitualmente para definir la obesidad) percentil, respectivamente, para sujetos control de la misma edad y sexo. Las causas secundarias de la obesidad incluyen, pero no se limitan a hipotiroidismo, síndrome de Cushing, insulinoma, obesidad hipotalámica, síndrome del ovario poliquístico, síndromes genéticos (por ejemplo, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Alström, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Cohen, síndrome de Börjeson-Forsman-Lehmann, síndrome de Fröhlich), deficiencia en la hormona del crecimiento, uso de anticonceptivos orales, obesidad inducida por medicaciones (por ejemplo, fenotiazinas, valproato de sodio, carbamazepina, antidepresivos tricíclicos, litio, glucocorticoides, acetato de megestrol, tiazolidindionas, sulfonilureas, insulina, antagonistas adrenérgicos, antagonistas de la serotonina (en especial ciproheptadina)), trastornos de la alimentación (en especial, trastorno de atracones, bulimia nerviosa, trastornos de alimentación nocturna), hipogonadismo, pseudohipoparatiroidismo, y obesidad relacionada con la alimentación intubada.

45 En algunas realizaciones, el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, proporcionado en el presente documento se emplea para tratar un sujeto que padece una afección asociada con la obesidad, la resistencia a la insulina o la esteatosis hepática, en el que el sujeto no presenta una alergia, una úlcera aftosa o asma bronquial. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de amlexanox proporcionadas en el presente documento se emplean para tratar un sujeto que padece una afección asociada con la obesidad, la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática, o una o más de las anteriores enfermedades o afecciones, pero no se emplea para tratar una o más de las siguientes enfermedades o afecciones o el sujeto carece de al menos una (o múltiples o todas) de las siguientes enfermedades o afecciones, o no necesita tratamiento por al menos una (o múltiples o todas) de las siguientes enfermedades o afecciones: alergias, fiebre del heno, asma (por ejemplo, asma bronquial), úlceras aftosas, rinitis, bronquitis, inflamación pulmonar, osteoartritis, artritis juvenil, artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, enfermedades granulomatosas crónicas, tales como tuberculosis, lepra, sarcoidosis y silicosis, nefritis, amiloidosis, espondilitis anquilosante, bronquitis crónica, escleroderma, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, apendicitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, cáncer colorrectal, síndrome de Sjorgen, síndrome de Reiter, psoriasis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad inflamatoria

orbital, enfermedad trombotica, calambres menstruales, tendinitis, bursitis, psoriasis, eccema, quemaduras, dermatitis, y respuestas alérgicas inapropiadas a estímulos ambientales, tales como hiedra venenosa, polen, picaduras de insectos y ciertos alimentos, que incluyen dermatitis atópica y dermatitis de contacto, migrañas, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodoma, fiebre reumática, miastenia grave, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behcet, polimiositis, gingivitis, hipersensibilidad, conjuntivitis, hinchamiento que aparece tras lesiones, choque séptico inducido por lipopolisacáridos, regeneración de tejidos, trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), rechazo de tejidos, osteoporosis, caquexia, y neurodegeneración. En algunas realizaciones, las composiciones se emplean para tratar sujetos que no necesitan la regeneración de tejidos. En algunas realizaciones, el amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se emplea para tratar sujetos que carecen de trastornos proliferativos celulares, tales como, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, adenomatosis familiar, poliposis, neurofibromatosis, psoriasis, fibrosis pulmonar y glomerulonefritis artrítica.

En algunas realizaciones, el amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, no se emplea para tratar uno o más de los siguientes cánceres o se emplea para tratar sujetos que no padecen al menos uno de los siguientes cánceres: carcinoma, tal como de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón (que incluye cáncer de pulmón microcítico), esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cérvix, tiroides, próstata y piel (que incluye carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentoso, queratocantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi.

En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden ensayar un sujeto para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo, seguido de administrar amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden administrar al sujeto amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes, seguido de ensayar el sujeto para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden ensayar un sujeto para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo, seguido de administrar amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes, seguido de una segunda ronda de ensayos para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo (por ejemplo, para controlar el efecto del tratamiento). En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden ensayar un sujeto para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo, seguido de administrar amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes, seguido de una segunda ronda de ensayos para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo, y una segunda administración de amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes, estando modificada dicha segunda administración en la dosis, duración, frecuencia o vía de administración de una manera dependiente del resultado de los ensayos anteriores.

La tecnología proporcionada puede comprender el uso del amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, e inflamación crónica en un tejido adiposo.

En algunas realizaciones, la tecnología proporciona el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una afección asociada con la obesidad, la resistencia a la insulina o la esteatosis hepática.

El amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales o intervenciones médicas. La coadministración puede implicar la coformulación de dos o más agentes juntos en el mismo medicamento. Los agentes pueden estar en formulaciones separadas pero se administran juntos, bien de forma simultánea o bien en secuencia (por ejemplo, separados por uno o más minutos, horas, días, etc.). Cuando se logra un efecto sinérgico o aditivo, el agente coadministrado puede proporcionarse a una dosis menor que la que normalmente se administra si el agente se emplease por sí solo para tratar la enfermedad o la afección. Por ejemplo, uno o más de los siguientes agentes o intervenciones puede coadministrarse o coaplicarse con el amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables: una dieta baja en calorías, una dieta muy baja en calorías (menos de 800 calorías diarias), una dieta baja en grasas, una dieta sin gluten, ejercicio, medicaciones para suprimir el apetito.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente tecnología se entenderán mejor remitiéndose a los siguientes dibujos:

- La **figura 1A** muestra una gráfica de la actividad de fosforilación de IKKe medida *in vitro* como una función de la concentración de amlexanox.
- La **figura 1B** muestra una gráfica de la actividad de fosforilación de TBK1 como una función de la concentración de amlexanox.
- La **figura 2** muestra una gráfica doble recíproca que muestra la inhibición competitiva de la unión de ATP a IKKe por el amlexanox.
- La **figura 3** muestra una gráfica del peso corporal frente al tiempo para ratones que recibieron una dieta con alto contenido en grasas y que fueron tratados con amlexanox.
- La **figura 4** muestra una gráfica del peso corporal frente al tiempo para ratones que recibieron una dieta con alto contenido en grasas ("high fat diet", HFD) y a los que se les administró el amlexanox mediante sonda gástrica a 25 mg/kg (cuadrados grises) o 100 mg/kg (cuadrados negros) o control de vehículo (cuadrados blancos = HFD, círculos blancos = ND). El inicio de la sonda gástrica en el grupo preventivo coincidió con el suministro de la dieta con alto contenido en grasas (HFD) a las 8 semanas de edad (n = 5 por grupo).
- La **figura 5A** muestra una gráfica del peso corporal frente al tiempo (duración de la sonda gástrica) para ratones que recibieron una dieta con alto contenido en grasas y que fueron tratados con amlexanox.
- La **figura 5B** muestra una gráfica de la ingesta de alimentos durante el tratamiento para ratones que recibieron una dieta con alto contenido en grasas y que después fueron tratados con amlexanox.
- La **figura 5C** muestra una gráfica del peso corporal para ratones que fueron tratados de modo preventivo con amlexanox 25 mg/kg (cuadrados negros) o control de vehículo (cuadrados blancos) durante 8 semanas, tras lo cual el grupo de abandono (X negras) se cambió a un tratamiento de control de vehículo (n = 7 por grupo).
- La **figura 5D** muestra una gráfica de la masa corporal magra y grasa total (panel izquierdo) y relativa (panel derecho) de ratones en el grupo de tratamiento. ND control de vehículo: barras gris claro, ND amlexanox 25 mg/kg: barras gris oscuro, HFD control de vehículo: barras blancas, y HFD amlexanox 25 mg/kg: barras negras. (n = 4 para los grupos ND, n = 8 para los grupos HFD).
- La **figura 6A** muestra una gráfica de la ingesta de alimentos para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 6B** muestra una gráfica del peso corporal frente a la duración del tratamiento para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 6C** muestra una gráfica de los niveles de glucosa en ayunas frente a la duración de tratamiento para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 6D** muestra una gráfica de la tolerancia a la glucosa oral. ND Control de vehículo (círculos blancos), HFD control de vehículo (cuadrados blancos), HFD amlexanox 25 mg/kg (cuadrados negros) (n = 5 por grupo).
- La **figura 6E** muestra una gráfica de la glucosa en sangre en ayunas y los niveles de insulina en suero en ratones: ND control de vehículo (barras grises), HFD control de vehículo (barras blancas), y HFD amlexanox 25 mg/kg (barras negras) (n = 8 por grupo).
- La **figura 6F** muestra una gráfica de la tolerancia a la insulina. ND control de vehículo (círculos blancos), HFD control de vehículo (cuadrados blancos), HFD amlexanox 25 mg/kg (cuadrados negros) (n = 8 por grupo).
- La **figura 7A** muestra una gráfica del nivel de glucosa en sangre como una función del tiempo después de recibir glucosa por sonda gástrica para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 7B** muestra una gráfica del nivel de glucosa en sangre como una función del tiempo después de recibir una inyección de glucosa para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 8A** muestra una gráfica del porcentaje de glucosa inicial remanente como una función del tiempo después de una inyección de insulina para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 9A** muestra gráficas de masa hepática y triglicéridos hepáticos para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 9B** muestra una gráfica del nivel de glucógeno para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.
- La **figura 9C** muestra una gráfica del peso del hígado con relación al peso corporal del ratón para ratones

Ob/ob tratados con amlexanox.

La **figura 9D** muestra una gráfica de los triglicéridos hepáticos para ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

La **figura 10** muestra la expresión génica relativa (en forma de los niveles relativos de ARNm) para genes lipogénicos expresados en el hígado de ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

5 La **figura 11A** muestra los niveles relativos de ARNm para genes inflamatorios expresados en el hígado de ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

La **figura 11B** muestra los niveles relativos de ARNm para genes marcadores de macrófagos expresados en el hígado de ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

10 La **figura 12A** muestra los niveles relativos de ARNm para genes inflamatorios expresados en el tejido adiposo del epidídimo de ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

La **figura 12B** muestra los niveles relativos de ARNm para genes marcadores de macrófagos expresados en el tejido adiposo del epidídimo de ratones Ob/ob tratados con amlexanox.

15 La **figura 13** muestra una gráfica de los niveles de citoquinas en suero en ratones ob/ob que recibieron por sonda gástrica un control de vehículo (barras blancas) o amlexanox 100 mg/kg (barras negras) (n = 6 por grupo).

La **figura 14** muestra la expresión de genes inflamatorios y de marcadores de macrófagos en tejido adiposo blanco de ratones ob/ob que recibieron por sonda gástrica un control de vehículo (barras blancas) o amlexanox 100 mg/kg (barras negras), determinada mediante Q-PCR (n = 6 por grupo).

20 La **figura 15** muestra una transferencia Western de los niveles de proteínas en tejido adiposo blanco de UCP1, IKK no canónicos, y la fosforilación de S6K en la treonina 389 y HSL en la serina 562. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga.

25 La **figura 16** muestra una transferencia Western de la inducción estimulada por amlexanox de la fosforilación de TBK1 en la serina 172 y la inhibición de la fosforilación de IRF3 en la serina 396 en adipocitos 3T3-L1 tratados con y sin poli I:C. La curva de dosis de amlexanox es una dilución en serie en dos veces, siendo la concentración más alta de 50 μ M. Los resultados se replicaron en múltiples experimentos. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga.

30 La **figura 17** es una transferencia Western que muestra que el inhibidor cayman revierte, de modo dependiente, la inducción por LPS y poli I:C de pIRF3, al mismo tiempo que induce la fosforilación de IKK β y TBK1 en células RAW264.7. Los resultados se replicaron en múltiples experimentos. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga.

35 La **figura 18** es una gráfica del consumo de oxígeno (VO₂ frente al tiempo para ratones tratados con amlexanox; ND (panel izquierdo - círculos gris claro = vehículo, círculos gris oscuro = amlexanox 25 mg/kg) y HFD (panel derecho - cuadrados blancos = vehículo, cuadrados negros = amlexanox 25 mg/kg) (n = 4 para los grupos ND, n = 8 para los grupos HFD). Los valores promedio de los HFD tratados con amlexanox son significativamente mayores que los valores promedio de HFD con vehículo durante los tres ciclos de luz y oscuridad, valor P < 0,05.

40 La **figura 19** es una gráfica que muestra la temperatura interna corporal en ratones con alimentación ND que recibieron por sonda gástrica un vehículo (barra gris), ratones con alimentación HFD que recibieron por sonda gástrica un vehículo (barra blanca) y ratones con alimentación HFD que recibieron por sonda gástrica amlexanox 25 mg/kg (barra negra). * valor de p < 0,05 HFD con control de vehículo frente a HFD tratados con amlexanox u ob/ob con control de vehículo frente a ob/ob tratados con amlexanox. † Valor de p < 0,05 ND con control de vehículo frente a HFD con control de vehículo.

45 La **figura 20A** es una gráfica que muestra una tasa lipolítica mayor en adipocitos 3T3-L1 tratados con amlexanox, según se mide mediante la liberación de glicerol (panel izquierdo). Se muestran los correspondientes niveles de fosforilación de HSL y TBK1 en el panel derecho. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga.

50 La **figura 20B** es una transferencia Western que demuestra que el amlexanox restablece parcialmente la fosforilación de HSL estimulada por forskolina en la serina 660 en adipocitos 3T3-L1 crónicamente tratados con TNF α . La fosforilación de TBK1 en la serina 172 también fue restablecida por el tratamiento con amlexanox. Unos niveles de proteínas PEAR γ reducidos y de proteínas IKK ϵ aumentados son controles positivos para la eficacia de TNF α . Los resultados se replicaron en más de tres experimentos. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga.

55 La **figura 21** es una gráfica que muestra la expresión de marcadores específicos de BAT en BAT del grupo de tratamiento determinada mediante QPCR. Barras grises: ND control de vehículo, barras blancas: control de vehículo con dieta con alto contenido en grasas; barras negras: reciben diariamente una dieta con alto contenido en grasas por sonda gástrica con amlexanox 25 mg/kg (n = 6 por grupo).

60 La **figura 22** es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína UCP-1 en BAT del grupo de tratamiento. Los niveles de Akt se muestran como controles de carga. * Valor de p < 0,05, control de vehículo frente a tratados con amlexanox; # Valor de p < 0,1, HFD con control de vehículo frente a HFD tratados con amlexanox; † Valor de p < 0,05, ND con control de vehículo frente a HFD con control de vehículo.

La **figura 23** es una transferencia Western que muestra los niveles de proteínas en BAT de IKK no canónicos, y la fosforilación de S6 en la serina 235/236. Los niveles de RalA se muestran como controles de carga. Tasa de

oxidación de lípidos de BAT tratado *ex vivo* con amlexanox (barra negra) o control de vehículo (barra blanca) (n = 6 por grupo). * Valor de $p < 0,05$, tratado con vehículo frente a tratado con amlexanox.

La **figura 24** es una gráfica que muestra la tasa de oxidación de lípidos de BAT tratado *ex vivo* con amlexanox (barra negra) o control de vehículo (barra blanca) (n = 6 por grupo). * Valor de $p < 0,05$, tratado con vehículo frente a tratado con amlexanox.

Descripción detallada

En el presente documento se proporciona el amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solo o en combinación con otros agentes y/o intervenciones médicas, para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece obesidad, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, diabetes, síndrome metabólico, inflamación crónica del hígado, o inflamación crónica en un tejido adiposo.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de las realizaciones descritas en el presente documento, a continuación se definen una serie de términos y expresiones.

Tal como se emplea en el presente documento, "un" o "una" o "el" o "la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una célula o una pluralidad de células.

Tal como se emplea en el presente documento, "activo" o "actividad" se refiere una actividad biológica y/o inmunológica nativa o natural.

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden incluir, pero no se limitan a tubos de ensayo y cultivos celulares. La expresión "*in vivo*" se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno natural.

Tal como se emplean en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, tal como un mamífero, tal como un perro, un gato, un ave, ganado y, preferiblemente, un ser humano (por ejemplo, un ser humano que padece una enfermedad, tal como obesidad, diabetes, o resistencia a la insulina).

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición que es suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración concreta.

Tal como se emplea en el presente documento, el término "administración" se refiere al acto de administrar un fármaco, profármaco u otro agente o tratamiento terapéutico a un sujeto. Los ejemplos de vías de administración al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (transdérmica, tópica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), oído, mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, etc.), y similares.

Tal como se emplea en el presente documento, el término "coadministración" se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias empleados pueden variar. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad la dosificación apropiada para la coadministración. En algunas realizaciones, cuando los agentes o las terapias se coadministran, los respectivos agentes o terapias se administran a dosificaciones inferiores que las apropiadas para su administración por sí solos. Así, la coadministración es especialmente deseable en realizaciones en las que la coadministración de los agentes o la terapia disminuye la dosificación necesaria de un agente potencialmente perjudicial (por ejemplo, tóxico).

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para un uso terapéutico.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable", tal como se emplean en el presente documento, se refieren a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, por ejemplo, reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

Tal como se emplea en el presente documento, el término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una enfermedad o un trastorno mediante la introducción, en cualquier forma, de una

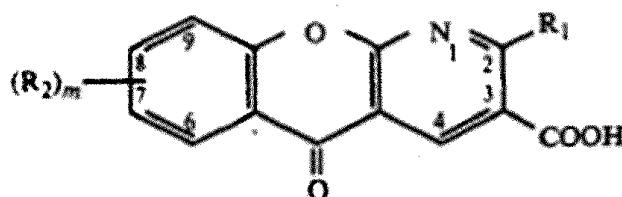
composición terapéutica de la presente tecnología en el cuerpo o sobre el cuerpo de un sujeto. Un "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o frenar (disminuir) el trastorno o afección patológica diana. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los sujetos que ya presentan el trastorno, así como los sujetos que son propensos a padecer el trastorno o los sujetos en los que el trastorno debe prevenirse.

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico suficiente para producir un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha dosis puede administrarse en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se considera una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, que incluyen, pero no se limitan a la edad y el tamaño del paciente, el tipo o grado de la enfermedad, el estadio de la enfermedad, la vía de administración, el tipo o grado de la terapia suplementaria utilizada, el proceso en curso de la enfermedad y el tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, un tratamiento agresivo frente a un tratamiento convencional).

Tal como se emplea en el presente documento, el término "muestra" se emplea en su sentido más amplio. En un sentido, pretende incluir un espécimen o un cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de animales (incluyendo seres humanos) e incluyen fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental, tal como materia de la superficie, tierra, agua, cristales y muestras industriales. Sin embargo, no debe considerarse que estos ejemplos limiten los tipos de muestras pertinentes a la presente tecnología.

Realizaciones de la tecnología

Las realizaciones conciernen al amlexanox (ácido 2-amino-7-isopropil-1-azaxantona-3-carboxílico; ácido 2-amino-7-isopropil-5-oxo-5H-cromeno[2,3-b]piridin-3-carboxílico), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El amlexanox y su síntesis se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.143.042. El compuesto tiene la estructura de la fórmula I:



(I)

en la que R_1 es un grupo amino, y m es 1.

En la fórmula (I), el grupo alquilo representado por R_2 es isopropilo.

El compuesto de fórmula general (I) puede convertirse en las correspondientes sales de amina orgánica, sales de metal alcalino o sales de amonio haciendo reaccionar (I) de la manera convencional *per se* con una amina orgánica (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, dl-metilefedrina, 1-(3,5-dihidroxifenil)-L-isopropilaminoetanol, isoproterenol, dextrometorfano, hetrazan(dietilcarbamazina), dietilamina, trietilamina, etc.), un hidróxido de metal alcalino (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etc.) o amoniaco, por ejemplo, mezclándolos juntos y calentando en un disolvente adecuado.

En general, se contempla que los compuestos según la tecnología proporcionada se formulen para la administración a un mamífero y, en especial, a un ser humano que padece una afección que responde a la administración de dichos compuestos. Por tanto, cuando se contempla que los compuestos se administren en una composición farmacológica, se contempla que los compuestos contemplados se formulen mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los compuestos contemplados pueden administrarse por vía oral en forma de sales farmacológicamente aceptables, o por vía intravenosa en disolución salina fisiológica (por ejemplo, tamponada hasta un pH de aproximadamente 7,2 a 7,5). Para este fin pueden emplearse tampones convencionales, tales como fosfatos, bicarbonatos o citratos. Por supuesto, los expertos en la técnica pueden modificar las formulaciones dentro de las indicaciones de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para un vía de administración concreta. En particular, los compuestos contemplados pueden modificarse para hacer que sean más solubles en agua u otro vehículo, lo cual puede lograrse con facilidad, por ejemplo, con pequeñas modificaciones (formulación de la sal, esterificación, etc.) que están dentro de los conocimientos normales de la técnica. También dentro de los conocimientos normales de la técnica se encuentra la modificación de la vía de administración y del régimen de dosificación de un compuesto concreto para modificar la farmacocinética de los presentes compuestos para obtener un efecto beneficioso máximo en un paciente.

En ciertas formas de dosificación farmacéuticas pueden formarse las formas de profármaco de los compuestos contemplados para diversos propósitos, que incluyen la reducción de la toxicidad, el aumento de la especificidad por la célula diana u órgano, etc. Entre las diversas formas de profármaco se prefieren los derivados acilados (acetilados u otros), ésteres de piridina y diversas formas salinas de los presentes compuestos. Los expertos en la técnica sabrán cómo modificar con facilidad los presentes compuestos para producir formas de profármacos para facilitar el transporte de los compuestos activos a un sitio diana dentro del organismo hospedante o paciente. Los expertos en la técnica también podrán aprovechar los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas de profármaco, cuando sea pertinente, en el transporte de los presentes compuestos hasta un sitio diana dentro del organismo hospedante o paciente para maximizar el efecto previsto del compuesto. De modo similar, se apreciará que los compuestos contemplados también pueden metabolizarse a su forma biológicamente activa y, por tanto, se contemplan específicamente todos los metabolitos de los compuestos del presente documento. Además, los compuestos contemplados (y sus combinaciones) pueden administrarse en combinación con otros agentes para tratar la obesidad y trastornos relacionados que incluyen, pero no se limitan a la resistencia a la insulina, la diabetes, la esteatosis, la hepatitis esteatótica no alcohólica, y la aterosclerosis.

