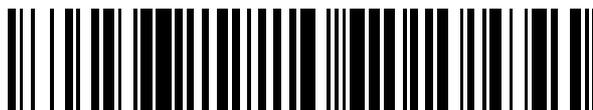


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 629**

51 Int. Cl.:

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2015 E 15173299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3085370**

54 Título: **Calebina A para inducir lipólisis**

30 Prioridad:

19.04.2015 US 201514690438

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

04.03.2019

73 Titular/es:

**MAJEED, MUHAMMED (33.3%)
117, Coppertree Court
Edison, NJ 08820, US;
MAJEED, ANJU (33.3%) y
NAGABHUSHANAM, KALYANAM (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MAJEED, MUHAMMED;
MAJEED, ANJU y
NAGABHUSHANAM, KALYANAM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 702 629 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

Calebina A para inducir lipólisis

5 Campo de la invención

La invención en general se relaciona con medicamentos para el control de la obesidad. Más específicamente, se relaciona con el potencial antiobesidad de Calebina A en términos de su capacidad para causar lipólisis en adipocitos bien diferenciados. También se divulga la capacidad de Calebina A para disminuir una esteatosis hepática inducida por alto contenido de grasa en mamíferos.

10

Descripción de la técnica anterior

La obesidad es el trastorno nutricional más prevalente en los países industrializados y es un problema creciente en los países en desarrollo. Se describe como una epidemia mundial y las personas con sobrepeso y obesas (BMI de 25 y más) tienen un mayor riesgo de sufrir diversas dolencias físicas crónicas y problemas psicológicos como depresión, trastornos de la alimentación y baja autoestima. Se asocia con diversas enfermedades como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y cáncer. La OMS considera que la obesidad es una de las 10 principales causas de muerte prevenible en todo el mundo.

15

En la obesidad, hay un aumento en la masa de tejido adiposo debido a la producción de nuevas células grasas (adipocitos) a través del proceso de adipogénesis y/o la deposición de mayores cantidades de triglicéridos citoplasmáticos por célula. Una célula grasa se desarrolla a medida que las gotitas de lípidos producidas internamente se unen en una gran masa. Eventualmente, resulta la celulitis debido a la adipogénesis potenciada y la acumulación de trozos de adipocitos debajo de la dermis de la piel.

20

Los estudios de adipogénesis han continuado con la esperanza de que la manipulación de este proceso en humanos podría llevar a una reducción de la carga de la obesidad y la diabetes. A nivel molecular, varios marcadores se han dirigido al tratamiento de la obesidad, como la leptina, la adiponectina, el TNF- α , etc.

30

Aunque hay fármacos disponibles para tratar el trastorno, existe una necesidad y búsqueda constante de una metodología natural segura para ayudar a controlar la obesidad y sus consecuencias socioeconómicas relacionadas.

Se sabe que la Calebina A protege las células neuronales de lesiones β -amiloides (Park SY et al, J Nat Prod. 2002 September; 65(9):1227-31), induce apoptosis y modula la actividad de la familia MAPK en células de cáncer gástrico humano resistentes a fármacos (Li Y et al, Eur J. Pharmacol. 2008 Sep. 4;591(1-3):252-8). Zeng Y et al. (Chem Pharm Bull (Tokyo) 2007 June; 55(6):940-3) discute dos nuevos derivados de calebina, 4''-(4'''hidroxifenil-3'''-metoxi)-2''-oxo-3''-butenil-3-(4'-hidroxifenil)-propenoato y 4''-(4'''-hidroxifenil)-2''-oxo-3''-butenil-3-(4'-hidroxifenil-3'-metoxi)-propenoato, el documento US2014/0249219 divulga el potencial de Calebina A para inhibir la adipogénesis y modular favorablemente los marcadores bioquímicos asociados con la obesidad.

35

Bays H E et al, Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 6(3), 343-368, 2008, divulga el uso de agentes como los agonistas de PPAR-gamma que ayudan a reducir la hipertrofia de los adipocitos.