Con respecto a la administración a un sujeto, se contempla que los compuestos se administren en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad farmacéuticamente eficaz varía dependiendo del agente terapéutico empleado, de la edad, condición y sexo del sujeto, y del grado de la enfermedad en el sujeto. En general, la dosificación no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. La dosificación también puede ser ajustada por el médico o veterinario individual para lograr el objetivo terapéutico deseado.

Tal como se emplea en el presente documento, la cantidad real incluida en la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" dependerá de la vía de administración, del tipo de sujeto que se está tratando, y de las características físicas del sujeto específico tomado en consideración. Estos factores y su relación con la determinación de esta cantidad son muy conocidos por los expertos en la técnica médica, veterinaria y otras técnicas relacionadas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden ajustarse para lograr una eficacia óptima, pero dependerán de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica.

El amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz. El amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede administrarse en una dosis terapéuticamente eficaz.

La cantidad y la frecuencia de la dosificación se seleccionan para crear un nivel eficaz del compuesto sin efectos sustancialmente perjudiciales. Cuando se administra por vía oral o intravenosa, la dosificación del amlexanox o los compuestos relacionados en general variará de 0,001 a 10.000 mg/kg/día o dosis (por ejemplo, de 0,01 a o 1000 mg/kg/día o dosis; de 0,1 a 100 mg/kg/día o dosis).

Los procedimientos para administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz incluyen, sin limitación, la administración en forma parenteral, oral, intraperitoneal, intranasal, tópica, sublingual, rectal y vaginal. Las vías de administración parenterales incluyen, por ejemplo, las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal mediante inyección e infusión. El amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede administrarse por vía oral.

Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden uno o más compuestos de la presente tecnología asociados con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En la técnica se conocen los vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos, por ejemplo, en Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro, edit., 1985). Por consiguiente, la composición puede formularse como un comprimido, una cápsula, un comprimido de liberación a lo largo del tiempo, una cápsula de liberación a lo largo del tiempo; un gránulo de liberación a lo largo del tiempo; un comprimido de liberación lenta, una cápsula de liberación lenta; un gránulo de liberación lenta; un comprimido de liberación rápida; una cápsula de liberación rápida; un gránulo de liberación rápida; un comprimido sublingual; una cápsula de gel; una microencapsulación; una formulación de administración transdérmica; un gel transdérmico; un parche transdérmico; una disolución estéril; una disolución estéril preparada para su uso como inyección intramuscular o subcutánea, para su uso como una inyección directa en un sitio diana, o para la administración intravenosa; una disolución preparada para la administración rectal; una disolución preparada para la administración a través de un tubo de alimentación gástrica o un tubo de alimentación duodenal; un supositorio para la administración rectal; un líquido para el consumo oral preparado como una disolución o un elixir; una crema tópica; un gel; una loción; una tintura; un jarabe; una emulsión; o una suspensión.

La formulación de liberación a lo largo del tiempo puede tener un mecanismo de liberación sostenida, de acción

sostenida, de liberación extendida, de liberación controlada, de liberación modificada o de liberación continua, por ejemplo, la composición se formula para disolverse con rapidez, lentamente o a cualquier velocidad de liberación apropiada del amlexanox a lo largo del tiempo.

5 Las composiciones pueden formularse de tal modo que el ingrediente activo esté rodeado de una matriz de una sustancia insoluble (por ejemplo, diversos acrílicos, quitina), de forma que el fármaco en disolución pueda salir a través de los agujeros de la matriz, por ejemplo mediante difusión. La formulación puede estar encerrada dentro de un comprimido a base de polímeros con un agujero taladrado con láser en un lado y una membrana porosa en el otro lado. Los ácidos estomacales se introducen a través de la membrana porosa, empujando con ello al fármaco hacia afuera a través del agujero taladrado con láser. Finalmente, la dosis completa del fármaco se libera en el sistema, mientras que el recipiente de polímeros permanece intacto y será excretado posteriormente a través de la digestión normal. En algunas formulaciones de liberación sostenida, el amlexanox se disuelve en la matriz, y la matriz se hincha físicamente para formar un gel, lo cual permite al fármaco salir a través de la superficie externa del gel. En algunas realizaciones, las formulaciones están en una forma microencapsulada, por ejemplo, la cual se emplea en algunas realizaciones para producir un perfil de disolución complejo. Por ejemplo, si se reviste el amlexanox alrededor de un núcleo inerte y se le recubre de capas de sustancias insolubles para formar una microesfera, algunas realizaciones proporcionan unas tasas de disolución más replicables y constantes en un formato convencional que se combina, en realizaciones concretas, con otros ingredientes farmacéuticos de liberación controlada (por ejemplo, instantánea) para proporcionar una cápsula de gel de múltiples partes.

20 Las preparaciones y/o formulaciones farmacéuticas de la tecnología pueden proporcionarse en partículas. Las partículas, tal como se emplea este término en el presente documento, son nano- o micropartículas (o, en algunos casos, mayores) que pueden consistir total o parcialmente en amlexanox o el otro u otros agentes terapéuticos, según se describe en el presente documento. Las partículas pueden contener las preparaciones y/o las formulaciones en un núcleo rodeado por un revestimiento que incluye, pero no se limita un revestimiento entérico. Las preparaciones y/o formulaciones también pueden dispersarse a través de las partículas. Las preparaciones y/o formulaciones también pueden adsorberse en las partículas. Las partículas pueden presentar cualquier orden de cinética de liberación, que incluyen una liberación de orden cero, una liberación de primer orden, una liberación de segundo orden, una liberación retrasada, una liberación sostenida, una liberación inmediata y cualquiera de sus combinaciones, etc. La partícula puede incluir, además de las preparaciones y/o las formulaciones, cualquiera de los materiales que se emplean habitualmente en la técnica de la farmacia y la medicina que incluyen, pero no se limitan a materiales erosionables, no erosionables, biodegradables o no biodegradables o sus combinaciones. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la formulación en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden tener casi cualquier forma.

Pueden emplearse materiales poliméricos no biodegradables y biodegradables en la fabricación de partículas para transportar las preparaciones y/o las formulaciones. Estos polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo a lo largo del cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de interés particular incluyen los hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubell en *Macromolecules* (1993), 26:581-587. Estos incluyen poli(ácidos hialurónicos), caseína, gelatina, glutina, polianhidridos, poli(ácido acrílico), alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

La tecnología también proporciona procedimientos para preparar preparaciones farmacéuticas estables que contienen disoluciones acuosas de amlexanox, o sus sales, para inhibir la formación de los productos de la degradación del amlexanox. Se proporciona una disolución que contiene amlexanox, o sus sales, y al menos un agente inhibidor de amlexanox. La disolución se procesa con al menos una técnica de esterilización antes y/o después de introducir finalmente la disolución en un recipiente sellable para formar una preparación farmacéutica estable. Las presentes formulaciones pueden prepararse por medio de diversos procedimientos conocidos en la técnica, con la condición de que la formulación sea sustancialmente homogénea, por ejemplo, el producto farmacéutico se distribuye de una manera sustancialmente uniforme dentro de la formulación. Esta distribución uniforme facilita el control de la liberación del fármaco de la formulación.

El amlexanox puede formularse con un agente tamponante. El agente tamponante puede ser cualquier agente tamponante farmacéuticamente aceptable. Los sistemas de tampón incluyen tampones citrato, tampones acetato, tampones borato, y tampones fosfato. Los ejemplos de tampones incluyen ácido cítrico, citrato de sodio, acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio y ácido fosfórico, ascorbato de sodio, ácido tartárico, ácido maleico, glicina, lactato de sodio, ácido láctico, ácido ascórbico, imidazol, bicarbonato de sodio y ácido carbónico, succinato de sodio y ácido succínico, histidina, y benzoato de sodio y ácido benzoico.

El amlexanox puede formularse con un agente quelante. El agente quelante puede ser cualquier agente quelante

farmacéuticamente aceptable. Los agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminatetraacético (sinónimo de EDTA, ácido edético, ácido de verseno, y secuestreno) y derivados de EDTA, tales como edetato de dipotasio, edetato de disodio, edetato de calcio disodio, edetato de sodio, edetato de trisodio, y edetato de potasio. Otros agentes quelantes incluyen ácido cítrico y sus derivados. El ácido cítrico también se conoce como ácido cítrico monohidrato. Los derivados del ácido cítrico incluyen ácido cítrico anhidro y citrato de trisodio dihidrato. Otros agentes quelantes incluyen niacinamida y sus derivados y desoxicolato de sodio y sus derivados.

El amlexanox puede formularse con un antioxidante. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los antioxidantes son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como ácido ascórbico, derivados del ácido ascórbico (por ejemplo, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, etc.), hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, galato de alquilo, meta-bisulfato de sodio, bisulfato de sodio, ditionito de sodio, ácido tioglicólico de sodio, sulfoxilato de formaldehído de sodio, tocoferol y sus derivados (d-alfa-tocoferol, acetato de d-alfa-tocoferol, acetato de dl-alfa-tocoferol, succinato de d-alfa-tocoferol, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma-tocoferol, y succinato de d-alfa-tocoferol y polioxietilenglicol 1000), monotioglicerol, y sulfito de sodio. Estos materiales generalmente se añaden en intervalos del 0,01 al 2,0%.

El amlexanox puede formularse con un crioprotector. El agente crioprotector puede ser cualquier agente crioprotector farmacéuticamente aceptable. Los agentes crioprotectores habituales incluyen histidina, polietilenglicol, polivinilpirrolidina, lactosa, sacarosa, manitol, y polioles.

El amlexanox puede formularse con un agente de isotonicidad. El agente de isotonicidad puede ser cualquier agente de isotonicidad farmacéuticamente aceptable. Este término se emplea en la técnica de modo intercambiable con un agente iso-osmótico, y es un compuesto que se añade a la preparación farmacéutica para aumentar la presión osmótica, por ejemplo, en algunas realizaciones, hasta la que tiene una disolución de cloruro de sodio al 0,9%, que es iso-osmótica con los fluidos extracelulares humanos, tales como el plasma. Los agentes de isotonicidad preferidos son cloruro de sodio, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa y glicerol.

La preparación farmacéutica puede comprender opcionalmente un conservante. Los conservantes habituales incluyen los seleccionados del grupo que consiste en clorobutanol, parabenos, timerosol, alcohol bencílico, y fenol. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a clorobutanol (al 0,3-0,9% en p/v), parabenos (al 0,01-5,0%), timerosal (al 0,004-0,2%), alcohol bencílico (al 0,5-5%), fenol (al 0,1-1,0%), y similares.

El amlexanox puede formularse con un humectante para proporcionar una sensación en la boca agradable en aplicaciones orales. Los humectantes conocidos en la técnica incluyen colesterol, ácidos grasos, glicerina, ácido láurico, estearato de magnesio, pentaeritritol, y propilenglicol.

Puede incluirse un agente emulgente en las formulaciones, por ejemplo, para asegurar la disolución completa de todos los excipientes, en especial los componentes hidrófobos, tales como alcohol bencílico. En la técnica se conocen muchos emulgentes, por ejemplo, polisorbato 60.

Con respecto a la administración oral, puede resultar deseable añadir un agente aromatizante y/o edulcorante farmacéuticamente aceptable. Los compuestos tales como sacarina, glicerina, jarabe simple y sorbitol son útiles como edulcorantes.

El amlexanox se ha empleado como comprimido oral (por ejemplo, comprimidos de 25 mg) en Japón para el tratamiento del asma bronquial y como pasta oral tópica en EE. UU. (Aphthasol) para el tratamiento de úlceras aftosas (úlceras en la boca). Puede utilizarse cualquiera de estas formulaciones para las indicaciones descritas en el presente documento. En otros casos pueden usarse formulaciones diferentes. Aphthasol contiene amlexanox al 5% en una pasta oral adhesiva. Cada gramo de la pasta oral de color beige contiene 50 mg de amlexanox en una pasta base oral adhesiva que consiste en alcohol bencílico, gelatina, monoestearato de glicerilo, aceite mineral, pectina, vaselina y carboximetilcelulosa sodio.

Puede administrarse una dosis única de amlexanox a un sujeto. En otros casos se administran múltiples dosis a lo largo de dos o más momentos, separados por horas, días, semanas, etc. En algunos casos, los compuestos se administran a lo largo de un periodo de tiempo largo (por ejemplo, de modo crónico), por ejemplo, durante un periodo de meses o años (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más meses o años). En estos casos, los compuestos pueden tomarse sobre una base programada regular (por ejemplo, a diario, cada semana, etc.) durante la duración del periodo largo.

La presente tecnología en general se refiere a composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden amlexanox. Más en concreto, la presente tecnología se refiere a un medicamento oral, un suplemento dietético, un suplemento nutricional, un suplemento alimentario, un aditivo alimentario, un producto farmacéutico, un producto nutracéutico o una formulación nutraterapéutica.

La tecnología proporcionada en el presente documento también incluye kits para su uso en los procedimientos descritos. Los kits de la tecnología comprenden uno o más recipientes que comprenden amlexanox, uno de sus derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o un segundo agente y, en algunas variaciones, comprenden además instrucciones para su uso según cualquiera de los procedimientos proporcionados en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción para seleccionar un tratamiento adecuado individual. Las instrucciones suministradas en los kits de la tecnología generalmente son instrucciones escritas sobre una etiqueta o un inserto en el paquete (por ejemplo, un inserto de papel incluido en el kit), pero también se contemplan instrucciones de lectura por máquina (por ejemplo, instrucciones soportadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico). En algunos casos, el kit es un envase que contiene un recipiente sellado que comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, junto con instrucciones para su uso. El kit puede incluir también un recipiente de diluyente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable. El kit puede comprender además instrucciones para mezclar la preparación y el diluyente. El diluyente puede ser cualquier diluyente farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes conocidos incluyen disolución de dextrosa al 5% y disolución salina fisiológica. El recipiente puede ser una bolsa de infusión, una botella sellada, un vial, un vial con un septo, una ampolla, una ampolla con un septo, una bolsa de infusión o una jeringa. Los recipientes pueden incluir opcionalmente indicios que indican que los recipientes han sido sometidos a autoclave o sometidos a otras técnicas de esterilización. El kit puede incluir instrucciones para administrar las diversas disoluciones contenidas en los recipientes a los sujetos.

La tecnología también describe procedimientos de tratamiento con amlexanox o una de sus sales. Según otro aspecto de la tecnología, se describe un procedimiento para tratar un sujeto que necesita dicho tratamiento con una cantidad eficaz de amlexanox o una de sus sales. El procedimiento implica administrar al sujeto una cantidad eficaz de amlexanox, o una de sus sales, en una cualquiera de las preparaciones farmacéuticas descritas anteriormente y/o detalladas en el presente documento y/o indicadas en las reivindicaciones. El sujeto puede ser cualquier sujeto que necesite dicho tratamiento. En la anterior descripción, la tecnología se refiere al amlexanox o a sus sales. Dichas sales incluyen, pero no se limitan a sales bromuro, sales cloruro, sales yoduro, sales carbonato y sales sulfato. Sin embargo, debe entenderse que el amlexanox es un miembro de una clase de compuesto, y está previsto que la tecnología incluya las preparaciones farmacéuticas, los procedimientos y los kits que contienen los derivados relacionados dentro de esta clase. Por tanto, otro aspecto de la tecnología incluye el anterior sumario pero considerando, en cada aspecto, que cada vez que aparece "amlexanox", este pueda sustituirse por cualquiera de dichos derivados.

Un sujeto puede ensayarse para evaluar la presencia, la ausencia o el nivel de una enfermedad (por ejemplo, obesidad y/o un trastorno relacionado que incluye, pero no se limita a la resistencia a la insulina, diabetes, esteatosis, hepatitis esteatótica no alcohólica y aterosclerosis), por ejemplo, ensayando o midiendo un biomarcador, un metabolito, un síntoma físico, una indicación, etc., para determinar el riesgo o la presencia de obesidad y/o un trastorno relacionado que incluye, pero no se limita a la resistencia a la insulina, diabetes, esteatosis, hepatitis esteatótica no alcohólica y aterosclerosis, y después el sujeto se trata con amlexanox basándose en el resultado del ensayo. Un paciente puede ensayarse, tratarse y después volverse a ensayar para controlar la respuesta a la terapia. Los ciclos de ensayo y tratamiento pueden realizarse sin limitarse al patrón de ensayo y tratamiento (por ejemplo, ensayo/tratamiento, ensayo/tratamiento/ensayo, ensayo/tratamiento/ensayo/tratamiento, ensayo/tratamiento/ensayo/tratamiento/ensayo, ensayo/tratamiento/tratamiento/ensayo/tratamiento/tratamiento, etc.), la periodicidad o la duración del intervalo entre cada fase de ensayo y tratamiento.

Ejemplos

Procedimientos

45 Reactivos

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri), a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos anti-IKK ϵ , anti-TBK1, Fosfo-TBK1 (ser172), anti-IKK α/β , fosfo-IKK α/β ser176/177) anti-AKT, fosfo-AKT (ser473), anti-S6K, fosfo-S6K (thr389), anti-S6, fosfo-S6 (ser235/236), anti-IRF3, fosfo-IRF3 (ser396), anti-HSL, fosfo-HSL (ser563 o ser660), y anti-PPAR γ se adquirieron en Cell Signaling (Danvers, Massachusetts). El anticuerpo anti-Ra1A se obtuvo en BD Bioscience (San José, California). El anticuerpo anti-UCP1 se obtuvo en Alpha Diagnostics (San Antonio, Texas). Los reactivos de quimioluminiscencia potenciada ("enhanced chemiluminescence", ECL) se obtuvieron en NEN, Inc. El comprimido de inhibidor de proteasa sin EDTA se adquirió en Roche Diagnostics (Indianápolis, Indiana).

55 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se emplearon formulaciones concretas de amlexanox. Por ejemplo, en los experimentos descritos, el amlexanox se solubilizó en NaOH, el pH de la disolución se ajustó a 7,6 con Tris 1 M, pH 7,4, y el volumen se ajustó con agua destilada

sometida a autoclave. La concentración final de NaOH es equimolar con la concentración de amlexanox. Como ejemplo específico, para preparar 20 ml de una disolución de amlexanox 20 mg/ml, se disolvieron 400 mg de amlexanox en 10 ml de NaOH 132 mM, y después se añadieron 5,2 ml de Tris 1 M, pH 7,4, y 4,8 ml de agua. La disolución de amlexanox se esterilizó a través de un filtro de 0,2 micrómetros. El control de vehículo se preparó con el mismo tampón y sin amlexanox. Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología descritas en el presente documento, se administró amlexanox a los sujetos de ensayo. Por ejemplo, en algunos de los experimentos descritos, el amlexanox se administra a los ratones mediante sonda gástrica.

Animales y sus cuidados

Ratones macho C57BL/6 de tipo salvaje se alimentaron con una dieta con alto contenido en grasas de 45% de calorías de grasa (D12451 Research Diets Inc., New Brunswick, Nueva Jersey) comenzando a las 8 semanas de edad durante 12-24 semanas, mientras que se mantuvieron controles C57BL/6 con una dieta de pienso normal que consiste en 4,5% de grasa (5002 Lab Diet, Filadelfia, Pensilvania). Se proporcionaron las dietas que contenían ácidos grasos ω -3 como se describió previamente 24. El tratamiento con rosiglitazona se administró durante tres semanas mediante la adición del compuesto a la dieta en ratones que habían recibido HFD durante 16 semanas. Cada ratón consumió un promedio de 3,5 mg/kg de rosiglitazona diarios. El amlexanox se administró a diario mediante sonda gástrica. Para los grupos de prevención, la administración de amlexanox (25 mg/kg o 100 mg/kg) comenzó al mismo tiempo que la alimentación HFD a las 8 semanas de edad. Para los grupos de tratamiento, el tratamiento con amlexanox 25 mg/kg comenzó a las 20 semanas de edad después de 12 semanas de HFD. Para ensayar el efecto del abandono del amlexanox, los ratones en el grupo de tratamiento fueron cambiados de sonda gástrica de amlexanox a control de vehículo después de 8 semanas de tratamiento con amlexanox. Ratones control y ob/ob se mantuvieron con una dieta de pienso normal y se les introdujo con sonda oral amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo comenzando a las 10 semanas de edad. Los animales se alojaron en unas instalaciones específicas sin patógenos con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y tuvieron acceso libre al alimento y al agua. El tratamiento dado a los animales se ajustó a the Institute of Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y fue aprobado por the University Committee on Use and Care of Animals at the University of Michigan and UCSD.

Ensayos fisiológicos y ensayos bioquímicos

Se emplearon ensayos fisiológicos concretos durante el desarrollo de la tecnología proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, en algunos de los experimentos descritos a continuación, los sujetos se ensayaron para la tolerancia a la insulina y la glucosa inyectada según los procedimientos descritos en *et al.* ("The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice", *Cell* (2009), 138:961-975, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines). En algunos de los experimentos descritos a continuación, los sujetos se ensayaron para la tolerancia a la glucosa oral. En particular, los ratones se dejaron en ayunas durante 6 horas antes de los estudios. Para los ratones ob/ob, se administraron por sonda gástrica 1,0-1,5 mg/g de glucosa y se midió la glucosa en sangre con un glucómetro (por ejemplo, glucómetro OneTouch Ultra). La medición de los triglicéridos, el ARNm y las citoquinas se realizó según los procedimientos descritos en Chiang *et al.* (The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice, *Cell* (2009), 138:961-975).

Ingesta de alimentos

El peso remanente de los alimentos proporcionados se determinó a diario para cada ratón alojado individualmente. El consumo diario de alimentos se calculó a partir de un promedio de tres días.

Gasto de energía y cociente respiratorio

Los ratones C57B16 en el grupo de tratamiento con amlexanox se colocaron en jaulas metabólicas. El servicio University of Michigan Animal Metabolic Phenotyping Core mide el consumo de oxígeno (VO₂), la producción de dióxido de carbono (VCO₂) y la actividad motora espontánea durante 3 días consecutivos empleando el sistema Comprehensive Laboratory Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments), un calorímetro de circuito abierto integrado equipado con un sistema de control de la actividad de haz óptico. Se calculó el cociente respiratorio dividiendo la producción de dióxido de carbono entre el consumo de oxígeno. Se emplearon los valores promedio para los ciclos de luz y oscuridad para analizar la significancia estadística.