45

La presente invención divulga el potencial de Calebina A para prevenir la acumulación de grasa durante la diferenciación terminal de los adipocitos (células grasas) y sus aplicaciones en el manejo de la obesidad. La presente invención aclara el potencial de Calebina A para modular favorablemente marcadores bioquímicos asociados con la obesidad. Las propiedades biomoduladoras notables de Calebina A incluyen la inhibición de la producción de leptina, el aumento de la expresión de adiponectina y la inhibición de la inflamación local (adipocito) y sistémica causada por citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1 β).

50

Por consiguiente, el objetivo principal de la presente invención es divulgar el potencial antiobesidad de Calebina A. Otro objetivo de la presente invención es divulgar la capacidad de Calebina A para inducir lipólisis en adipocitos bien diferenciados. Otro objetivo de la presente invención es divulgar también la capacidad de Calebina A para disminuir la esteatosis hepática en mamíferos inducida por dieta rica en grasas.

55

La invención cumple los objetivos mencionados y proporciona otras ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

60

La presente invención divulga el potencial de Calebina A para inhibir la adipogénesis y sus aplicaciones en el manejo de la obesidad. La presente invención aclara el potencial de Calebina A para modular favorablemente marcadores bioquímicos asociados con la obesidad en mamíferos. Las propiedades biomoduladoras notables de Calebina A incluyen la inhibición de la producción de leptina, el aumento de la expresión de adiponectina y la inhibición de la inflamación local (adipocito) y sistémica causada por citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1 β). También se divulga como parte de la presente invención la capacidad de

65

Calebina A para estimular la lipólisis en adipocitos completamente diferenciados. Además, la presente invención también divulga la capacidad de Calebina A para disminuir la esteatosis hepática en mamíferos inducida por dieta rica en grasas.

5 Otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, el principio de la invención.

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier asunto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

10

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la representación gráfica del porcentaje de inhibición de la adipogénesis efectuada por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$ según se estudió mediante el método de tinción con aceite rojo O.

15

La figura 2 muestra la representación gráfica del porcentaje de inhibición de la producción de leptina en adipocitos humanos efectuada por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Valor de $P^* < 0,01$; $** < 0,001$.

20

La figura 3 muestra la representación gráfica del porcentaje de aumento de la expresión de adiponectina en adipocitos humanos efectuada por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Valor de $P^* < 0,01$.

25

Las figuras 4 y 5 muestran la representación gráfica del porcentaje de inhibición de la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ (valor de $P^* < 0,01$; $** < 0,001$) y la expresión de IL-6 (valor de $P^* < 0,01$) respectivamente, en adipocitos humanos efectuada por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

30

La figura 6 muestra la representación gráfica del efecto de la dosis múltiple de Calebina A sobre la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β en el suero de ratones Swiss Albino tratados. No. de animales= 6 por grupo, valor de $P^* < 0,01$; $** < 0,001$ prueba t de Student.

35

La figura 7 muestra la representación gráfica del efecto de la dosis múltiple de Calebina A en la expresión de IL-6 en el suero de ratones Swiss Albino tratados. No. de animales= 6 por grupo, valor de $P^* < 0,01$; $** < 0,001$ prueba "t" de Students.

40

La figura 8 muestra que Calebina A inhibe la diferenciación y la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1.

45

Las Figuras 9 (A) y (B) muestran, respectivamente, las fotografías y la representación gráfica de los efectos de la suplementación dietética en los pesos corporales de los grupos experimentales de ratones C57BL/6

50

Las Figuras 10 (A), (B) y (C) muestran el efecto de la suplementación con Calebina A sobre los pesos relativos del tejido adiposo en ratones C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasas (HFD).

55

La figura 11 muestra el efecto de la suplementación con Calebina A sobre la expresión de leptina en el suero de ratones C57BL/6.

60

La figura 12 muestra el efecto de la suplementación con Calebina A sobre la expresión de adiponectina en el suero de ratones C57BL/6.

65

La figura 13 muestra las secciones histológicas de H&E y sus representaciones gráficas de la capacidad de Calebina A (0,25% y 1%) para restaurar el tamaño de los adipocitos en el grupo de ratones HFD.

70

La figura 14 muestra la inflamación evidente en el hígado del grupo HFD en (i) el examen de la morfología general y (ii) la inflamación con degeneración balonzante y la acumulación de triglicéridos en las secciones histológicas (H&E), y la capacidad de Calebina A (0,25% y 1%) para reducir la inflamación, la degeneración balonzante y el contenido de triglicéridos en el hígado. Los mismos resultados también se representan gráficamente.

75

Descripción detallada de la invención

80

La presente invención divulga el potencial de Calebina A para prevenir la acumulación de grasa durante la diferenciación terminal de los adipocitos (células grasas) y sus aplicaciones en el manejo de la obesidad. La presente invención aclara el potencial de Calebina A para modular favorablemente marcadores bioquímicos asociados con la obesidad. Las propiedades biomoduladoras notables de Calebina A incluyen la inhibición de la producción de leptina, el aumento de la expresión de adiponectina y la inhibición de la inflamación local (adipocito) y sistémica causada por citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1 β).

85

También se divulga un método para inhibir la adipogénesis, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto los adipocitos con una cantidad eficaz de Calebina A. En otras palabras, la presente divulgación divulga un

método para prevenir la acumulación de grasa durante la diferenciación terminal de adipocitos de mamíferos (Figuras 1 y 8).

5 También se divulga un método para inhibir la expresión de leptina en adipocitos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto los adipocitos con una cantidad eficaz de Calebina A (figura 2).

También se divulga un método para aumentar la expresión de adiponectina en adipocitos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto los adipocitos con una cantidad eficaz de Calebina A (Figura 3).

10 También se divulga un método para inhibir la expresión de TNF- α de citoquinas proinflamatorias en adipocitos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto los adipocitos con una cantidad eficaz de Calebina A (Figura 4).

15 La presente divulgación divulga además un método para inhibir la expresión de interleucina-6 de la citoquina proinflamatoria en adipocitos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto los adipocitos con una cantidad eficaz de Calebina A (Figura 5).

En una realización específica, los adipocitos mencionados anteriormente aquí son adipocitos humanos.

20 La presente divulgación también divulga un método para reducir la expresión sistémica de citoquinas proinflamatorias inducida por la obesidad, en mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad eficaz de Calebina A a un sujeto que lo necesite. En realizaciones específicas, las citoquinas proinflamatorias mencionadas en este párrafo incluyen el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 β (IL-1 β) (Figuras 6 y 7).

25 La presente invención está dirigida a:

30 1. Calebina-A para uso en la restauración del tamaño normal de adipocitos, de adipocitos agrandados en el tejido graso de un mamífero obeso mediante la administración oral de Calebina-A a dicho mamífero, en el que el agrandamiento de los adipocitos resultó de un régimen de dieta alta en grasas.

35 2. Un método para inducir lipólisis en adipocitos de mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de tratar adipocitos de mamíferos con concentraciones variables de Calebina-A in vitro para provocar el efecto de la lipólisis dependiente de la dosis en dichos adipocitos.

También se divulgan:

40 1. Un método de manejo de la obesidad en mamíferos con riesgo de acumulación excesiva de grasa corporal, dicho método comprende la etapa de la suplementación dietética oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos para provocar el efecto de la inhibición de la adipogénesis.

45 2. El uso de Calebina A en el manejo de la obesidad en mamíferos con riesgo de acumulación excesiva de grasa corporal, dicho uso comprende la etapa de la suplementación dietética oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos para provocar el efecto de la inhibición de la adipogénesis

3. Un método para inhibir la adipogénesis en mamíferos con riesgo de acumulación excesiva de grasa corporal, comprendiendo dicho método la etapa de la suplementación dietética oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos.

50 4. Un método para reducir el peso corporal de mamíferos obesos, comprendiendo dicho método la etapa de administración oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos.