Composición corporal

El servicio University of Michigan Animal Phenotyping Core emplea un análisis de RMN para cuantificar la grasa corporal, la masa corporal magra y el contenido en fluidos en ratones ob/ob y ratones C57BL/6 en el grupo de tratamiento con amlexanox.

Temperatura interna corporal

Las mediciones de la temperatura rectal se realizaron empleando un termómetro de precisión YSI 4600 (YSI, Inc., Yellow Springs, Ohio).

Análisis de la química sanguínea

5 Se midió la glucosa en sangre mediante un glucómetro OneTouch Ultra. Se aisló el plasma de ratones en ayunas durante seis horas a partir de sangre completa recogida en tubos heparinizados. Se midieron las concentraciones de insulina con un kit ELISA de insulina (Crystal Chem Inc., Downers Grove, Illinois). Se midieron los niveles de leptina y adiponectina mediante kits ELISA adquiridos en Cayman Chem Inc. (Ann Arbor, Michigan). Se cuantificaron los niveles de citoquinas empleando la tecnología Luminex en una placa de un panel de múltiples analitos adquirida en Millipore (Billerica, Massachusetts). Además se midieron los niveles de TNF α empleando kits
10 ELISA adquiridos en R&D Systems (Minneapolis, Minnesota).

Ensayos de tolerancia a insulina y glucosa

Para los ensayos de tolerancia a la glucosa, después de un ayuno de seis horas, los ratones recibieron glucosa por sonda gástrica a una dosis de 1,5 g/kg (ratones C57BL/6) o 1,2 g/kg (ratones ob/ob). Para los ensayos de tolerancia a la insulina, los ratones se dejaron en ayunas durante tres horas y después recibieron una inyección
15 intraperitoneal de insulina (1,2 unidades/kg para ratones C57BL/6, y 2,0 unidades/kg para ratones ob/ob). Se midió la glucosa en sangre basal, a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos de sangre de la cola empleando el glucómetro One Touch Ultra (Lifescan, Milpitas, California).

Contenido en lípidos hepáticos

20 Los lípidos hepáticos se aislaron como se ha descrito previamente (Norris et. al., 2003) y se midieron los niveles de triglicéridos con el kit Triglyceride Reagent.

Contenido en glucógeno hepático

La determinación del glucógeno en el hígado se realizó como sigue. Brevemente, se digirió tejido hepático en una disolución de hidróxido de potasio al 30% y después el glucógeno se precipitó empleando etanol. Después de tres lavados para eliminar cualquier rastro de glucosa, el glucógeno se digirió mediante la adición de amiloglucosidasa.
25 La glucosa liberada se cuantificó empleando un kit colorimétrico (Wako, Richmond, Virginia).

Fracción vascular estromática ("stromal vascular fraction", SVF) y aislamiento de adipocitos

El tejido WAT extirpado se digirió en PBS que contenía BSA al 1% y colagenasa de tipo II 1 mg/ml durante 30 minutos a 37 °C con agitación suave. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de 100 μ m y después se centrifugó a 700 x g durante 5 minutos para separar los adipocitos flotantes del sedimento de SVF. Los adipocitos
30 flotantes se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 1% y el sedimento de SVF se recogió después de cada lavado.

Análisis de la transferencia Western

Los tejidos se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, sacarosa 250 mM, NP40 al 1%, DTT 2 mM, vanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, y un comprimido de inhibidor de proteasa recién añadido), y después se incubaron durante una hora a 4 °C. Los lisados brutos después se centrifugaron a 14,000 x g durante 15 minutos dos veces y se determinó la concentración de proteínas empleando un reactivo de ensayo de proteínas de BioRad. Las muestras se diluyeron en tampón de muestras de dodecilsulfato de sodio (SDS). Las proteínas unidas se resolvieron mediante una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se trasladaron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hércules, California). Se detectaron las
40 proteínas individuales con los anticuerpos específicos y se visualizaron sobre una película empleando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Bio-Rad, Hércules, California) y quimioluminiscencia potenciada con Western Lightning (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts).

Histoquímica

45 Los tejidos se fijaron en formaldehído durante 3 días. Se realizó una histología en el laboratorio de University of Michigan Cancer Center Research Histology Laboratory.

Análisis de la expresión de genes

Se aislaron tejidos de ratón, se enjuagaron en disolución salina tamponada con fosfato ("Phosphate Buffered Saline", PBS), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta la extracción. Se extrajo el ARN total de tejidos de hígado, WAT y BAT, así como las células 3T3-L1 diferenciadas empleando el kit de lípidos en

tejidos RNeasy (Qiagen, Valencia, California) según las instrucciones del fabricante con la inclusión de una etapa de digestión con ADNasa. El ARN total se extrajo de las células BMDM y SVF empleando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, California) con una etapa de ADNasa. Se empleó el sistema de síntesis de primera hebra Superscript para RTPCR (Invitrogen, Grand Island, Nueva York) con cebadores aleatorios para la transcripción inversa. Se realizó una amplificación con PCR a tiempo real del ADNc en muestras por triplicado con una mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad, California) empleando el sistema de PCR a tiempo real Applied Biosystems 7900HT Fast. Se eligió Adrp o GAPDH como control interno para la normalización después de la selección de varios genes candidatos; su expresión no se vio significativamente afectada por las condiciones experimentales. Los datos se analizaron empleando el procedimiento $2^{-\Delta\Delta CT}$, y se determinó la significancia estadística empleando el ensayo de la t de Student heterocedástico desapareado con un valor de muestra promediado por ratón.

Tasa de oxidación de lípidos

Se extirpó el BAT intraescapular y se colocó en DMEM con BSA al 2% con y sin amlexanox 5 μ M, y después se incubó 37 °C durante 1 hora, tras lo cual el medio se cambió a DMEM con BSA al 2%, carnitina 0,25 mM, ácido palmítico y ácido 3H-palmítico 0,2 mM y se incubó durante una hora más a 37 °C y después se recogió el medio y se aisló la fracción acuosa. Se determinó la oxidación de los lípidos mediante la conversión del ácido 3H-palmítico en 3H₂O.

Ensayos de quinasas IKK ϵ y TBK1 *in vitro*

Los ensayos de quinasas *in vitro* se realizaron mediante incubación con quinasa purificada (IKK ϵ o TBK1) en tampón quinasa que contenía Tris 25 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, y ATP 10 μ M durante 30 minutos a 30 °C en presencia de γ -[32P]-ATP 0,5 μ Ci y 1 μ g de proteína básica de mielina (MBP) por muestra como sustrato. La reacción de quinasa se detuvo mediante la adición de 4X tampón de muestras de dodecilsulfato de sodio (SDS) e hirviendo durante 5 minutos a 95 °C. Los sobrenadantes se resolvieron mediante una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, se trasladaron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron mediante una autorradiografía empleando un analizador de radiactividad en placa Typhoon 9410 (GE Lifesciences, Piscataway, Nueva Jersey). Las bandas se cuantificaron empleando ImageQuant.

Ensayo de quinasas inmunocomplejadas IKK ϵ y TBK1

Se recogieron los tejidos adiposos blanco y hepático de ratones C57BL/6 que recibieron pienso normal o una dieta con alto contenido en grasas. Los tejidos se homogeneizaron empleando un homogeneizador Dounce con tampón de lisis que contenía Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 5 mM, β -glicerofosfato 25 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, DTT 1 mM, y PMSF 1 mM en presencia de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Los lisados de las células de los tejidos se incubaron durante 1 hora a 4 °C y se aclararon mediante una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga de mesa. Cada 1 mg del lisado se sometió a una inmunoprecipitación empleando 5 μ l de anticuerpo policlonal de conejo contra TBK1 o IKK ϵ durante 1,5 horas a 4 °C. Los inmunocomplejos se recogieron mediante una incubación con esferas ProtA (Roche Diagnostics, Indianápolis, Indiana) durante 2 horas a 4 °C. Los inmunoprecipitados se lavaron a fondo una vez con tampón de lisis y tres veces con tampón de lavado que contenía Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 50 mM, β -glicerofosfato 20 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 5 mM, MgCl₂ 10 mM, y DTT 1 mM. Se realizó un ensayo de quinasas *in vitro* empleando las quinasas inmunoprecipitadas según se describió anteriormente. Se detectaron los niveles relativos de fosforilación de MBP mediante una autorradiografía y se normalizaron a los niveles de quinasas IKK ϵ o TBK1 detectados en el inmunoprecipitado mediante inmunotransferencia.

Cultivo celular y transfección

Se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) y se diferenciaron empleando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Las células se emplearon habitualmente en los 7 días después de que finalizase el proceso de diferenciación; solo se emplearon los cultivos en los que >90% de las células mostraban una morfología de adipocitos. Los adipocitos 3T3-L1 se ayunaron de suero con suero bovino fetal al 0,5% ("fetal bovine serum", FBS) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) antes del tratamiento. Se realizaron los tratamientos con TNF α (50 ng/ml a menos que se indique lo contrario) durante las 24 horas antes de la recolección, después de un pretratamiento con el compuesto VIII inhibidor de IKK β (EMD Biosciences, Filadelfia, Pensilvania) durante 1 hora cuando resultó pertinente. Los adipocitos 3T3-L1 se pretrataron durante 1 hora con amlexanox a las concentraciones indicadas y después se trataron con 20 μ g/ml de poli I:C durante 1 hora. Como alternativa, los adipocitos 3T3-L1 se trataron con forskolina 50 μ M durante 15 minutos, después de un pretratamiento con amlexanox durante 30 minutos. Las células se trataron con o sin 10 nM de insulina durante 15 minutos. Las células RAW264.7 se ayunaron de suero con medio FBS DMEM al 0,5% y se

pretrataron con o sin Cay-10576 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan). Las células después se trataron con LPS (0,5 µg/ml) o poli I:C (50 µg/ml) durante 1 hora. Las células se recolectaron para el ARN total y se analizaron mediante una PCR a tiempo real. Los lisados celulares se resolvieron en una SDS-PAGE y se analizaron mediante una inmunotransferencia empleando los anticuerpos indicados.

5 **Estadísticas**

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se emplearon análisis estadísticos para evaluar los datos. Por ejemplo, los datos se evaluaron empleando el ensayo de la *t* de Student. En las figuras que muestran los datos recogidos durante el desarrollo de la tecnología, los datos con un valor de *p* menor que 0,05 están marcados con un único asterisco (*) y los datos con un valor de *p* menor que 0,01 están marcados por dos asteriscos (**). Además, en las figuras que muestran los datos recogidos durante el desarrollo de la tecnología, las barras de error indican el error estándar de la media (E.E.M.) de los datos.

Formación de modelos moleculares del amlexanox en el sitio de unión de ATP de IKKε

Se determinó la estructura de IKKε mediante formación de modelos de homología empleando la estructura cristalina de alta resolución del dominio quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (identidad de secuencia del 56%) como la estructura de molde (n.º de registro PDB 1P38). El complejo de amlexanox con IKKε se modeló basándose en la estructura cristalina de la MAP quinasa p38 complejada con un inhibidor competitivo de ATP (2-aminofenilaminodibenzosuberona) (n.º de registro PDB 3ZYA).

Ejemplo 1

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox bloquea la actividad IKKε y TBK1. Tal como se muestra en la figura 1, la actividad quinasa de ambas IKKε y TBK1 disminuye con dosis crecientes de amlexanox. El análisis de las curvas de dosis-respuesta demuestra que el amlexanox bloquea la actividad IKKε y TBK1 con una CI_{50} de aproximadamente 1-2 µM. El amlexanox no produce ningún efecto sobre IKKα o β a estas concentraciones ni bloquea otras de un amplio panel de quinasas que representan a la mayoría de las familias.

Ejemplo 2

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox compete con el ATP por la unión a IKKε. La figura 2 muestra una gráfica doble recíproca de la actividad del amlexanox frente a la concentración de ATP en presencia de tres concentraciones diferentes de amlexanox. La fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP) por IKKε se midió a tres concentraciones diferentes de amlexanox y tres concentraciones diferentes de ATP. La recíproca de la actividad medida se representó gráficamente frente a la recíproca de la concentración de ATP. A medida que aumenta la concentración de amlexanox, la pendiente de la línea que se ajusta a los datos cambia, pero no intersección de *y*, lo cual resulta coherente con un modo competitivo de inhibición enzimática.

TBK1 e IKKε comparten una similitud de secuencia del 65% y son 72% idénticas en la región de unión al ATP. La inhibición de IKKε o TBK1 por el amlexanox es competitiva para su sustrato ATP, lo cual indica que interacciona con las enzimas en el sitio de unión a ATP. Esto resulta coherente con un modelo del compuesto alojado en el presunto bolsillo de unión a ATP de IKKε (véase a continuación), basado en la estructura de p38.

Ejemplo 3

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se empleó una formación de modelos por ordenador para estudiar la interacción del amlexanox con IKKε. El presunto sitio de unión a ATP de IKKε tiene el tamaño y la geometría apropiados para alojar la molécula de amlexanox.

Ejemplo 4

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox evita la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta con alto contenido en grasas. Ratones C57B1/6 se alimentaron con una dieta de 45% de grasa y recibieron por sonda gástrica diariamente amlexanox 25 o 100 mg/kg. Los controles consistieron en ratones alimentados con pienso normal que recibieron por sonda gástrica diariamente un vehículo, y ratones alimentados con dietas con un alto contenido en grasa que recibieron por sonda gástrica diariamente un vehículo. Después de 12 semanas con la dieta de 45% de grasas, los ratones recibieron una dieta de 60% de grasas. El peso corporal de los ratones se controló a lo largo del experimento durante 18 semanas. Tal como se muestra en la figura 3, el tratamiento de los animales con cualquiera de las dosis de amlexanox evitó la ganancia de peso producida por una dieta con alto contenido en grasas. Después de cambiar los ratones a la dieta de 60% de grasas, el amlexanox siguió evitando una ganancia

de peso sustancial a ambas dosis.

En otros experimentos, ratones C57B1/6 se alimentaron con una dieta de 45% de grasa y recibieron por sonda gástrica diariamente un control de vehículo o amlexanox 25 o 100 mg/kg. Los pesos de los ratones se controlaron tal como se muestra en la figura 4. Los ratones alimentados con pienso normal y que recibieron por sonda gástrica un vehículo se emplearon como control magro. El tratamiento de los animales con cualquiera de las dosis de amlexanox evitó la ganancia de peso producida por una dieta con alto contenido en grasas; los ratones tratados con el fármaco mantuvieron unos pesos equivalentes a los de los ratones con dieta control a lo largo de 12 semanas. El fármaco no produjo ningún efecto sobre la ingesta de alimento al principio ni al final del estudio.

Ejemplo 5

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox produce una pérdida de peso después de haber producido una obesidad inducida por la dieta. Los ratones se alimentaron con una dieta de 45% de grasas (alto contenido en grasas) durante 12 semanas y después se trataron con 25 mg/kg de amlexanox durante 3 semanas. Los ratones control se alimentaron con una dieta de 45% de grasas durante 12 semanas y después se trataron con control de vehículo durante 3 semanas. Tal como se muestra en las figuras 5a, el amlexanox produce una pérdida de peso de 10 g después de tan solo 4 semanas de tratamiento. El amlexanox produce este efecto sin una reducción simultánea en la ingesta de alimentos (véase la figura 5b).

Para determinar si los efectos del fármaco con reversibles, el tratamiento con amlexanox se detuvo después de 8 semanas de tratamiento, tras las cuales los ratones recibieron un control de vehículo. Los ratones recuperaron rápidamente el peso que habían perdido y volvieron a sus pesos control 6-8 semanas después de haber detenido el tratamiento (figura 5c). La pérdida de peso durante la fase de tratamiento vino acompañada de una reducción en más de 6 gramos de masa global de tejido adiposo, así como de una disminución del 80% de los niveles de leptina en ayunas, mientras que los triglicéridos en suero, los ácidos grasos libres y el colesterol permanecieron sin cambios (figura 5d).

En la figura 5, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Ejemplo 6

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox produce una pérdida de peso y una mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en ratones Ob/ob. Los ratones Ob/ob son genéticamente obesos debido a la falta del gen que codifica el factor de saciedad leptina. Los ratones Ob/ob se trataron con amlexanox 100 mg/kg o con vehículo como control, y el peso corporal de los ratones se controló (figura 6b). Aunque el tratamiento no produjo ningún efecto sobre la ingesta de alimento (figura 6a), el amlexanox produjo una pérdida de peso de 7-8 g después de 4 semanas de tratamiento y produjo una reducción del 25% en los niveles de glucosa en ayunas (figura 6c). El amlexanox también provocó una disminución significativa en la masa de tejido adiposo en estos ratones y un aumento en los niveles de adiponectina en la circulación. En la figura 6, los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

En otros experimentos, se evaluó la homeostasis de la glucosa en un modelo de resistencia a la insulina en ratones obesos. Se trataron ratones con obesidad inducida por la dieta con amlexanox 25 mg/kg o control de vehículo durante 8 semanas antes o después de haber establecido la obesidad, seguido de la evaluación de los parámetros metabólicos. Los ratones tratados con amlexanox junto con una dieta con alto contenido en grasas presentaron una tolerancia a la glucosa notablemente mejorada, con una reducción de aproximadamente 30-40% en el área bajo la curva para la glucosa (figura 6d). La obesidad inducida por la dieta provoca que los niveles de glucosa en sangre y de insulina en suero en ayunas aumenten significativamente (figura 6e). El tratamiento de ratones con amlexanox después de establecer una obesidad inducida por la dieta revierte el aumento en la insulina en suero en ayunas provocado por una dieta con un alto contenido en grasas, lo cual sugiere que se ha mejorado la sensibilidad a la insulina. Los ensayos de tolerancia a la insulina demuestran que el fármaco produce una mejora en la sensibilidad a la insulina. El amlexanox aumenta notablemente la sensibilidad a la insulina en ratones con una obesidad inducida por la dieta establecida, tal como indica el restablecimiento de la respuesta a la insulina hasta niveles de una dieta normal (figura 6f). El fármaco no afecta a la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta normal.

Tomados conjuntamente, estos efectos son comparables a lo que se observa con los fármacos sensibilizantes de la insulina establecido, tales como tiazolidindionas o metformina, lo cual demuestra que el amlexanox actúa como un sensibilizante de la insulina.

Ejemplo 7

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el tratamiento con amlexanox produce un aumento en la tolerancia a la glucosa. A lo largo de un periodo de 8 semanas, ratones Ob/ob se trataron con amlexanox 100 mg/kg o con vehículo como control, y se ensayaron para la tolerancia a la glucosa oral. A lo largo de un periodo de 8 semanas, la tolerancia a la glucosa aumentó notablemente en los ratones tratados con fármaco, tal como se demuestra por la reducción de 30-40% en el área bajo la curva para ratones tratados con fármaco con relación a ratones control (figura 7a).

10 Experimentos similares ensayaron la tolerancia a la glucosa inyectada. A lo largo de un periodo de 5 semanas, ratones Ob/ob se trataron con amlexanox 100 mg/kg o con vehículo como control, y se ensayaron para la tolerancia a la glucosa inyectada. Tal como puede observarse en la figura 7b, los ratones tratados con amlexanox mostraron una eliminación más rápida de la glucosa en sangre después de la inyección. En la figura 7, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Ejemplo 8

15 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el tratamiento con amlexanox produce un aumento en la sensibilidad a la insulina. A lo largo de un periodo de 8 semanas, ratones Ob/ob se trataron con amlexanox 100 mg/kg o con vehículo como control, y se ensayaron para la tolerancia a la insulina inyectada. A lo largo de un periodo de 8 semanas, la sensibilidad a la insulina aumentó notablemente en los ratones tratados con fármaco, tal como se demuestra por el restablecimiento de la respuesta a la insulina en ratones tratados con fármaco con relación a ratones control (figura 8). Los efectos observados en los ejemplos 7 y 8 son similares a los efectos observados en las terapias de sensibilización a la insulina convencionales. En la figura 8, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Ejemplo 9

25 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox mejora la esteatosis hepática en ratones alimentados con una dieta con alto contenido en grasas. Se trataron ratones con obesidad inducida por la dieta con amlexanox 25 mg/kg o control de vehículo durante 8 semanas. Después los ratones se sacrificaron y se estudiaron los hígados. La hepatomegalia que normalmente se observa en ratones alimentados con una dieta de alto contenido en grasas fue en gran parte revertida por el fármaco, con una reducción mayor que 20% en el peso del hígado (figura 9a). Además, el contenido en triglicéridos del hígado se redujo en más del 50% en los ratones tratados con amlexanox, comparado con el control de vehículo (figura 9a). Además, los niveles de glucógeno hepático, que son altos en ratones alimentados con una dieta con un alto contenido en grasas, fueron menores en los ratones tratados con amlexanox, comparado con los ratones alimentados con una dieta con un alto contenido en grasas control (figura 9b). De modo interesante, estas reducciones beneficiosas en los lípidos hepáticos resultaron revertidas en los hígados de los ratones que habían abandonado el fármaco y continuaron con la dieta con alto contenido en grasas, según se detectó en secciones de tejidos teñidas.

40 Los ratones con IKKe inactivada no desarrollaron hígado graso, también denominado esteatosis hepática, con una dieta con alto contenido en grasas cuando se comparan con ratones control. Para determinar si el amlexanox puede imitar este efecto de delección del gen IKKe se trataron ratones Ob/ob con amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo durante 14 semanas. Al final del periodo de tratamiento, los ratones se sacrificaron y los hígados se estudiaron (figura 9c). La hepatomegalia normalmente observada en ratones ob/ob fue en gran parte revertida por el fármaco, con una reducción mayor que 20% en el peso del hígado (figura 9c). Además, el contenido en triglicéridos del hígado se redujo en más del 50% en los ratones tratados con amlexanox (figura 9d). En la figura 9 los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Ejemplo 10

50 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el tratamiento con amlexanox produce un tamaño reducido de las gotas de triglicéridos en el hígado. Se trataron ratones Ob/ob con amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo durante 14 semanas. Al final del periodo de tratamiento, los ratones se sacrificaron y los hígados se estudiaron empleando tinción con H & E. En los ratones Ob/ob control resultaron evidentes grandes gotas de lípidos. Estas estaban muy diseminadas en los hígados de los ratones tratados con amlexanox, lo cual resulta coherente con la reducción en los triglicéridos y en el peso del hígado observada en el ejemplo 8.