55 5. Uso de Calebina A en un método para reducir el peso corporal en mamíferos obesos, dicho uso comprende la etapa de administración oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos.

6. Un método para aumentar la expresión sistémica de adiponectina en mamíferos obesos, comprendiendo dicho método la etapa de la suplementación oral dietética de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos.

60 7. Un método para ayudar a prevenir, retrasar la aparición y/o lentificar la progresión de la diabetes mellitus Tipo II en un mamífero obeso, comprendiendo dicho método la etapa de administrar por vía oral cantidades terapéuticas efectivas de Calebina A a dicho mamífero para lograr un aumento de los niveles de expresión de la adiponectina sistémica.

65 8. Un método para tratar la obesidad en mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de la suplementación oral dietética de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos para provocar los efectos de la inhibición de la adipogénesis, la reducción en peso corporal y el aumento de la expresión sistémica de adiponectina.

9. Un método para promover la masa corporal magra en un mamífero, comprendiendo dicho método la etapa de la suplementación dietética oral de cantidades efectivas de Calebina A a dichos mamíferos para provocar el efecto del aumento de la masa corporal magra al cambiar la proporción entre la masa corporal magra y el tejido adiposo a favor de la masa corporal magra.

5 10. Un método para tratar la esteatosis hepática provocada por una dieta rica en grasas (HFD) en mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto las células hepáticas afectadas por HFD marcadas por infiltración inflamatoria, degeneración balonzante hepatocelular y altos niveles de triglicéridos con Calebina A derivada de la administración oral a dichos mamíferos en concentraciones efectivas de Calebina A para provocar el efecto de la atenuación de la esteatosis hepática de una manera dependiente de la dosis.

En aún otra realización preferida, el sujeto es un mamífero.

En aún otra realización preferida, el sujeto es un humano.

15 El valor terapéutico potencial de Calebina A como una molécula antiobesidad se puede entender a través de ejemplos específicos explicados aquí a continuación.

Ejemplo I

20 Toxicidad oral aguda de Calebina A

La tabla I enumera los parámetros estudiados para la toxicidad oral aguda de Calebina A.

25 Resultados:

No se observó mortalidad hasta 2.000 mg/kg p.o. en ratones hasta dos semanas de observación.

Tabla I

Parámetros estudiados para la toxicidad oral aguda de Calebina A	
Comportamiento general	Dermal
Agresión=Nulo	Escaldado=Nulo
Miedo=Nulo	Hiperemia=Nulo
Pasivo=Nulo	Cianosis=Nulo
Movimiento General=Normal	
Actividad Locomotora General=Normal	
Sistema Nervioso Central	Parámetros Generales
Excitación=Nulo	Debilidad Muscular=Nulo
Actividad Motora=Nulo	Salivación=Nulo
Temblores=Nulo	Piloerección=Nulo
Convulsiones Clonicas=Nulo	Diarrea=Nulo
Convulsiones Tonicas=Nulo	
Sistema Respiratorio	Reflejos
Rata Respiratoria=Normal	Corneal=sin efecto
Profundidad Respiratoria=Normal	Pinnal=sin efecto
Sistema Nervioso Autonómico	Comida y agua (consumo y excreción)
Actividad Motora=Normal	Producción Fecal=Normal
Ataxia=Nulo	Producción de orina=Normal
Rata Respiratoria=Normal	
Diarrea=Nulo	

Ejemplo II

Tinción aceite rojo O de cultivos adipogénicos y estimación de leptina, adiponectina, TNF- α e IL-6 por ELISA

5 La diferenciación terminal de los adipocitos se acompaña de la acumulación de grandes cantidades de lípidos en grandes vesículas citoplásmicas. Un ensayo común para medir la diferenciación de adipocitos en cultivos celulares es con la tinción aceite rojo O (ORO). ORO es un colorante rojo brillante soluble en lípidos que es un indicador confiable de la diferenciación de los adipocitos (adipogénesis).

10 Principio:

15 El aceite rojo O (Solvente Rojo 27, Sudán Rojo 5B, C.I. 26125 y C26H24N4O) es un pigmento diazo lisocromo (colorante soluble en grasa) utilizado para teñir triglicéridos y lípidos neutros en secciones congeladas y algunas lipoproteínas en secciones de parafina. Tiene la apariencia de un polvo rojo con máxima absorción a 518(359) nm. El aceite rojo O es uno de los pigmentos utilizados para la tinción de Sudán. Pigmentos similares incluyen Sudán III, Sudán IV y Sudán Negro B. La tinción debe realizarse en muestras frescas, ya que la fijación con alcohol elimina los lípidos. El aceite rojo O reemplazó en gran medida a Sudán III y Sudán IV, ya que proporciona un color rojo mucho más profundo y, por lo tanto, las tinciones son mucho más fáciles de ver.

20 El aceite rojo O es un pigmento soluble en aceite. Los pigmentos solubles en aceite exhiben una mayor solubilidad del pigmento en sustancias lipídicas en los tejidos/células, que en los disolventes de pigmento hidroalcohólico habituales. Por lo tanto, causará una tinción profunda de las células.

Metodología:

25 Se siembran células 3T3-L1 de aproximadamente 60×10^4 células durante 48-72 horas para obtener una confluencia del 70-80%. Después de 48 horas, se añaden 200 μ l de AIM (medio de inducción de adipogénesis) recién preparado. 72 horas después, se añaden a los pozos 200 μ l de APM (medio de progresión de adipogénesis) con los compuestos de prueba en diferentes concentraciones. Las células se incuban durante 48 horas en una atmósfera humidificada (37 °C) de CO₂ al 5% y aire al 95%. El sobrenadante se recolecta y almacena para la estimación de leptina, adiponectina, IL-6 y TNF- α mediante ELISA. Las células se fijan agregando 100 μ l de formalina al 10% y se realiza la tinción con ORO. Se lee OD a 492 nm en lector de microplacas. Los resultados se expresan como valores IC₅₀ utilizando el software de prisma Graphpad.

35 El porcentaje de inhibición de la adipogénesis se calcula de la siguiente manera,

$$\% \text{ inhibición} = \frac{C-T}{T} * 100$$

Donde C: la absorbancia del aceite rojo O en células diferenciadas/no diferenciadas

40 Absorbancia T de aceite rojo O en células diferenciadas/no diferenciadas tratadas con muestra. La estimación de leptina, adiponectina, IL-6 y TNF- α se realiza de acuerdo con el manual del usuario de R&D Systems.

Referencias

45 1. Wu Z, Xie Y, Morrison R F, Bucher NLR, Farmer SR 1998. PPAR γ induces the Insulin-dependent Glucose Transporter GLUT4 in the absence of C/EBP β during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. J Clin Invest. 101:22-32.

50 2. A pre-adipose 3T3 cell variant highly sensitive to adipogenic factors & to human growth hormone. L A Salazar-Olivo, F Castro-Munozledo & W Kuri-Harcuch. Department of Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Mexico D.F., Mexico. Journal of Cell Science, 1995.Vol 108, Issue 5 2101-2107.

55 3. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis. Mingui Fu, Tingwan Sun, Angie L. Bookout, Micheal Downes, Ruth T. Yu, Ronald M. Evans and David J. Mangelsdorf. Molecular Endocrinology, 2005. 19 (10): 2437-2450.

4. " Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation, Aimee D Kohn et al, J. Biol. Chem. 1996, 271:31372-31378.

60 Resultado:

La figura 1 muestra un porcentaje de inhibición de adipogénesis de 32,43%, 38,59% y 35,8%, respectivamente, realizado por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 μ g/ml estudiado por el método de tinción de aceite rojo O.