Además, los ratones con obesidad inducida por la dieta se trataron con amlexanox 25 mg/kg o control de vehículo

durante 8 semanas. Después los ratones se sacrificaron y se estudiaron los hígados mediante tinción con H & E. En los ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con control de vehículo fueron evidentes grandes gotas de lípidos. Estas estaban muy diseminadas en los hígados de los ratones tratados con amlexanox, lo cual resulta coherente con la importante reducción en los triglicéridos, el glucógeno y el peso del hígado.

5 Ejemplo 11

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el tratamiento con amlexanox produce una expresión reducida de ciertos genes lipogénicos clave. Se trataron ratones Ob/ob con amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo durante 14 semanas. Al final del periodo de tratamiento los ratones se sacrificaron y se midieron los niveles de ARNm en el hígado para determinar la acetil CoA carboxilasa ("acetyl CoA carboxylase", ACC), ácido graso sintasa ("fatty acid synthase", FAS), y estearil CoA desaturasa ("stearyl CoA desaturase", SCD1). Tal como se muestra en la figura 10, la expresión de estos genes se redujo en ratones tratados con amlexanox, comparado con los ratones control tratados con vehículo. En la figura 10, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01. Experimentos similares en ratones con obesidad inducida por la dieta demostraron que las mediciones genéticas de la hepatoesteatosis se redujeron de modo similar.

Ejemplo 12

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el tratamiento con amlexanox produce una expresión reducida de varias citoquinas inflamatorias en el hígado (figuras 11a). Se trataron ratones Ob/ob con amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo durante 14 semanas. Al final del periodo de tratamiento, los ratones se sacrificaron y se midieron los niveles de ARNm en el hígado para determinar el TNF α , IL-10, MIP1 α , Rantes, y marcadores de la infiltración de macrófagos (F4/80 y Cd11c). Tal como se muestra en la figuras 11a y 11b, la expresión de estos genes se redujo en ratones tratados con amlexanox, comparado con los ratones control tratados con vehículo. En la figura 11, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Ejemplo 13

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se descubrió que el amlexanox reduce la inflamación crónica en el tejido adiposo de ratones Ob/ob. Se trataron ratones Ob/ob con amlexanox 100 mg/kg o control de vehículo durante 12 semanas. Al final del tratamiento se estudió el tejido graso del epidídimo mediante tinción con H & E. El tratamiento con amlexanox redujo notablemente la infiltración de macrófagos inflamatorios en el tejido adiposo, comparado con los ratones tratados con vehículo de control. La reducción dependiente del amlexanox en la aparición de macrófagos en estructuras similares a coronas vino acompañada de una notable reducción en los niveles de ARNm en el tejido adiposo que codifican los genes inflamatorios clave de TNF α , MIP1 α , MCP-1, IL-10, Rantes, F4/80 y CD11c (figura 12a y 12b).

También se midieron los niveles de citoquinas en suero. Tal como se muestra en la figura 13, los niveles en la circulación de MCP-1 y Rantes no se vieron significativamente afectados por el tratamiento con amlexanox, pero los niveles de TNF α , IL-1 α y MIP1 α en suero resultaron notablemente reducidos. En las figuras 12 y 13, los datos marcados con un único asterisco (*) tienen un valor de p menor que 0,05 y los datos marcados por dos asteriscos (**) tienen un valor de p menor que 0,01.

Además, los niveles en suero de la citoquina antiinflamatoria IL-10 resultaron elevados en los ratones tratados con amlexanox, comparado con los controles. Se observó una mayor expresión de proteínas que aparecen enriquecidas en células grasas, tales como Glut4 y PPAR γ , que indican una mayor sensibilidad a la insulina, en WAT procedente de ratones tratados con amlexanox (figura 14). Los niveles de la proteína UCP-1 también resultaron aumentados en el tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con amlexanox, comparados con los controles tratados con vehículos y alimentados con una dieta con alto contenido en grasas (figura 15).

Ejemplo 14

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, los experimentos demostraron que la adición de amlexanox a adipocitos 3T3-L1 produce un aumento de la fosforilación de TBK1 en la serina 172, y un bloqueo de la fosforilación estimulada por poli(ácido inosínico):poli(ácido citidílico) (poli I:C) del factor-3 de respuesta a interferón ("interferon responsive factor-3", IRF3), un presunto sustrato de IKK ϵ y TBK1 26 (figura 16). Además, la adición del inhibidor de IKK ϵ /TBK1 previamente identificado Cay-10576 (cayman) 27 a macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS o poli I:C también bloquea la fosforilación de IRF3 y estimula la fosforilación de TBK1 en la serina 172 (figura 17). Esta

mayor fosforilación de TBK1 también se observó en macrófagos peritoneales derivados de ratones con IKK ϵ inactivado y es probable que sea debida a una inhibición retroalimentada de la vía 28, tal como se pone en evidencia por una mayor fosforilación de IKK β en células RAW tratadas con cayman.

Ejemplo 15

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se demostró con experimentos que el amlexanox provoca una pérdida de peso debida a un mayor gasto de energía. Se emplearon jaulas metabólicas para controlar el gasto de energía en ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con o sin el fármaco. Un tratamiento de cuatro semanas con amlexanox 25 mg/kg produjo un consumo de oxígeno significativamente aumentado comparado con el control de vehículo, lo cual resulta coherente con un
10 aumento en el gasto de energía (figura 18). El dióxido de carbono exhalado también aumentó significativamente, de modo que la proporción de intercambio respiratorio permaneció sin cambios, comparado con los ratones tratados con el control. Estos datos sugieren que el amlexanox induce un aumento en la termogénesis; para apoyarlo, se midieron las temperaturas rectales (figura 19). El tratamiento con amlexanox produjo un aumento en aproximadamente un grado en la temperatura corporal, comparado con ratones tratados con vehículo.

15 Ejemplo 16

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se demostró con experimentos que la administración de amlexanox regula la fosforilación y estimula el gasto de energía en el tejido adiposo. Tal como se describió anteriormente, el amlexanox es un inhibidor específico de IKK ϵ y TBK1. Para juzgar si el compuesto influye directamente a la fosforilación *in vivo*, se estudiaron una serie de proteínas conocidas por sufrir una hiperfosforilación en estados de obesidad. La fosforilación de proteínas en la vía de mTORC1, tales como S6K, aumentó en respuesta a una dieta con alto contenido en grasas; este aumento resultó en gran medida atenuado en los ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con amlexanox (figura 15, comparar pS6K en forma fosforilada con S6K en forma no fosforilada). El fármaco bloquea la inducción por una
20 dieta con alto contenido en grasas de la proteína IKK ϵ y también evita la fosforilación de TBK1 en el tejido adiposo. Este descubrimiento resulta coherente con el hecho de que la sobreexpresión del TBK1 de tipo salvaje, pero no quinasa inactivo, en las células aumenta la estimulación de la fosforilación de S6K por la insulina, mientras que la inactivación de IKK ϵ o TBK1 en adipocitos 3T3-L1 reduce la fosforilación de rS6 estimulada por insulina. En el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta con alto contenido en grasas se redujo la fosforilación de lipasas sensibles a hormonas, lo cual resulta coherente con la desensibilización conocida de la vía β -adrenérgica en este tejido durante la obesidad. El tratamiento con amlexanox evita la reducción en la fosforilación de lipasas sensibles a hormonas asociada con una dieta con alto contenido en grasas (figura 15, comparar pHSL en forma fosforilada con HSL en forma no fosforilada). Además, el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con amlexanox aumenta la tasa lipolítica basal y restablece la fosforilación de lipasas sensibles a hormonas estimulada por forskolina en células que han sido crónicamente tratadas con TNF α para inducir las actividades IKK ϵ y TBK1
30 (figura 20a y figura 20b). Sin embargo, el amlexanox no afectó a la infrarregulación de PPAR γ producida por el tratamiento con TNF α .

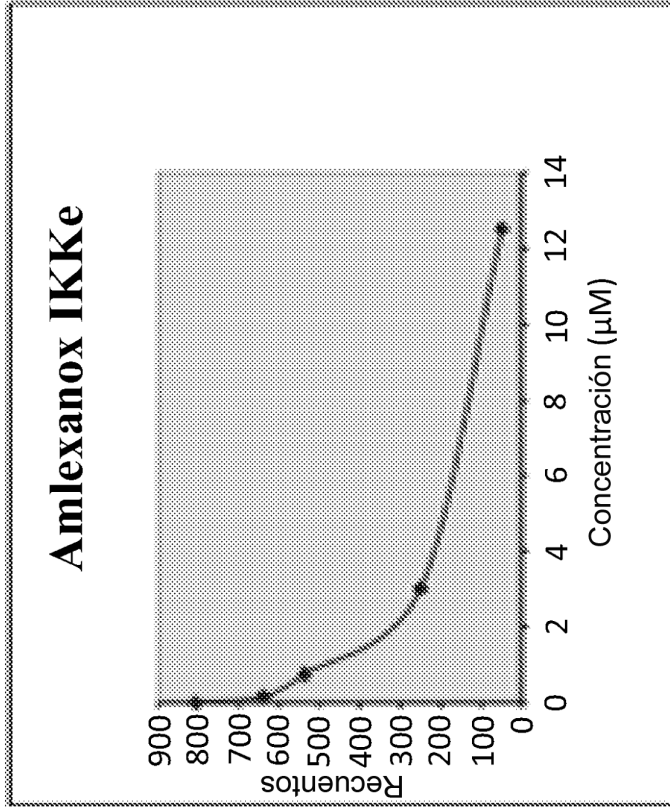
Debido a que el tejido adiposo marrón ("brown adipose tissue", BAT) puede desempeñar un papel principal en la termogénesis, se estudiaron los efectos del fármaco en este depósito de grasa. En ratones tratados con control alimentados con una dieta con alto contenido en grasas, el tejido adiposo marrón acumula grandes gotas de lípidos y adquiere algunas de las características de la grasa blanca. La grasa marrón vuelve a su aspecto normal en ratones tratados con amlexanox. Cuando se detiene el tratamiento con amlexanox, los lípidos de nuevo se acumulan en el BAT, revertiendo al fenotipo de dieta con alto contenido en grasas de los ratones obesos control. La expresión del marcador específico de la grasa marrón Cidea aumentó en ratones tratados con amlexanox (figura 21). Además, el tratamiento con amlexanox aumentó los niveles de la proteína UCP1 en la grasa marrón (figura 22), aunque no hubo aumento en los genes mitocondriales comparado con el control. Además, el tratamiento con amlexanox reduce los niveles de proteínas IKK ϵ y TBK1 en BAT (figura 23). También se observó una señalización reducida a lo largo de la vía de mTORC1 en el BAT de ratones tratados con amlexanox, comparado con los controles. Un tratamiento *ex vivo* con amlexanox estimula notablemente la oxidación de lípidos en explantes de BAT, lo cual apoya la existencia de un efecto directo del amlexanox sobre el gasto de energía
45 (figura 24).
50

REIVINDICACIONES

1. Amlexanox, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece obesidad, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, diabetes, síndrome metabólico, inflamación crónica del hígado, o inflamación crónica en un tejido adiposo.
- 5 2. Amlexanox para su uso según la reivindicación 1, en el que el procedimiento reduce o elimina uno o más síntomas de la afección; previene el aumento en la gravedad de uno o más síntomas de la afección; o reduce, previene o elimina otras enfermedades o afecciones.
3. Amlexanox para su uso según la reivindicación 1, en el que la resistencia a la insulina se produce en los adipocitos, las células de macrófagos del tejido adiposo, las células hepáticas o las células musculares del sujeto; o en el que la resistencia a la insulina provoca que el sujeto presente un metabolismo alterado de la glucosa.
- 10 4. Amlexanox para su uso según la reivindicación 1, en el que la administración provoca un aumento en el metabolismo de la glucosa por los adipocitos y los macrófagos del tejido adiposo, una reducción en la grasa corporal, una falta de aumento en la grasa corporal, un aumento en la señalización del receptor de insulina, un nivel disminuido de la fosforilación del receptor de insulina, una reducción o una prevención de la inflamación crónica en el hígado, una reducción o una prevención de la inflamación crónica en el tejido adiposo, una reducción o una prevención de la esteatosis hepática, la estimulación del gasto de energía metabólica, una reducción en los ácidos grasos libres en circulación o una reducción del colesterol.
- 15 5. Amlexanox para su uso según la reivindicación 4, en el que el aumento en el metabolismo de la glucosa es provocado por un aumento de la señalización del receptor de insulina en respuesta a la insulina.
- 20 6. Amlexanox para su uso según la reivindicación 1, en el sujeto padece o está en riesgo de padecer obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, o esteatohepatitis; en el que el sujeto presenta un índice de masa corporal de 25-29,9 kg/m², 30-39,9 kg/m², o mayor o igual a 40 kg/m²; en el que el sujeto es obeso según el criterio de la Organización Mundial de la Salud; y/o en el que el sujeto es un ser humano adulto o un niño.
- 25 7. Amlexanox para su uso según la reivindicación 6, en el que el niño tiene un índice de masa corporal mayor que el 85º percentil para su grupo de edad y/o en el que el niño tiene un índice de masa corporal mayor que el 95º percentil para su grupo de edad.
8. Amlexanox para un uso según la reivindicación 1, en el que:
 - a) el sujeto no presenta una alergia, una úlcera aftosa ni asma bronquial;
 - b) el sujeto no necesita de regeneración de tejidos y/o no padece un rechazo de tejidos;
 - 30 c) el sujeto no padece un trastorno proliferativo de células;
 - d) el sujeto no padece un carcinoma;
 - e) el sujeto no padece un tumor hematopoyético de linaje linfoide;
 - f) el sujeto no padece un tumor hematopoyético de linaje mieloide;
 - 35 g) el sujeto no padece un tumor de origen mesenquimático;
 - h) el sujeto no padece un tumor del sistema nervioso central o periférico; y/o
 - i) el sujeto no padece un melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentoso, queratoxantoma, cáncer folicular de tiroides ni sarcoma de Kaposi.
9. Amlexanox para su uso según la reivindicación 1, en el que la administración comprende administrar amlexanox en combinación con un agente terapéutico adicional o intervención médica.
- 40 10. Amlexanox para su uso según la reivindicación 9, en el que el amlexanox se administra con el agente terapéutico adicional mezclados juntos en un mismo medicamento; o en el que el amlexanox y el agente terapéutico adicional se administran en formulaciones separadas de modo simultáneo; o en el que el amlexanox y el agente terapéutico adicional se administran en formulaciones separadas de modo secuencial.
- 45 11. Amlexanox para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 9, comprendiendo además dicho procedimiento una etapa que comprende ensayar un sujeto para una enfermedad o afección, tal como una señalización alterada de la insulina, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación crónica del hígado, o inflamación crónica en un tejido adiposo, en el que la etapa del ensayo se realiza antes de la etapa de administración y/o después de la etapa de administración.
- 50 12. Amlexanox para su uso según la reivindicación 11, comprendiendo además dicho procedimiento una etapa que comprende administrar una segunda dosis de amlexanox después de la etapa de ensayo.

Figura 1

A.



B.