65

La figura 2 muestra el porcentaje de inhibición de la producción de leptina (34,92%, 41,04% y 39,48% respectivamente) en adipocitos humanos por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 µg/ml. La importancia de los efectos de Calebina A en la inhibición de la producción de leptina en los adipocitos humanos y su correlación con el manejo de la obesidad se deriva de los siguientes hechos (Notas sobre fisiopatología del sistema endocrino, Universidad Estatal de Colorado).

La leptina es una hormona proteica expresada predominantemente en los adipocitos. Tiene efectos importantes en la regulación del peso corporal, el metabolismo y la función reproductiva. Codificada por el gen obeso (ob), la proteína tiene una masa de aproximadamente ~16 kDa. En concentraciones normales, la función biológica de la leptina se basa predominantemente en sus efectos sobre los centros hipotalámicos del cerebro que controlan el hambre, el apetito, la regulación de la temperatura corporal y el metabolismo energético. Por lo tanto, la leptina, en un individuo no obeso, podría resultar en la pérdida de peso por dos mecanismos importantes. (i) La disminución en el hambre y el consumo de alimentos más probablemente a través de la inhibición del neuropéptido Y que controla el comportamiento de alimentación y (ii) el aumento del gasto de energía a través del aumento de la temperatura corporal, el consumo de oxígeno y la pérdida de masa de tejido adiposo. Sin embargo, la secreción excesiva de leptina, como en el caso de la obesidad o los modelos experimentales de obesidad inducida, conduce a funciones alteradas de los centros hipotalámicos de que un sujeto obeso no logra saciarse y tiende a pasar a un modo de sobrealimentación. Por lo tanto, se vuelve imperativo lograr una reducción efectiva de los niveles sobre excesivos de leptina en la obesidad y la Calebina A se muestra prometedor en esta área como se indica en la figura 2.

La figura 3 muestra el porcentaje de potenciación de la expresión de adiponectina (27,12%, 34,06% y 32,8% respectivamente) en adipocitos humanos por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 µg/ml. La adiponectina es una citoquina producida casi exclusivamente por adipocitos y se expresa en niveles muy altos por individuos magros y sanos. Los individuos obesos, por otro lado, expresan niveles reducidos de esta adipocina y son propensos a la enfermedad coronaria (CAD), la diabetes mellitus y la hipertensión.

Referencias

1. Tamar. R. Aprahamian and Flora Sam, "Adiponectin in Cardiovascular Inflammation and Obesity, *Int J. Inflamm.* 2011; 2011: 376909;
2. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2000; 20(6):1595-1599;
3. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension.* 2004; 43(6):1318-1323;
4. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2003; 23(1):85-89 y
5. Lindsay R S, Funahashi T, Hanson R L, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *The Lancet.* 2002; 360(9326):57-58.

Se muestra que la Calebina A (Figura 3) aumenta efectivamente los niveles de adiponectina en adipocitos humanos y, por lo tanto, se muestra prometedor en el área del manejo de la obesidad.

Las figuras 4 y 5 muestran el porcentaje de inhibición de TNF-α (36,03%, 40,81% y 45,47% respectivamente) e IL-6 (21,31%, 32,37% y 31,7% respectivamente) por Calebina A en concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 µg/ml. Bastard JP et al, "Recent Advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance", *Eur Cytokine Netw.* 2006 March; 17(1):4-12 cita que la obesidad está asociada con una inflamación de bajo grado del tejido adiposo blanco (WAT). Los autores también señalan que en la obesidad, el WAT se caracteriza por una mayor expresión de moléculas proinflamatorias como el TNF-α y la IL-6 que no solo ejercen efectos sobre el WAT sino también sobre otros órganos sistémicos del cuerpo. Las figuras 4 y 5 demuestran que Calebina A es eficaz para reducir la expresión de TNF-α e IL-6 en adipocitos y sería un agente útil para modular los efectos de la inflamación local y sistémica en la obesidad.

Ejemplo III

Modulación de inflamación sistémica por Calebina A

Los presentes inventores también aportan evidencia adicional para apoyar la capacidad de Calebina A para suprimir el TNF intracelular y la IL-1β extracelular en sistemas de neutrófilos murinos (Tabla II, Tabla III). Los neutrófilos se aíslan mediante un método de gradiente Histopaque probado por su capacidad para producir TNF-α in vitro después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS). Las células se incubaron con TNF-α anti-ratón marcado con ficoeritrina (PE). En la oscuridad, y después de lavarse con PBS estéril, las muestras se resuspendieron en PBS (pH 7,4) y se adquirieron directamente en el citómetro de flujo (BDLSR; Becton Dickinson). Se estableció un activador de fluorescencia en el parámetro PE (FL1) de las poblaciones de neutrófilos cerradas (10.000 eventos). En este estudio,

se utilizó rolipram a 100 µg/ml como inhibidor estándar de TNF-α. La compensación de la fluorescencia, el análisis de datos y la presentación de los datos se realizaron con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Referencias

- 5 1. Clara, B., R. C. Arancha, G. M. Andre's, P. Atanasio, A. Julia, and O. Alberto. 2003. A new method for detecting TNF-α-secreting cells using direct immunofluorescence surface membrane stainings. *J. Immuno. Methods* 264:77-87.
- 10 2. Khurshid A. Bhat, Bhahwal A. Shah, Kuldeep K. Gupta, Anjali Pandey, Sarang Bani, Subhash C. Taneja. Semi-synthetic analogs of pinitol as potential inhibitors of TNF-α cytokine expression in human neutrophils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 2009, 1939-1943.

Tabla II

Número de serie	Muestra	Concentración (µg/ml)	Expresión de TNF-α Media ± S.E	%Actividad
1	LPS Control	-	2,62 ± 0,01	-
2	Calebina A	0,5	1,87 ± 0,04*	28,62%↓
3	Calebina A	1,0	1,70 ± 0,02**	35,11%↓
4	Calebina A	2,0	1,59 ± 0,05**	39,31 %↓
5	Rolipram	100	0,73 ± 0,09**	72,13%↓

%↓: indica supresión de la expresión de TNF-α
No. de observaciones= 3
valor P: *<0,01; **<0,001 prueba t de Student

15

Tabla III

Tratamiento de muestras	Concentración (pg/ml)	% Actividad
LPS Control	51,80 ± 2,18	-
Calebina A		
0,5 µg/ml	41,24 ± 1,16*	20,38%↓
1,0 µg/ml	39,26 ± 2,52*	24,20%↓
2,0 µg/ml	37,16 ± 2,11**	28,26%↓
Rolipram estándar		
100 µg/ml	22,52 ± 1,60**	56,52%↓

% ↓ indica la supresión de la expresión de IL-1 β
No. de observaciones=3
Valor de P: * <0,01; ** <0,001 prueba t de Student

20 Los presentes inventores también aportan datos de estudio sobre la capacidad de Calebina A para reducir la expresión de TNF-α extracelular, IL-1 beta [figura 6] e IL-6 [figura 7] en suero de ratones tratados (modelos in vivo). Ratones suizos albinos machos de 6-8 semanas de edad se mantuvieron a 22 ± 2 °C en 12/12 horas de ciclo de luz oscuridad. Los ratones recibieron tratamiento oral de los medicamentos de prueba a dosis graduadas (p/v) durante 6 días, seguido de una inyección intravenosa de 1 mg/kg de LPS de acuerdo con el método descrito por Brieva A, Guerrero A, Alonso-Lebrero J L and Pivel J P. 2001. Immunoferon, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF-α

25 production and inflammatory responses. *International Immunopharmacology* 1, 1979-1987. Se emplearon seis ratones en cada grupo y los experimentos se realizaron por triplicado. La producción de TNF-α, IL-1 beta e IL-6 se evaluó mediante un kit ELISA comercial (R&D Systems) en suero de ratones tratados, 90 minutos después de la inyección de LPS. Se utilizó rolipram a 30 mg/kg como fármaco estándar.