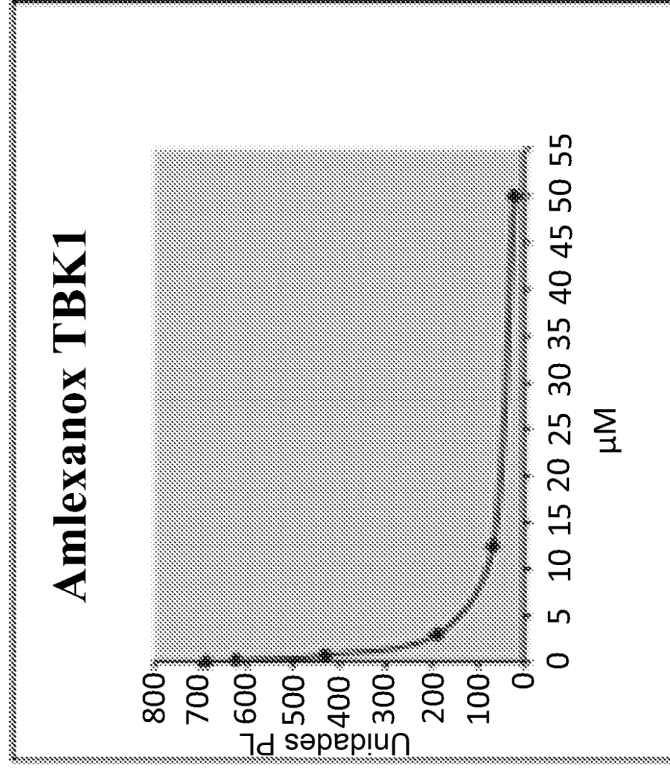


Figura 2

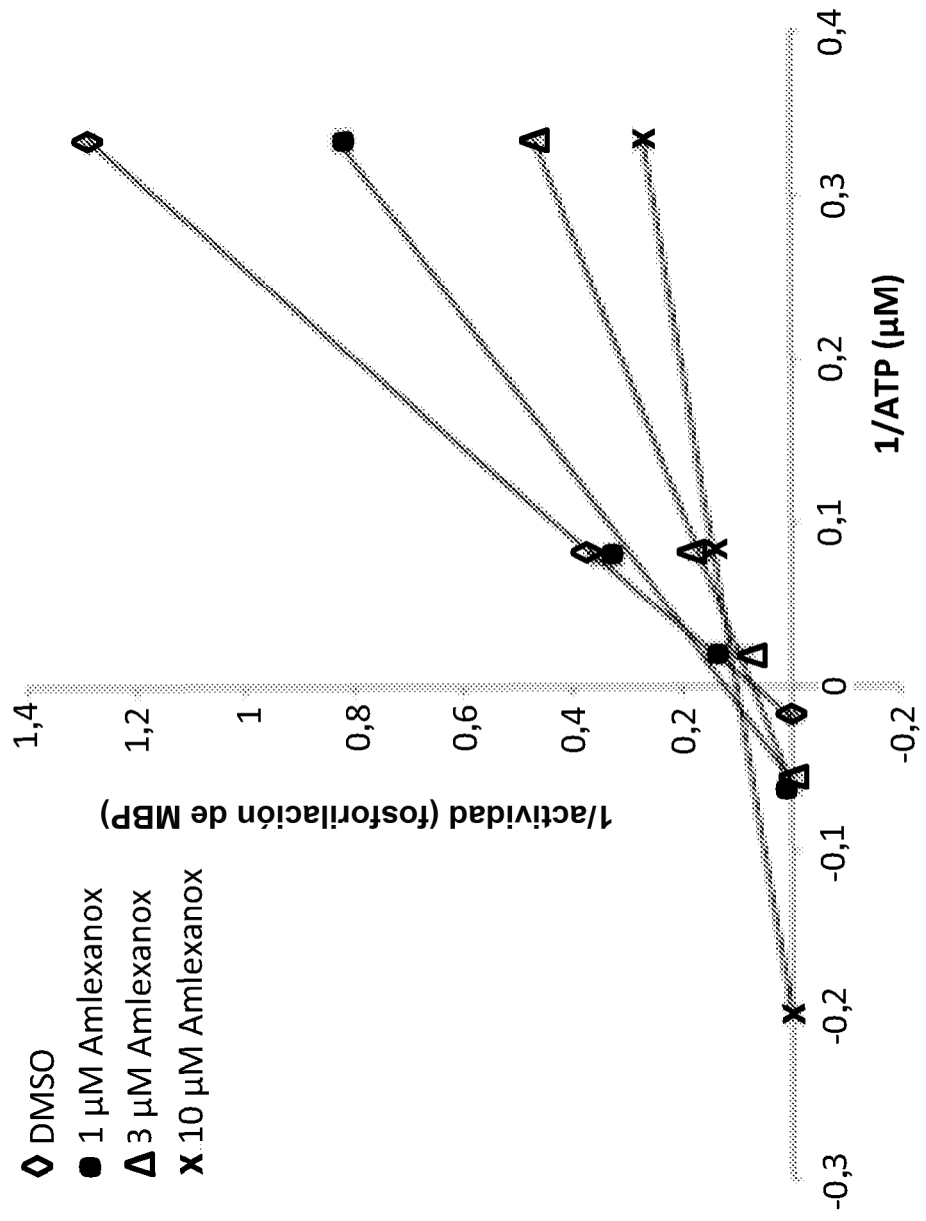


Figura 3

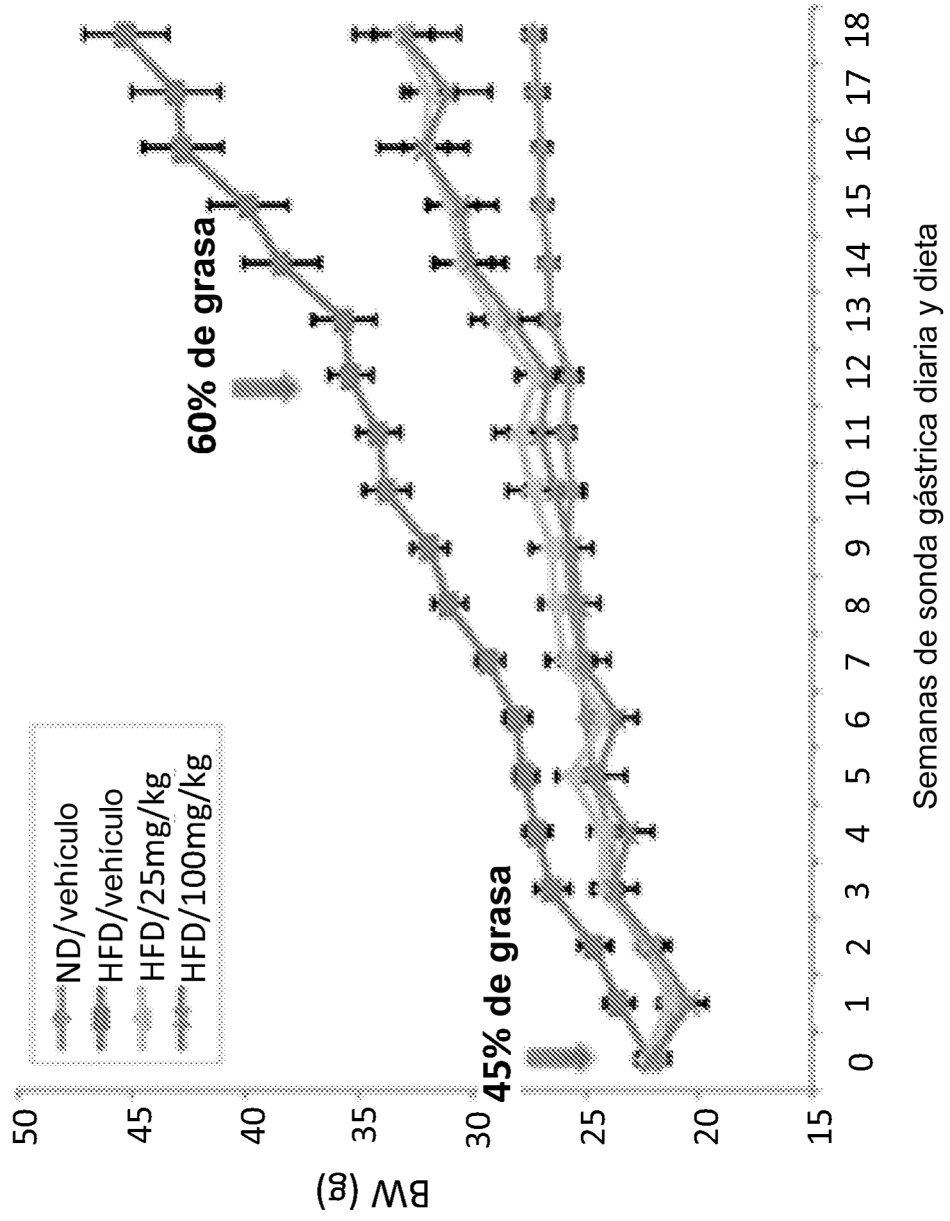


Figura 4

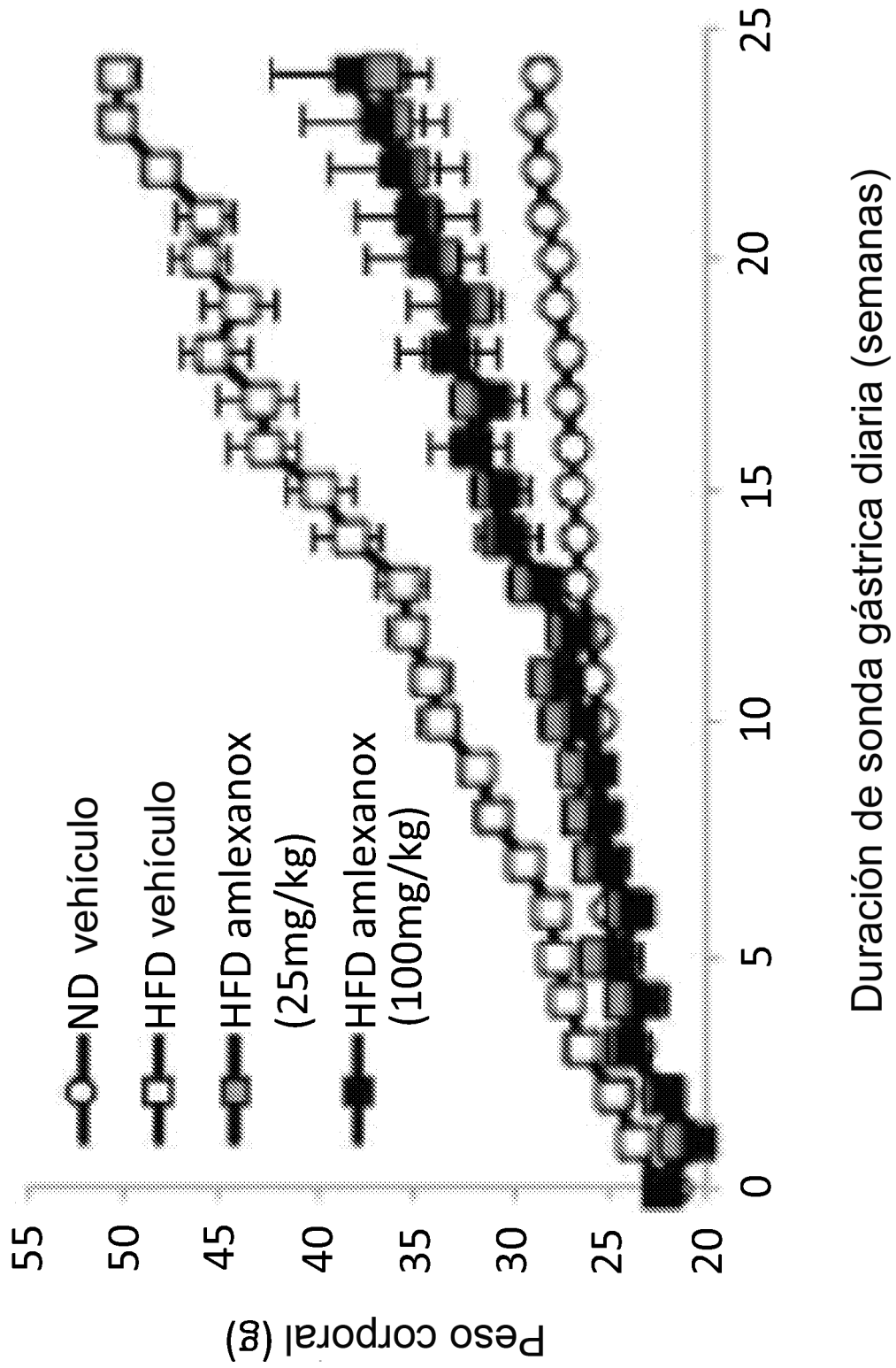


Figura 5

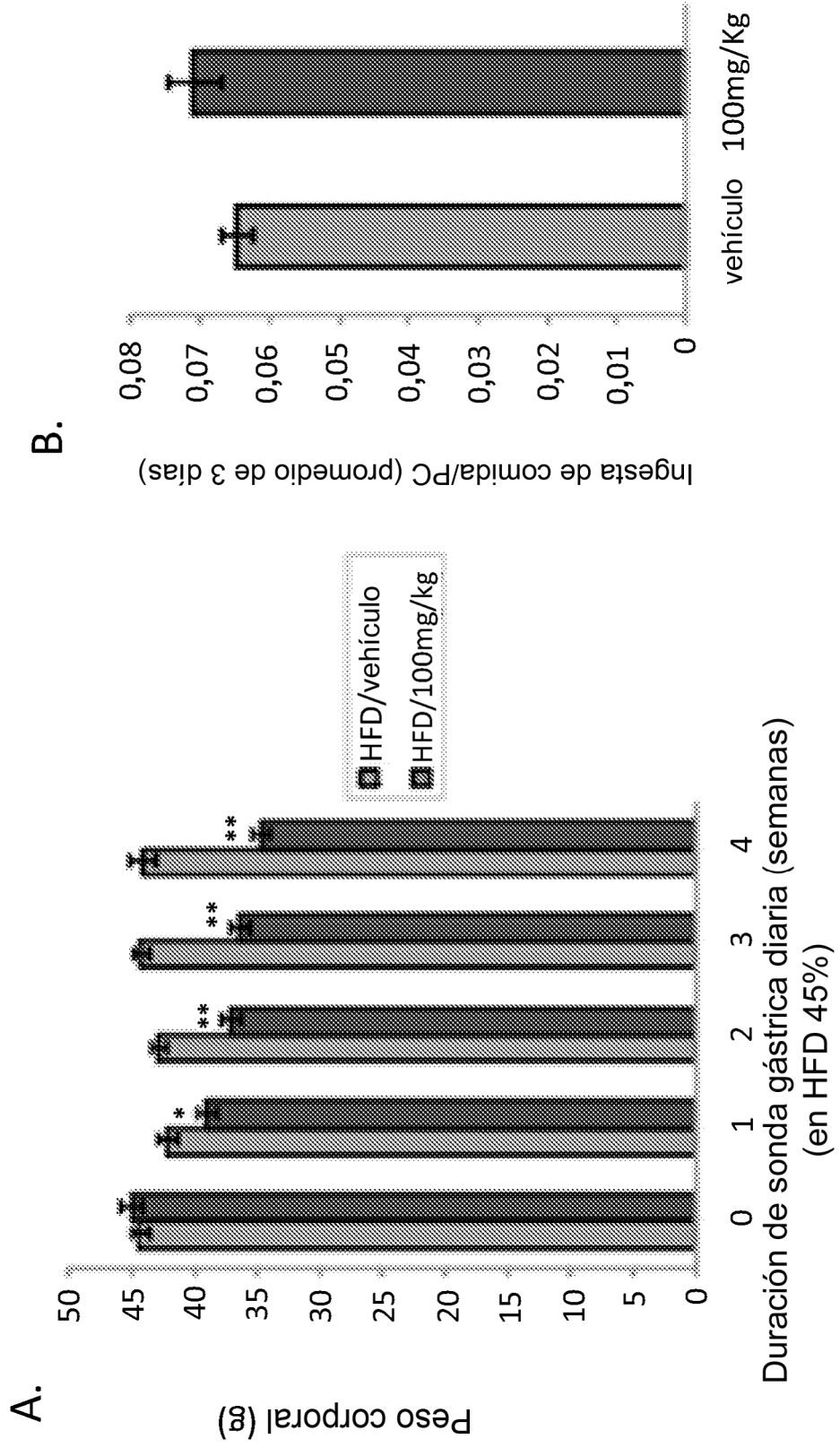


Figura 5 (cont.)

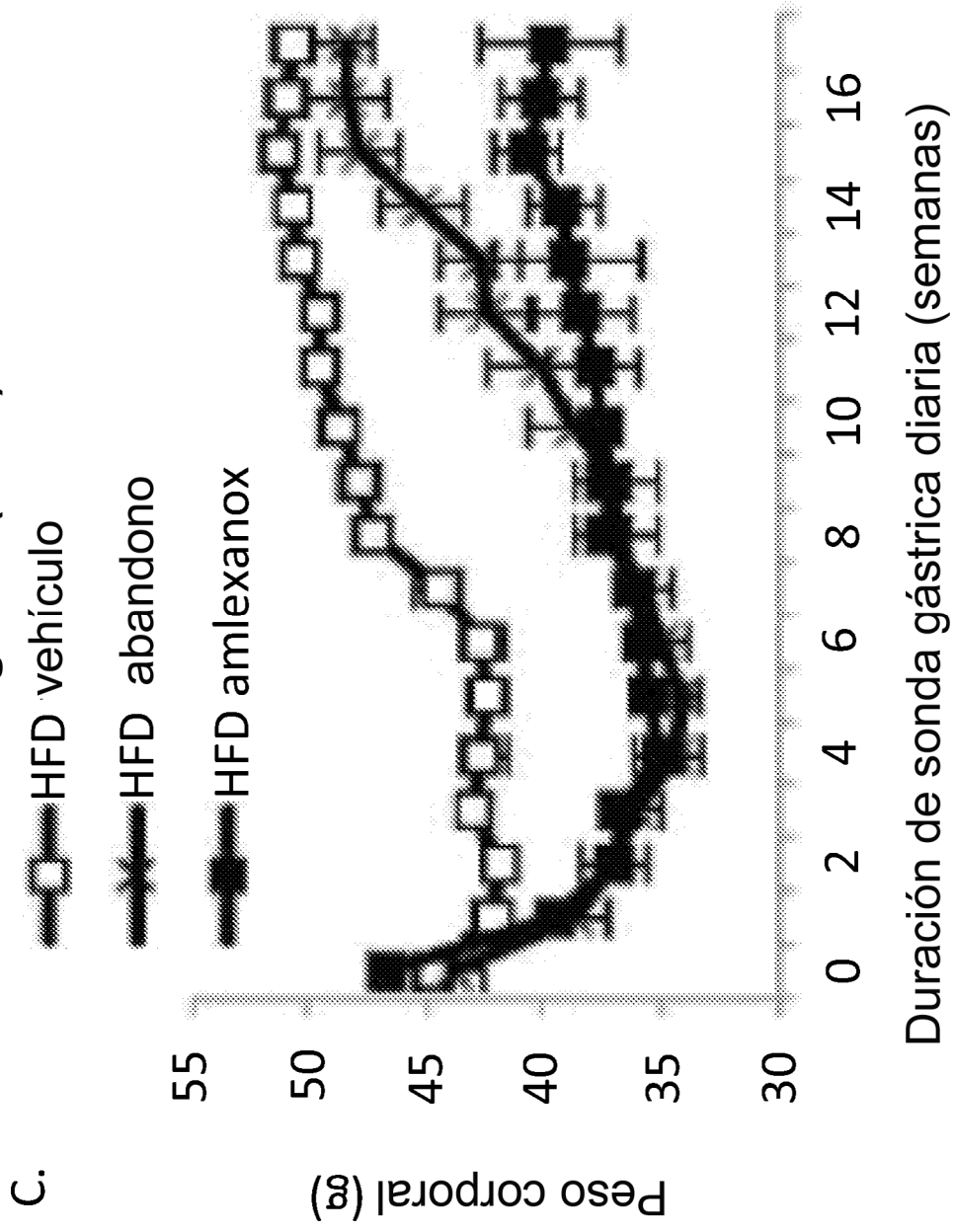


Figura 5 (cont.)

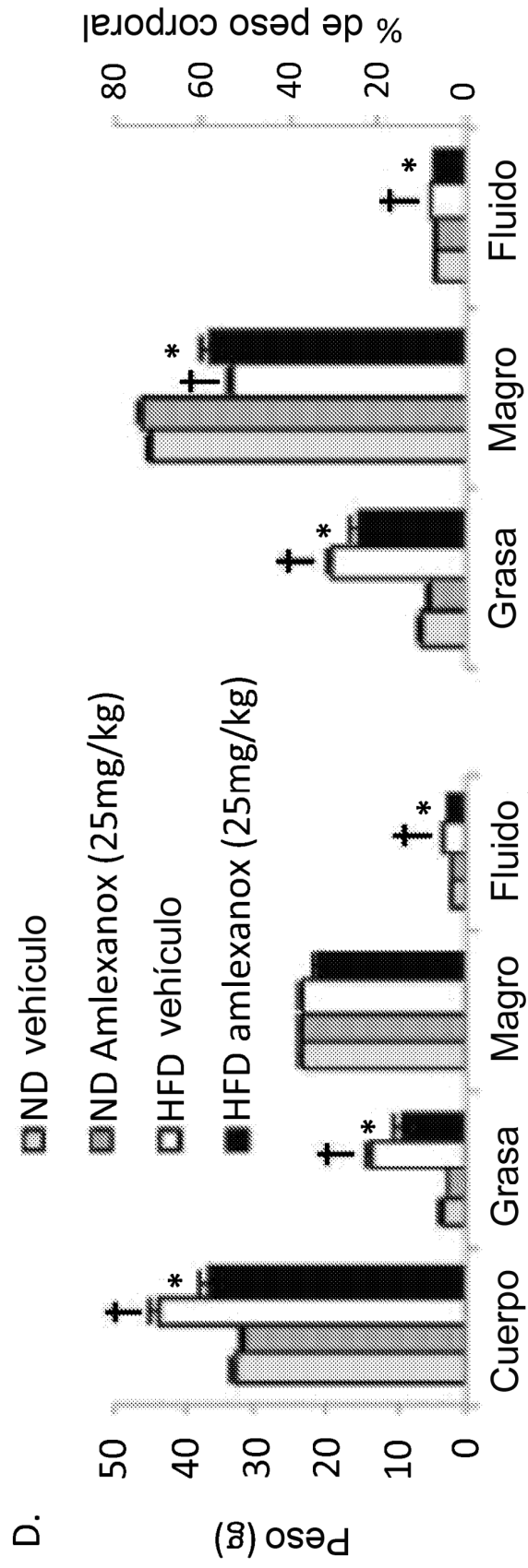


Figura 6

▨ vehículo ▩ Amlexanox 100 mg/kg

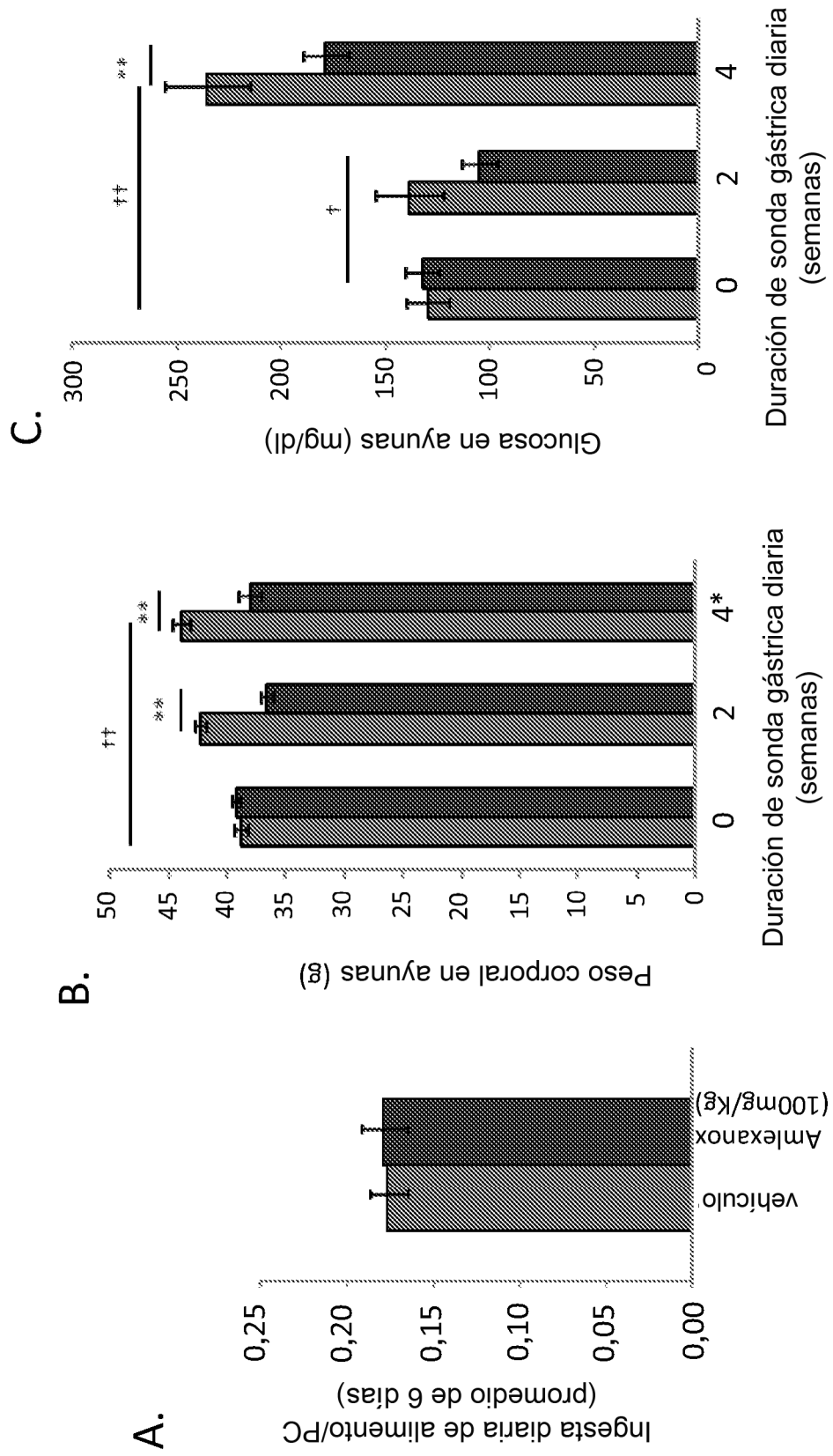
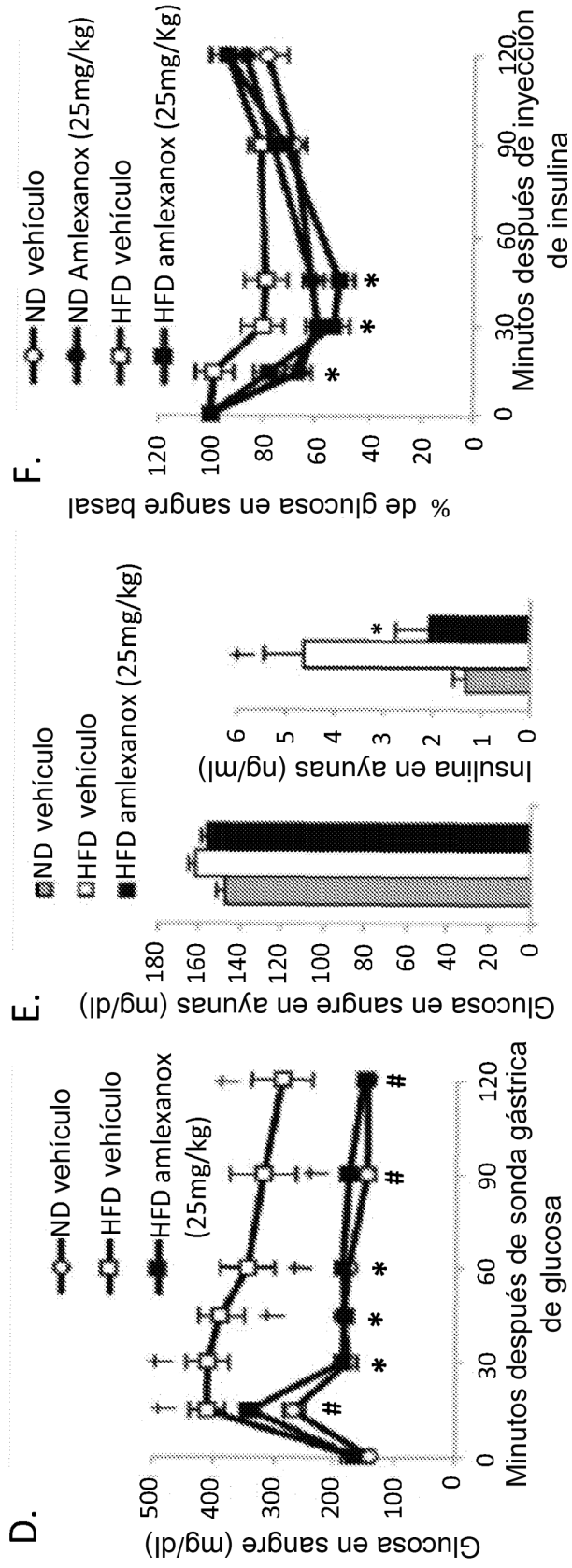
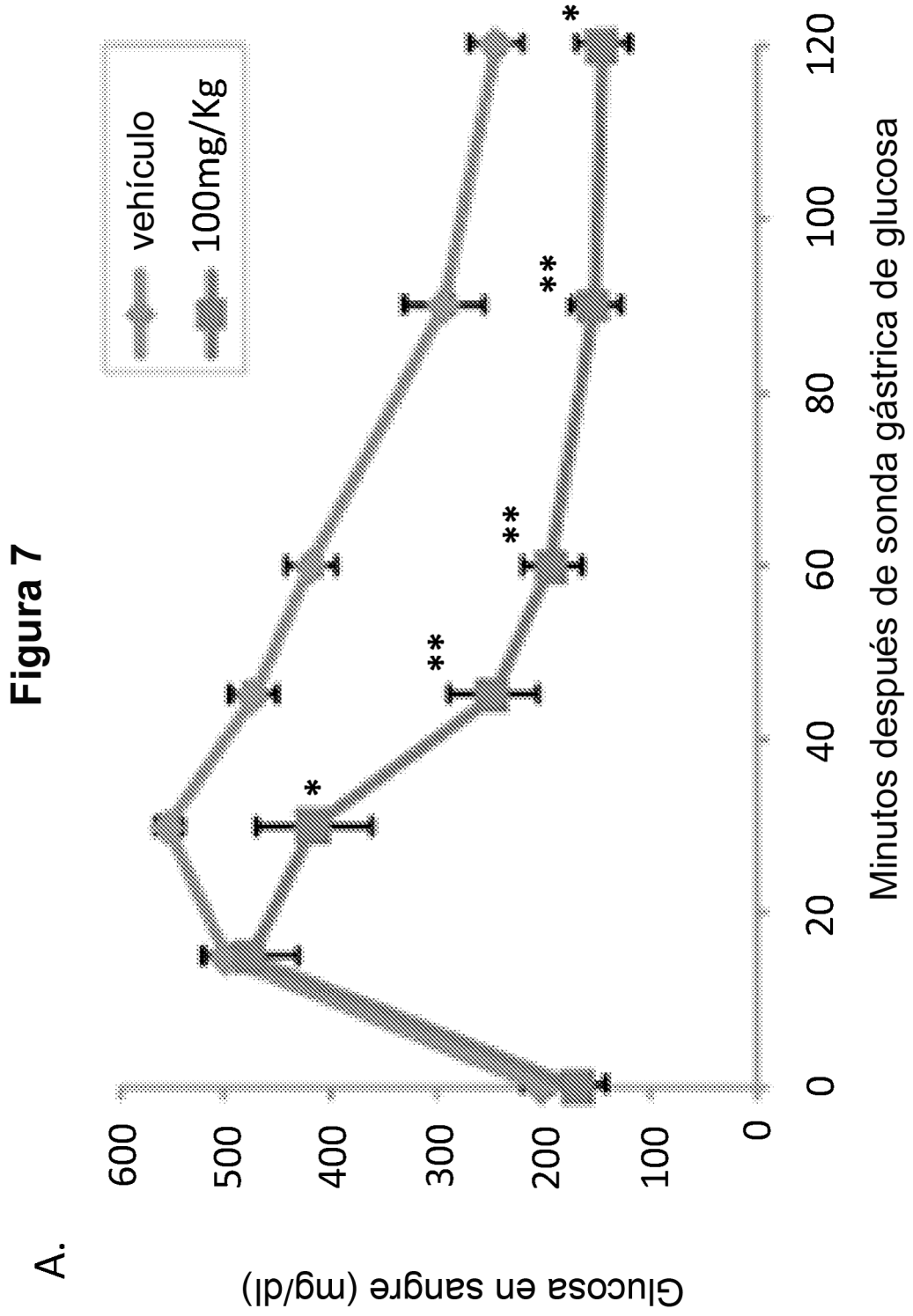


Figura 6 (cont.)





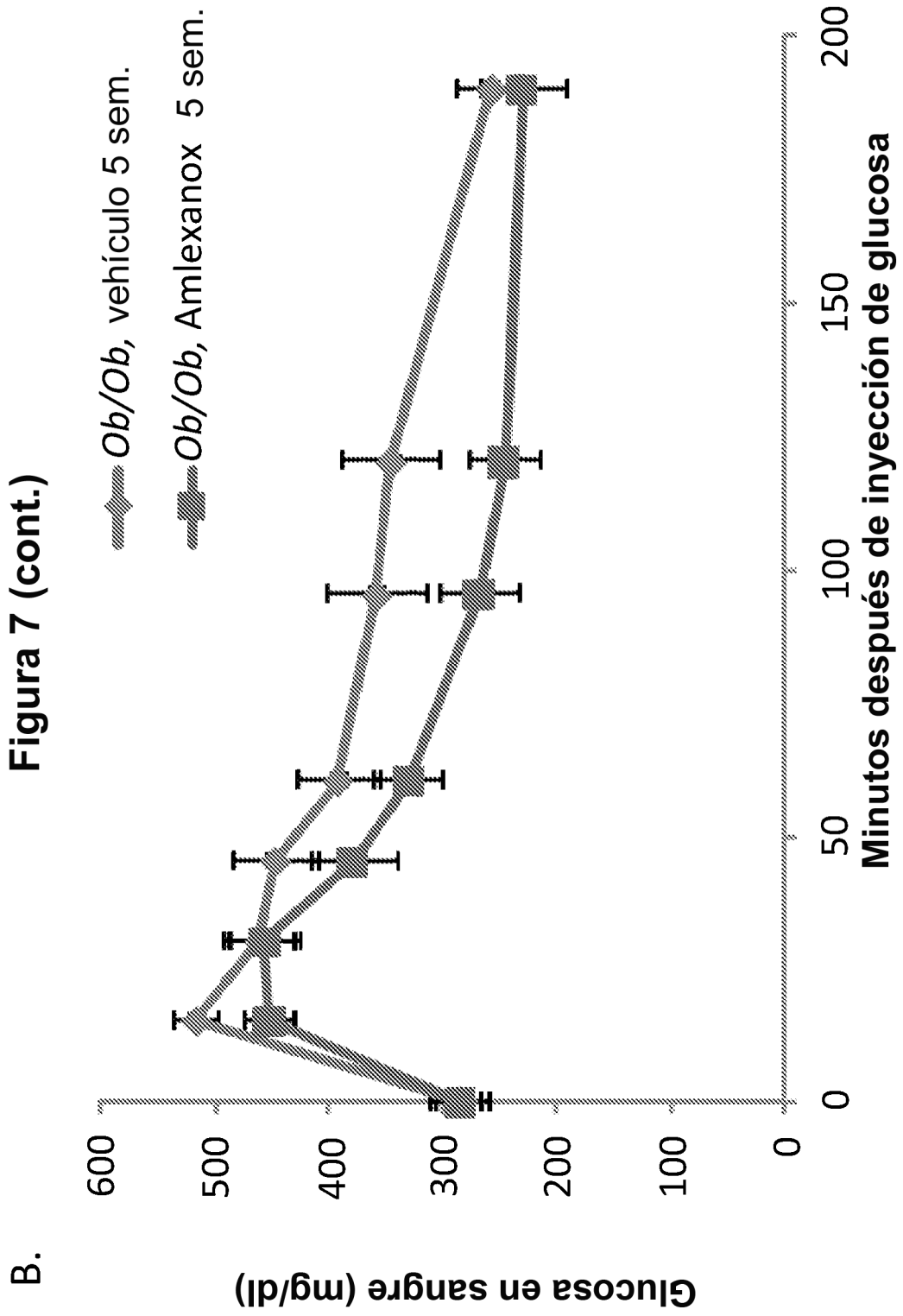


Figura 8

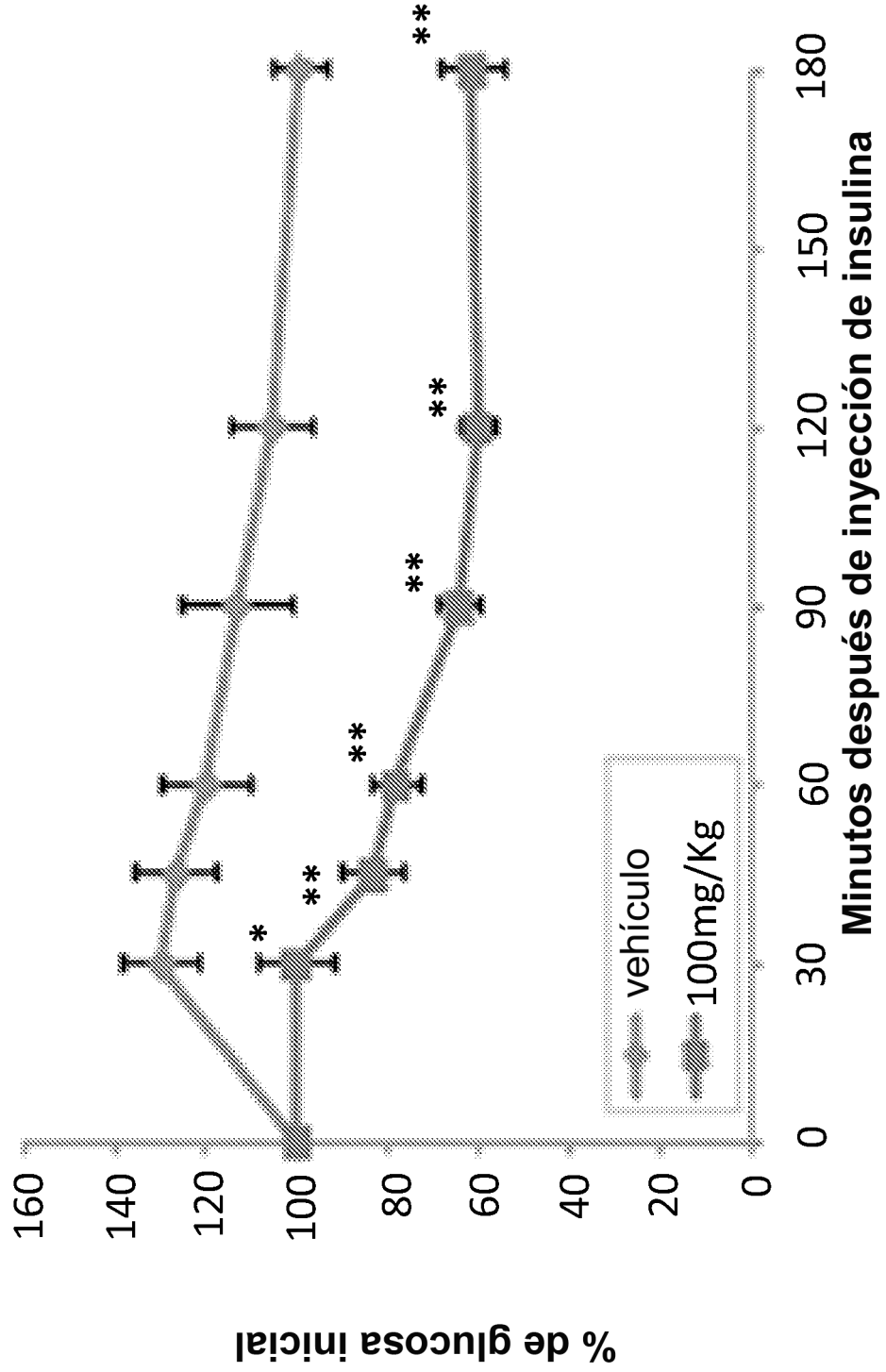


Figura 9

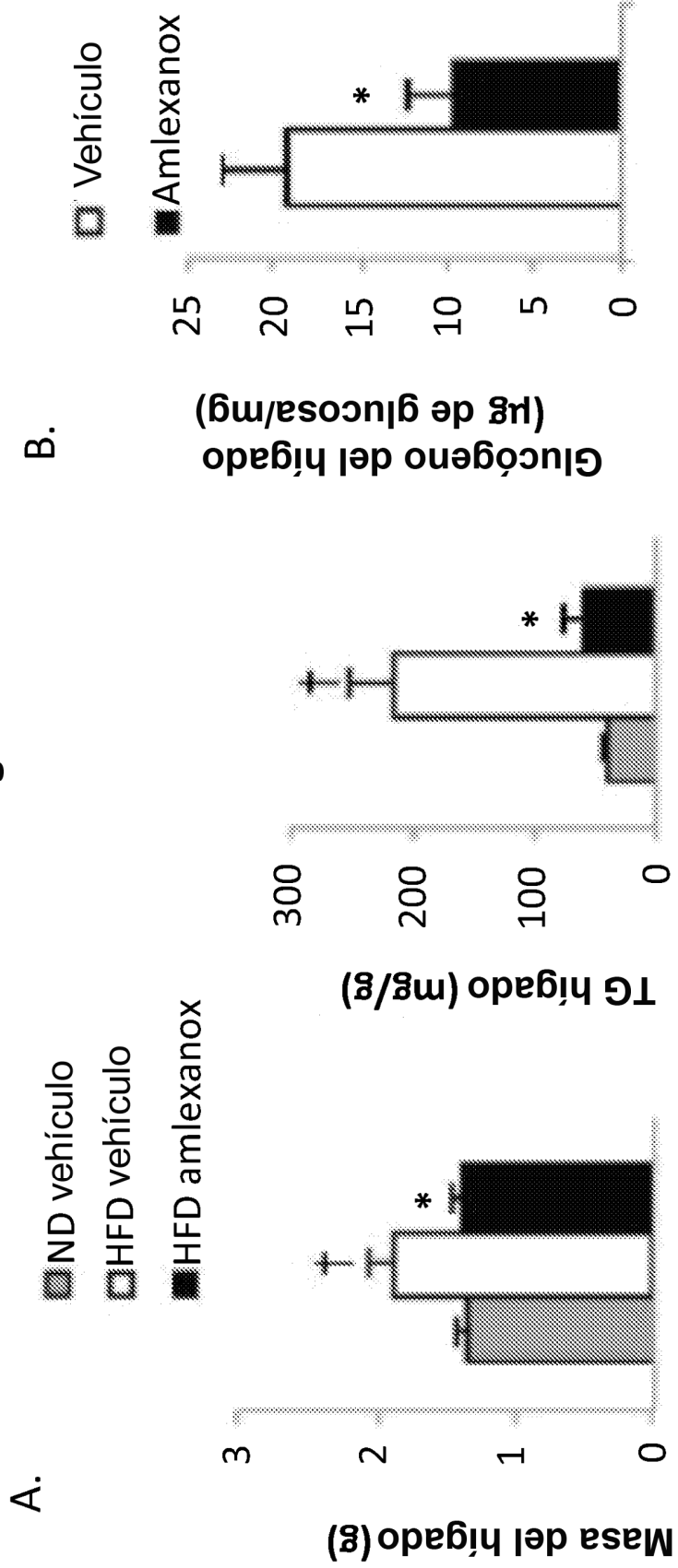


Figura 9 (cont.)

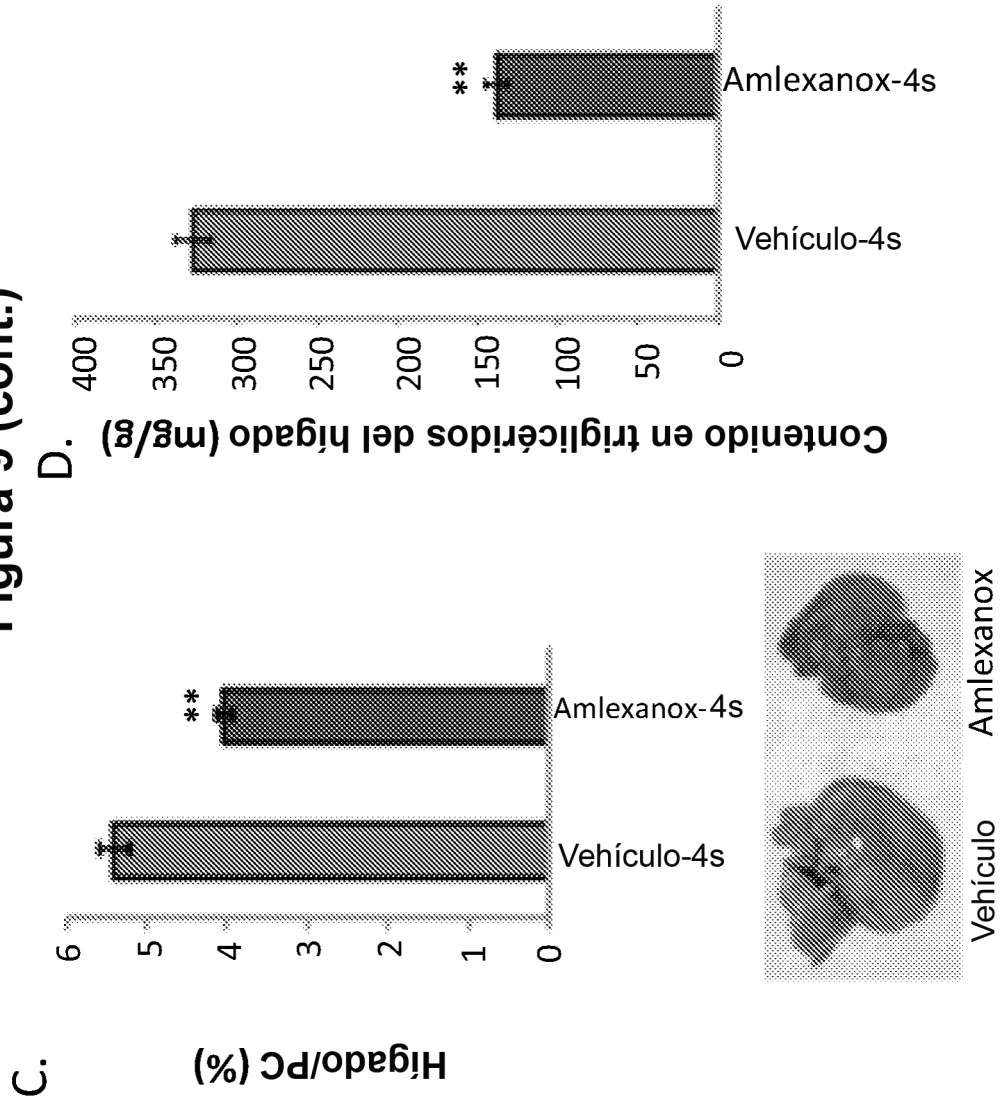


Figura 10

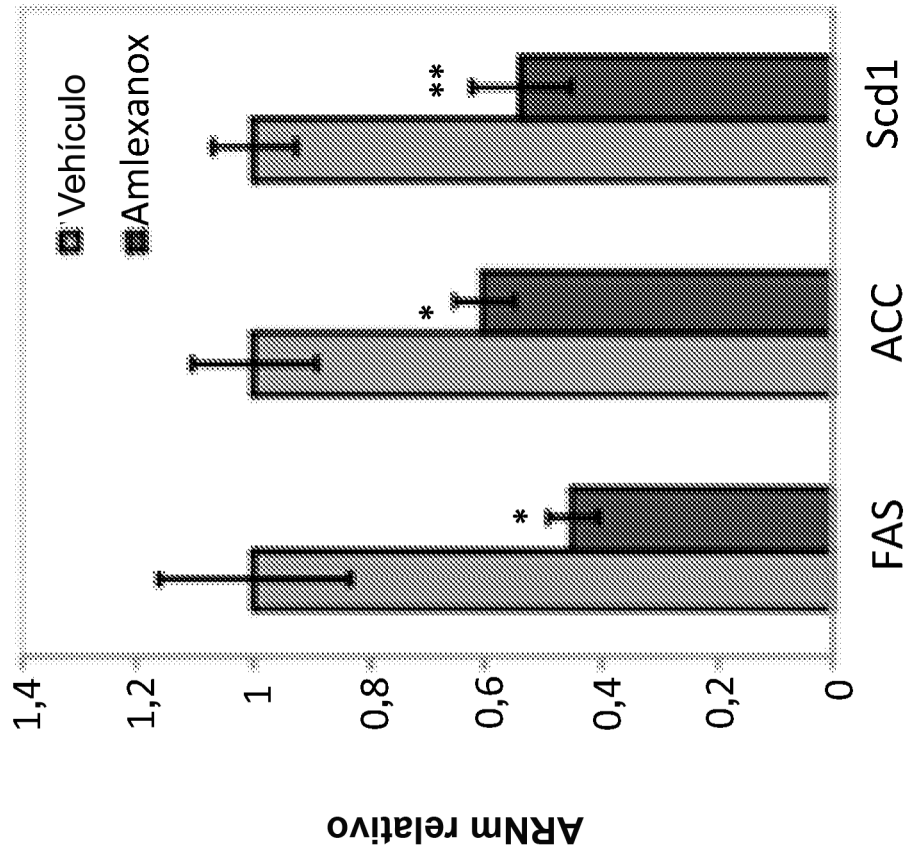
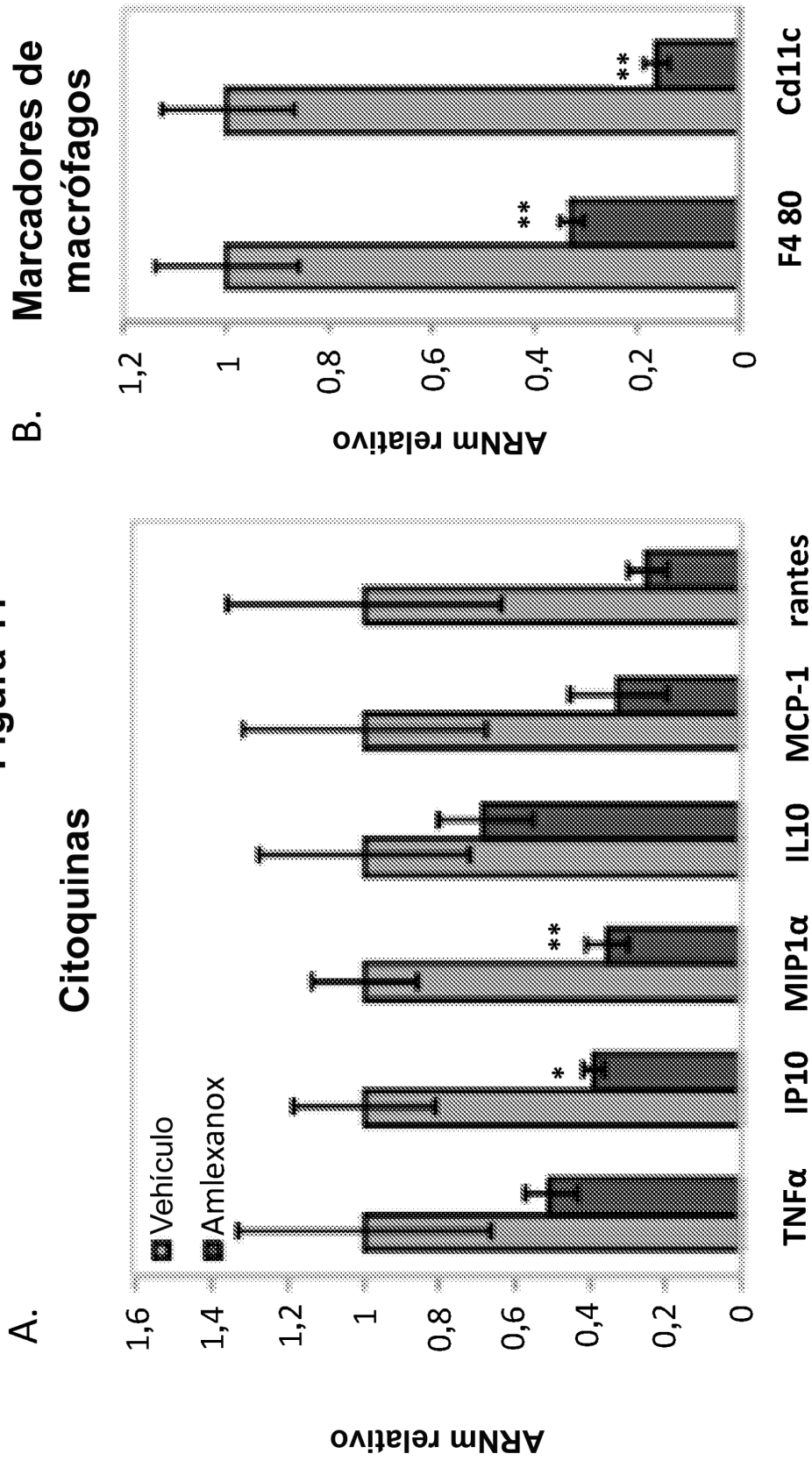


Figura 11



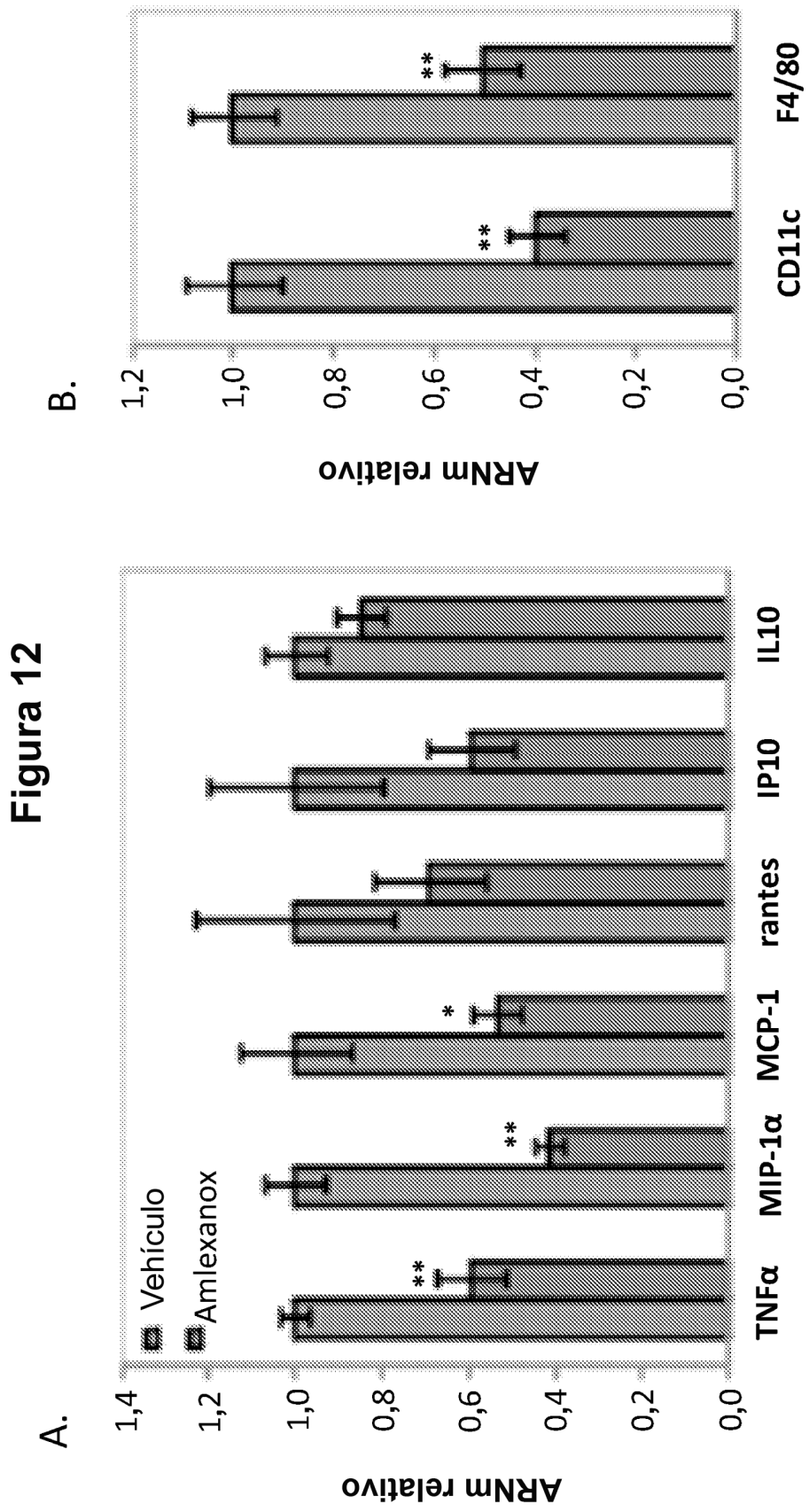


Figura 13

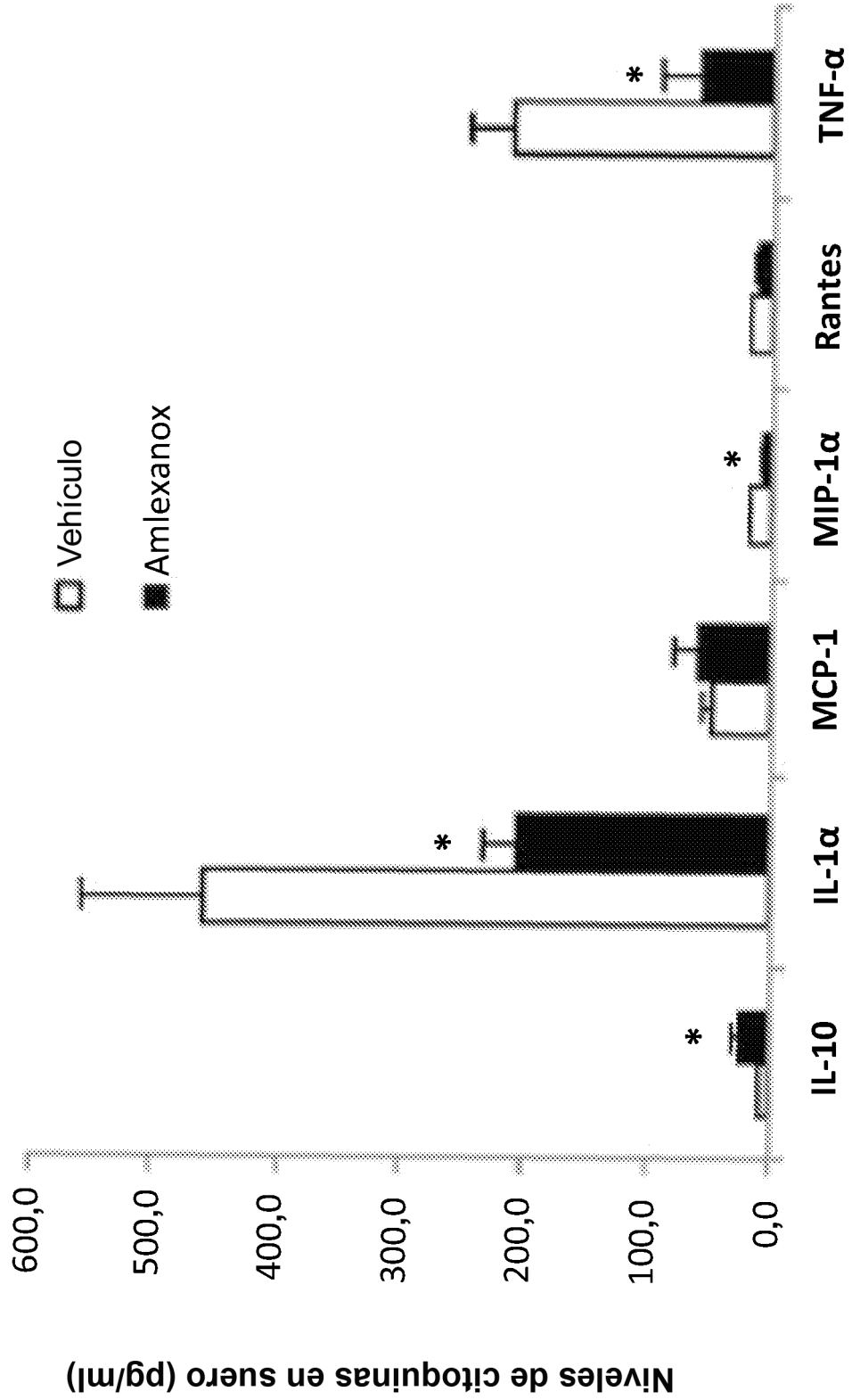


Figura 14

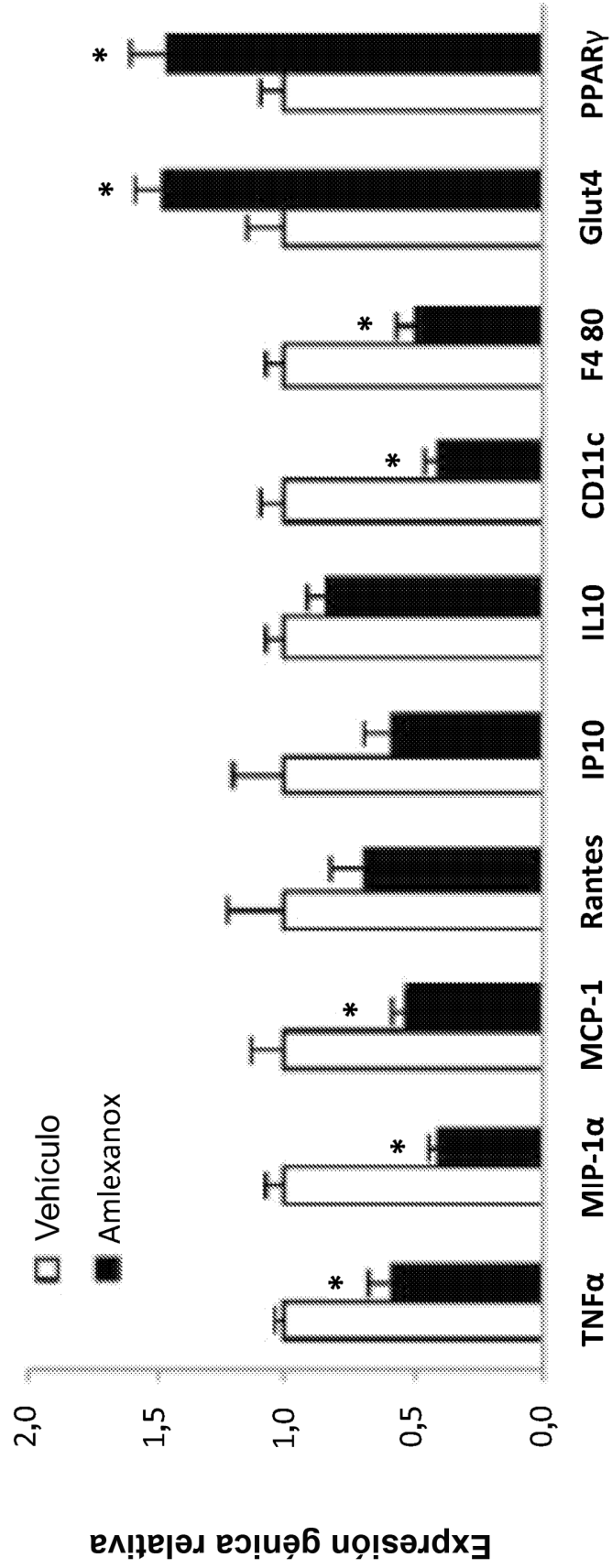


Figura 15

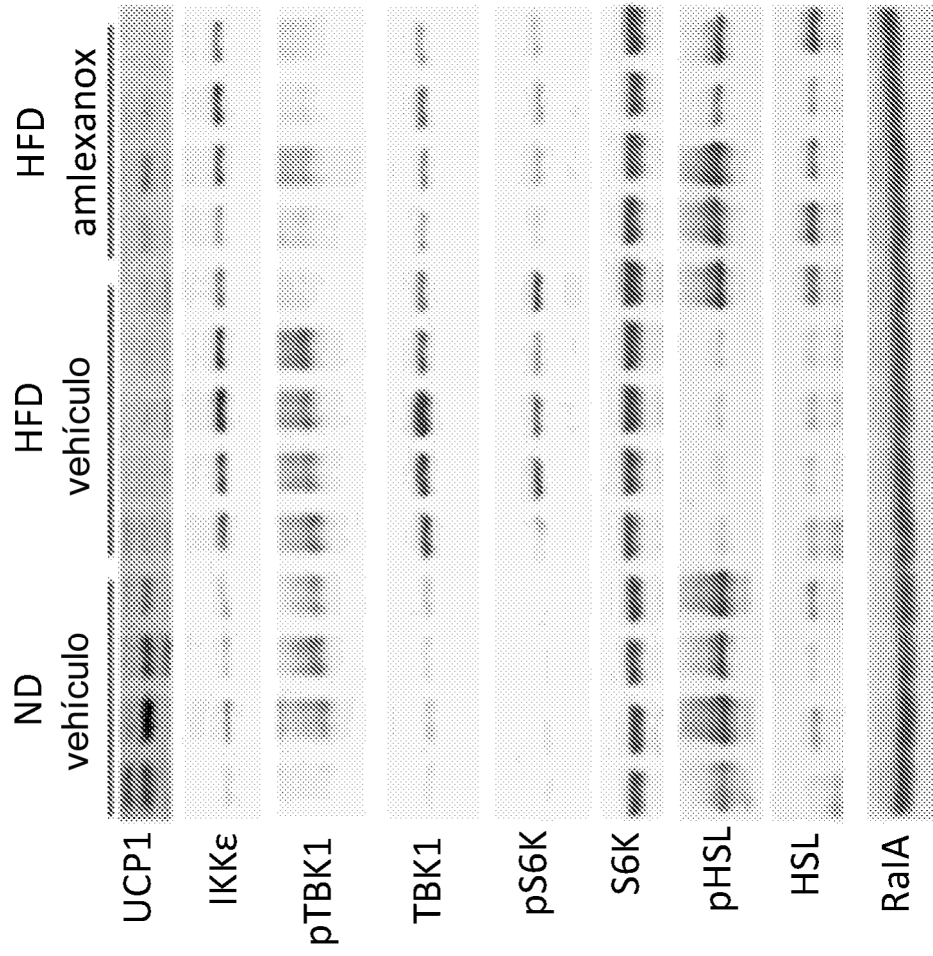


Figura 16

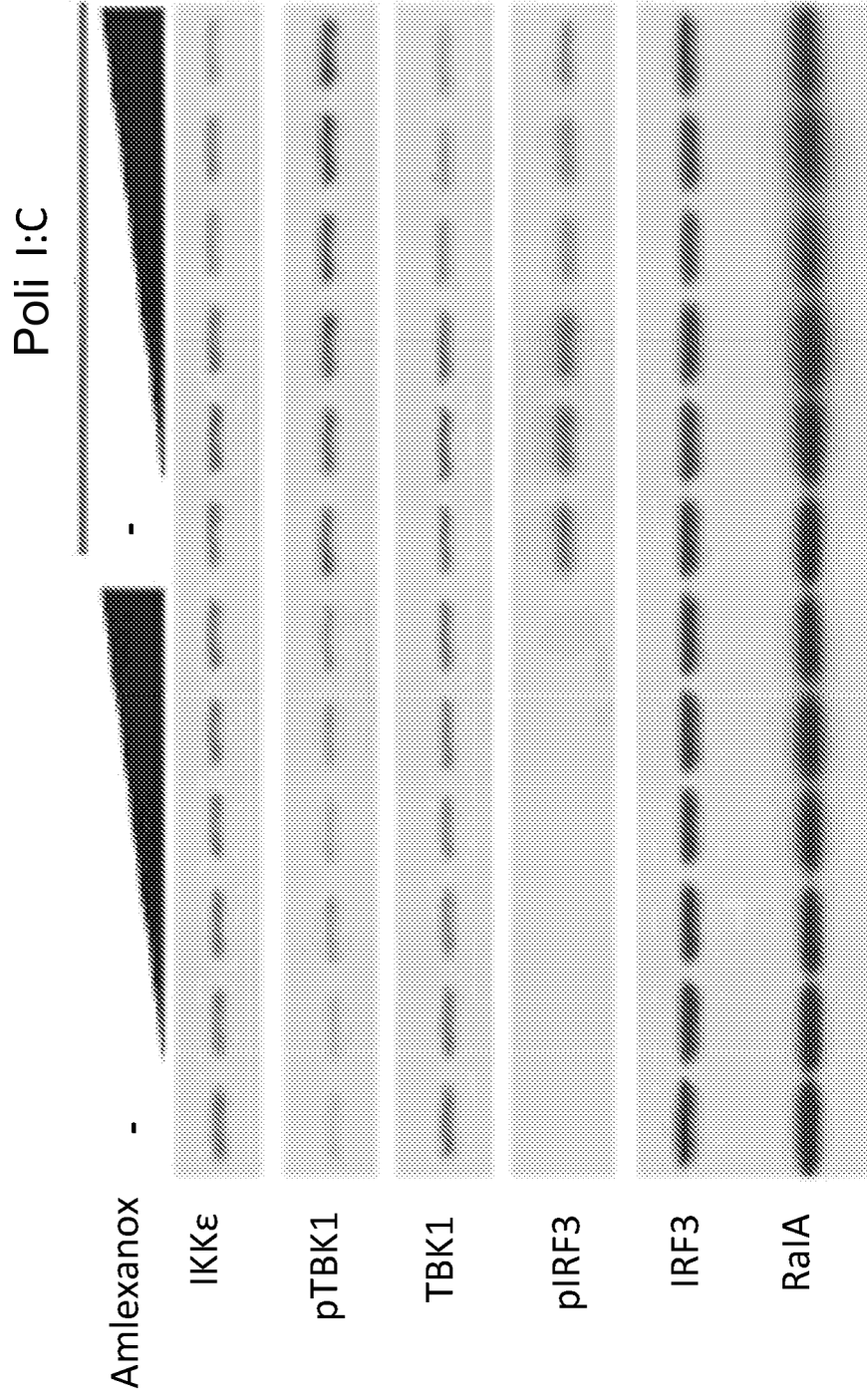


Figura 17

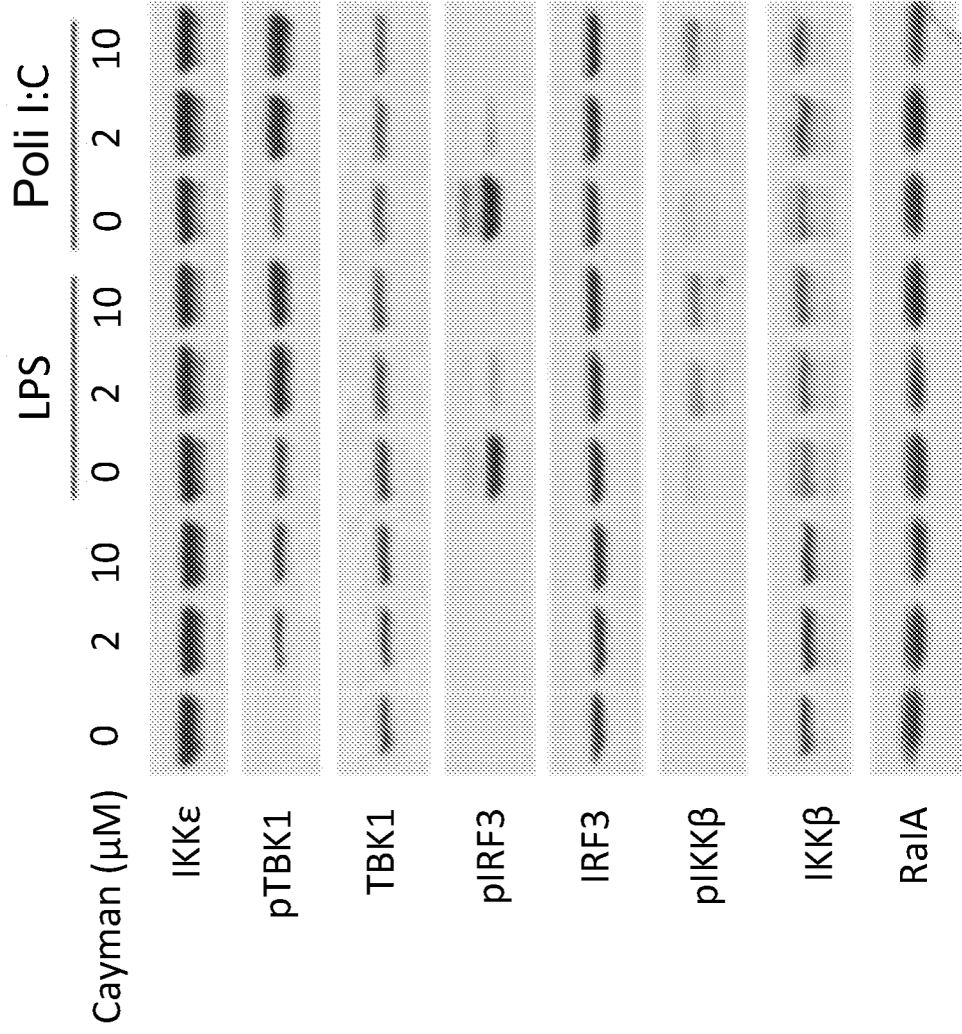


Figura 18

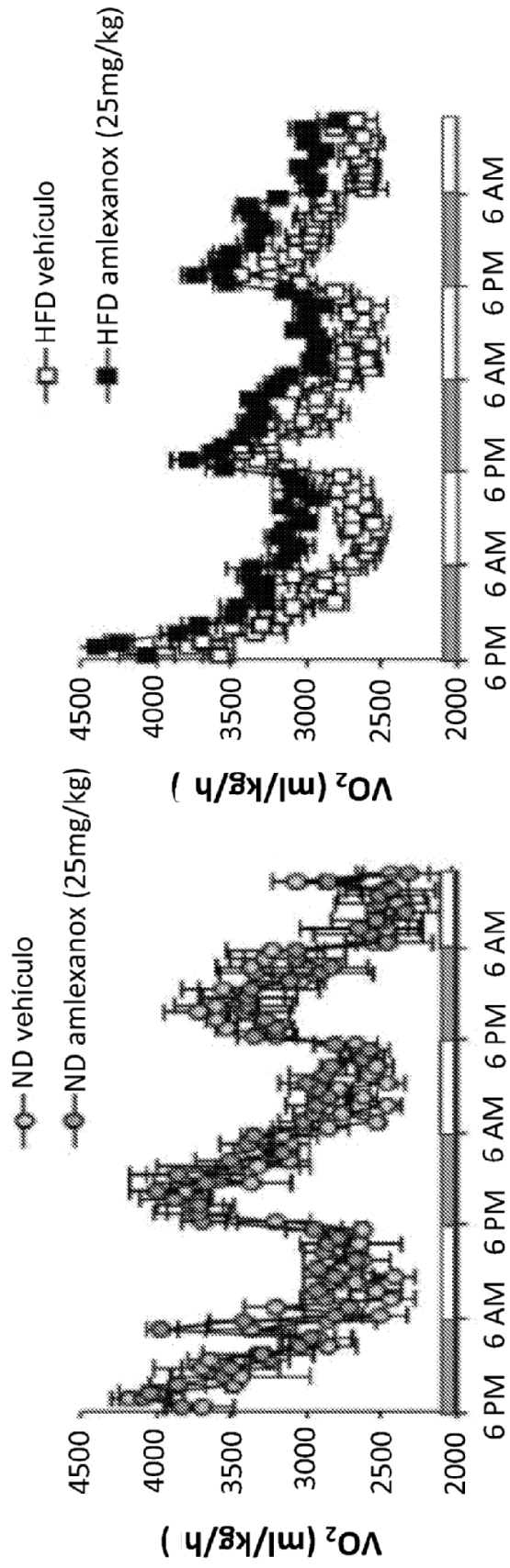
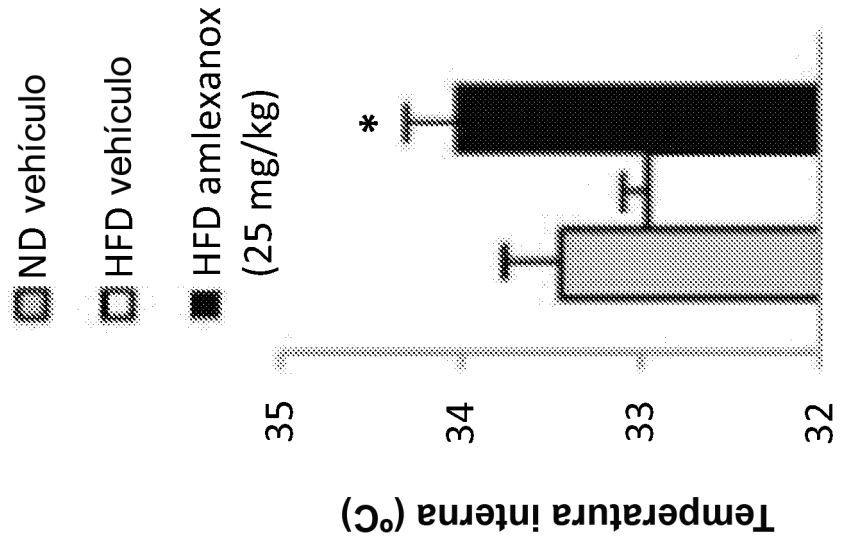


Figura 19



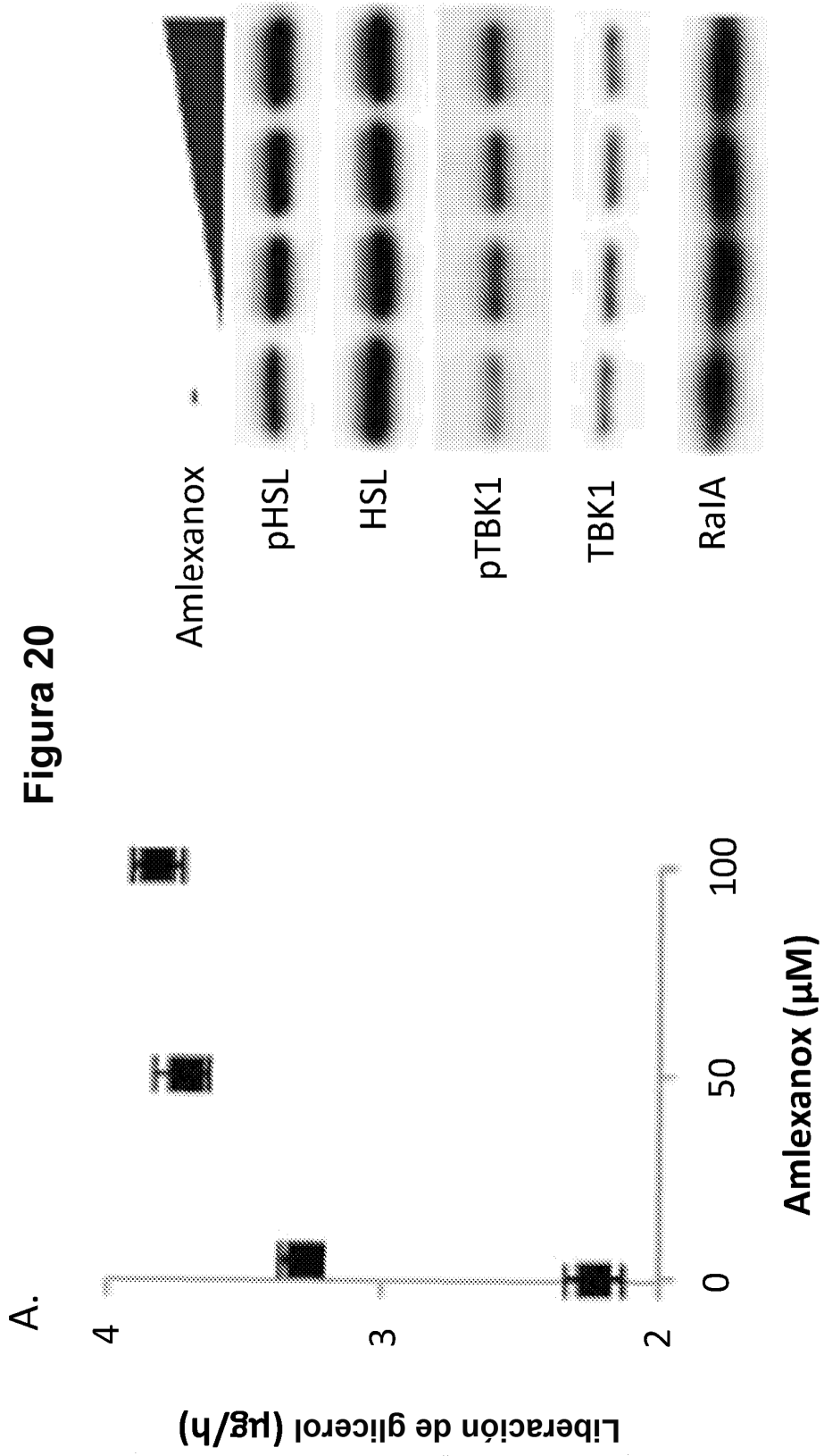


Figura 20

Figura 20 (cont.)

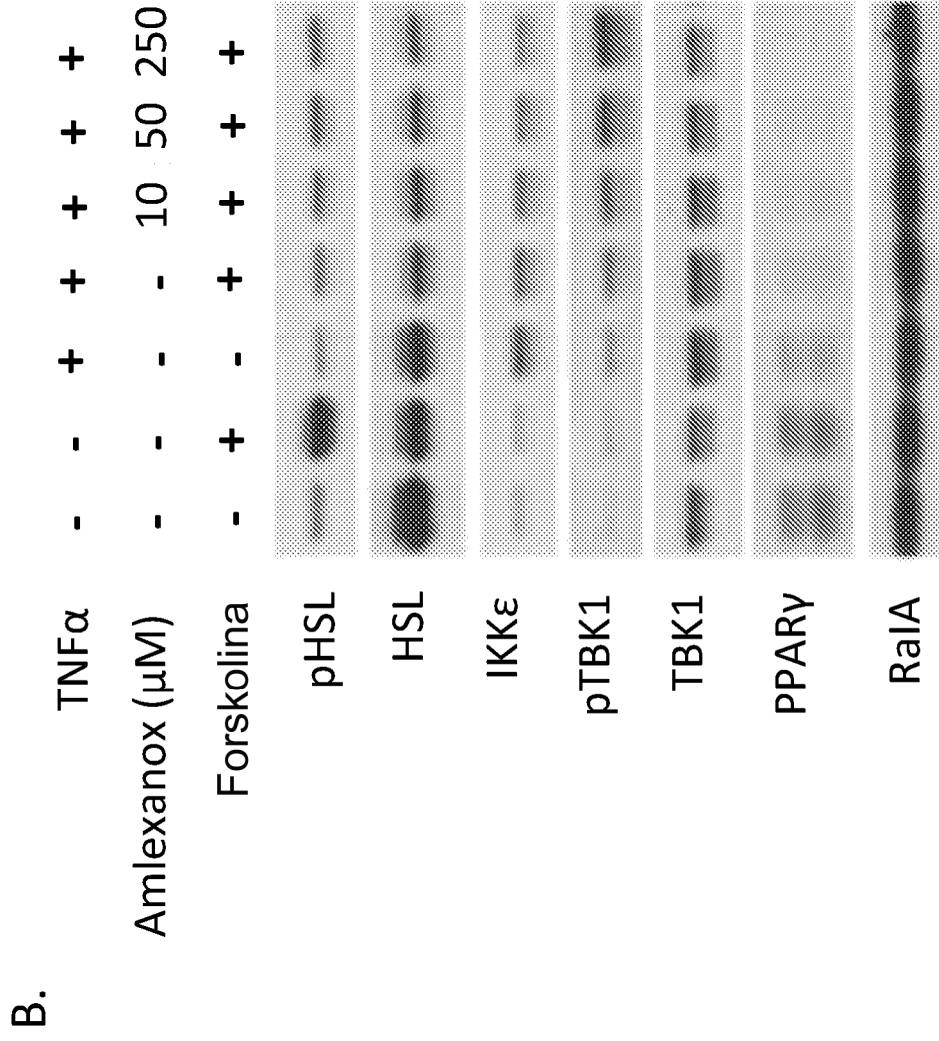


Figura 21

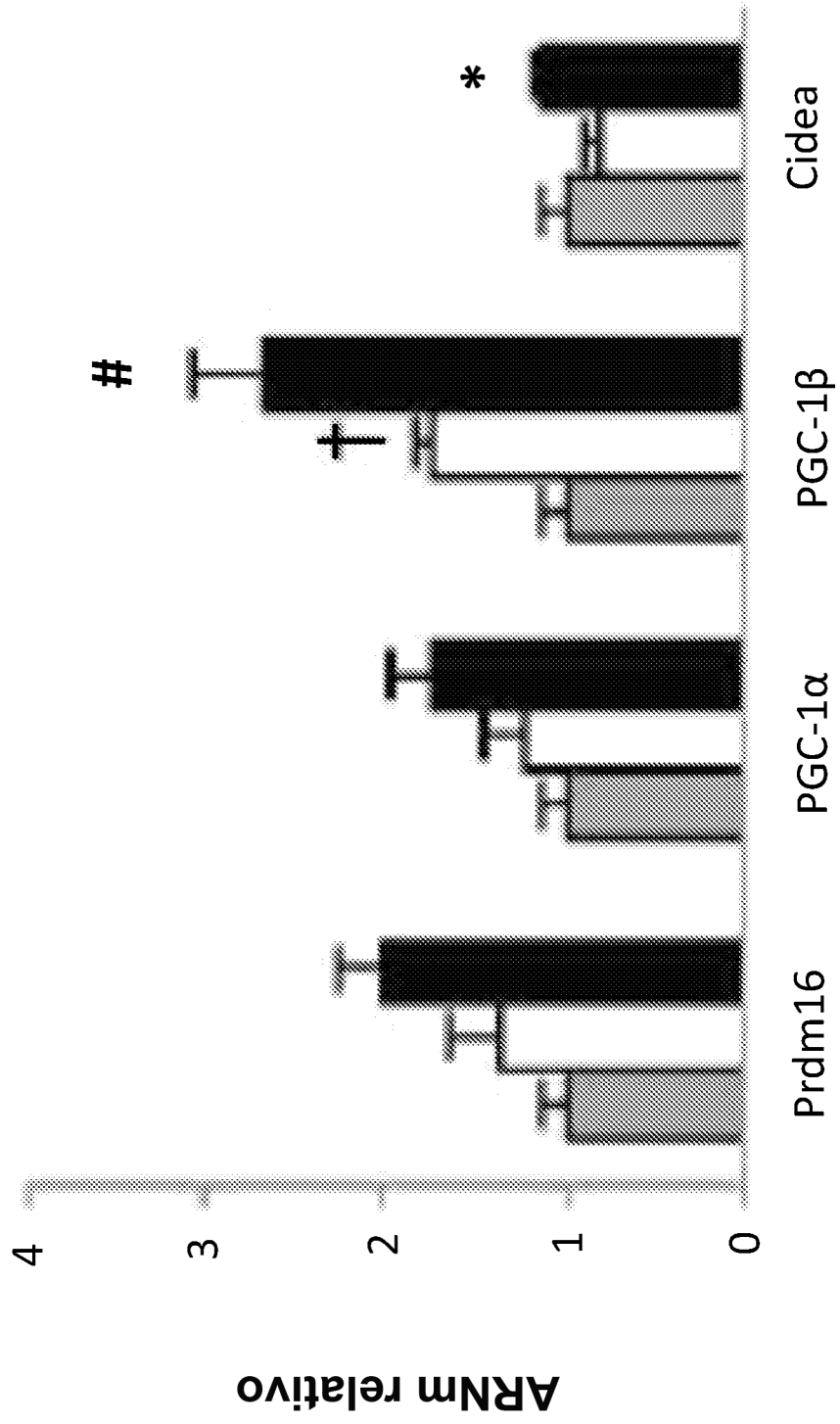


Figura 22

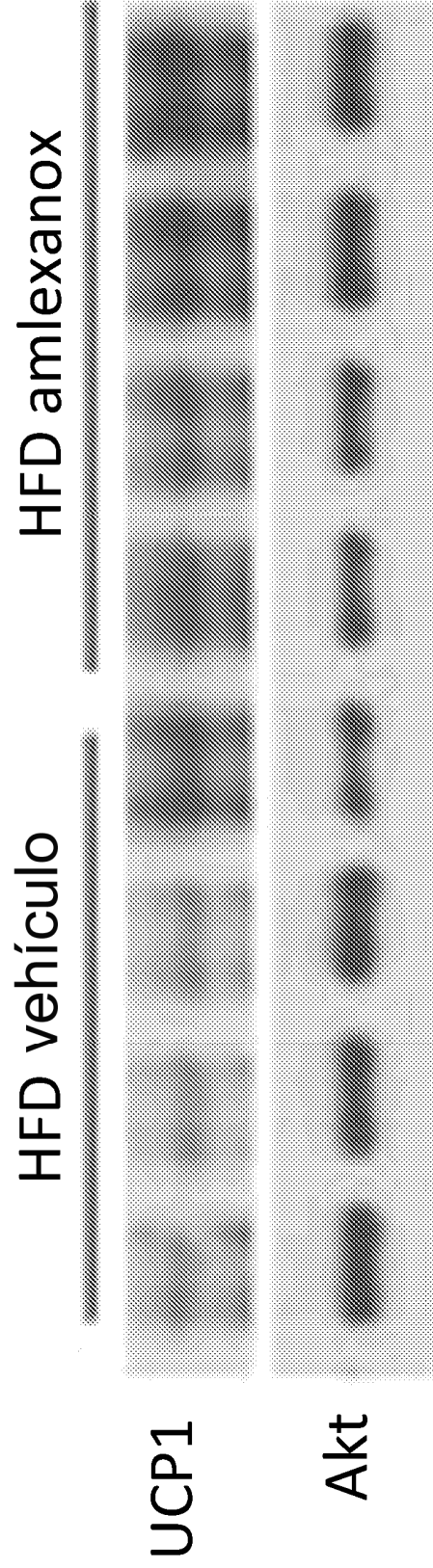


Figura 23

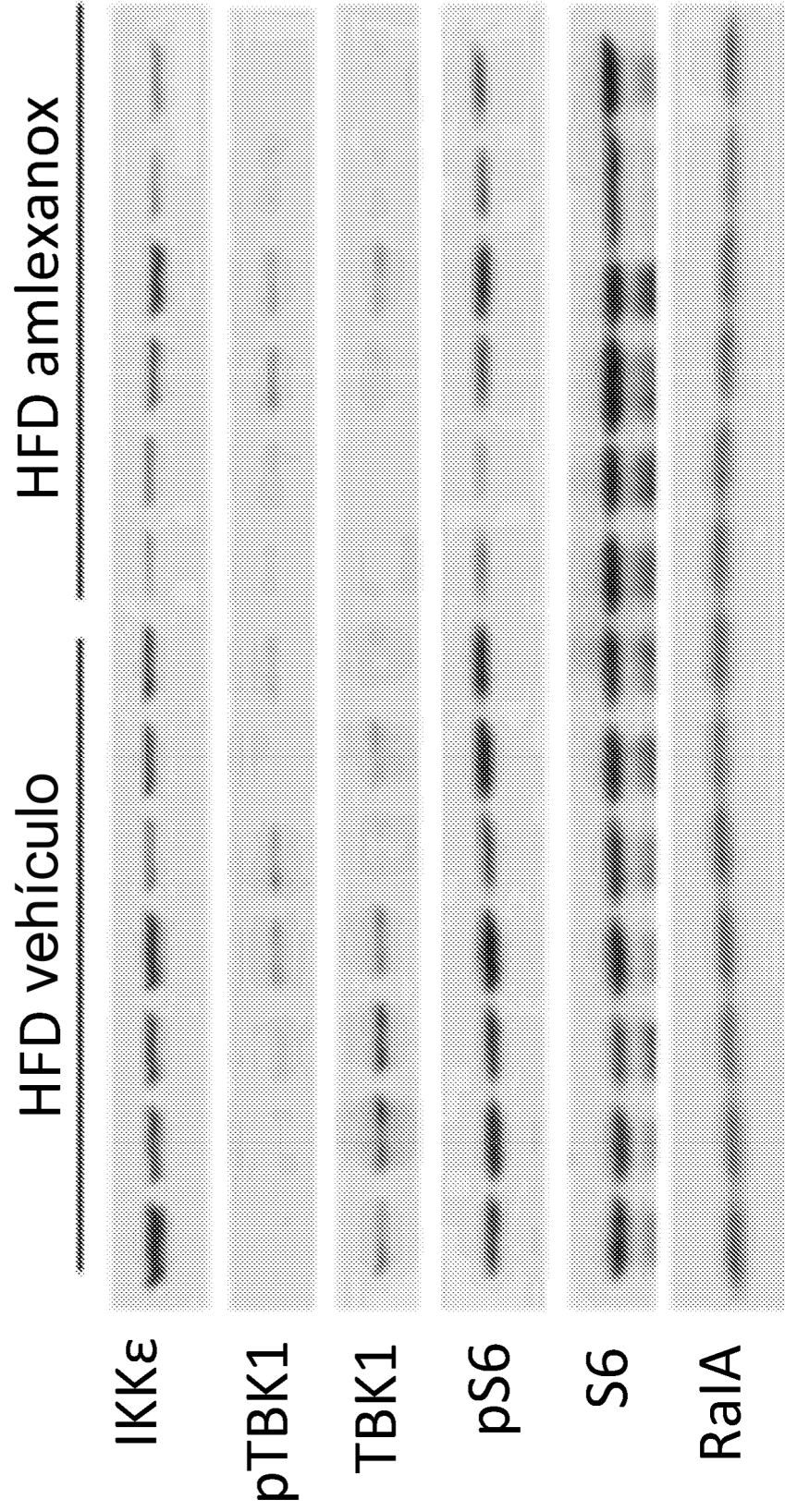


Figura 24