30 Las figuras 6 y 7 demuestran que Calebina A es eficaz en la reducción de TNF-α, IL-1 beta e IL-6, lo que indica que el compuesto es un agente útil para modular los efectos de la inflamación local y sistémica en la obesidad.

Ejemplo IV

Inhibición de la adipogénesis por Calebina A

5 Cultivo celular y diferenciación de adipocitos

Se cultivaron preadipocitos 3T3-L1 de ratón adquiridos de la Colección de Cultivo Tipo Americano (Rockville, MD) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2 mM (GIBCO BRL), penicilina/estreptomicina al 1% (10.000 unidades de penicilina/mL y 10 mg de estreptomicina/mL) y suero de ternera fetal (FCS) al 10% a 37 °C bajo una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Brevemente, las células se sembraron en una placa de 24 pozos (2x10⁴/ml) o de 10 cm con DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% hasta la confluencia completa. Dos días después de la confluencia (definida como el día 0), las células se incubaron en medio de diferenciación (MDI) que contenía insulina 1,7 µM, 3-isobutilmetilxantina 0,5 mM (IBMX) y dexametasona (DEX) 12,7 mM en DMEM que contenía FBS al 10% durante 2 días. Luego se reemplazó el medio por DMEM que contenía FBS al 10% e insulina (1,7 µM) con o sin Calebina A, que se reemplazó cada 2 días. Las concentraciones finales de dimetilsulfóxido (DMSO) en el medio de cultivo fueron <0,05%. Las células se cosecharon después de 8 días (en el día 10) para la tinción con aceite rojo O.

20 Tinción aceite rojo O

Al final de la diferenciación, las células se lavaron dos veces con solución salina regulada con fosfato (PBS), se fijaron con formalina al 10% durante 60 min, se tiñeron con aceite rojo O al 0,5% en isopropanol durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de tinción de aceite rojo O se lavó dos veces con agua destilada y luego se secó. Las gotitas de lípidos teñidas dentro de las células se visualizaron con un microscopio de luz y se fotografiaron con una cámara digital con un aumento de 100x. Para cuantificar la acumulación de lípidos, las gotitas de lípidos teñidas se disolvieron en isopropanol y la absorbancia se midió a 520 nm.

La figura 8 muestra que la Calebina A inhibe la diferenciación y la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1. Diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 teñidos con aceite rojo O y fotografiados (superior y medio). Los preadipocitos 3T3-L1 se incubaron con MDI (DMEM con IBMX, DEX e insulina) durante 2 días y luego se reemplazaron con DMEM con insulina con o sin Calebina A (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µM), respectivamente, durante 8 días. El contenido de lípidos se extrajo de células teñidas con aceite rojo O mediante 2-propanol y se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico a 520 nm.

35 Experimento Animal: Estudio I

Se compraron ratones C57BL/6J machos a las 5 semanas de edad del Centro de Animales Experimentales BioLASCO (Taiwan Co., Ltd., Taipei, Taiwán) y se alojaron en una atmósfera controlada (25 ± 1 °C a humedad relativa al 50%) y con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Después de 1 semana de aclimatación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 8 animales cada uno de la siguiente manera: dieta normal (ND, 15% de energía como grasa), dieta alta en grasa (HFD; 40% de energía como grasa) y HFD suplementada con Calebina A al 0,25 % o 1% (2,5 g o 10 g de Calebina A/kg de dieta), respectivamente, durante 12 semanas (Tabla V). Las dietas experimentales se modificaron a partir de la dieta Purina 5001 (LabDiet, PMI Nutrition International) y la composición se incluye en la Tabla IV. Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua en todo momento. Las tazas de comida se reponían con una dieta fresca diaria. La ingesta de la dieta se controló en los animales todos los días y el peso corporal se registró semanalmente. Todos los protocolos de experimentación con animales utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Nacional de Marina de Kaohsiung (IACUC, NKMU). Al final del estudio, todos los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche y se sacrificaron por asfixia con CO₂. Se extrajeron muestras de sangre del corazón para análisis bioquímico. El hígado, bazo, riñón y las almohadillas de grasa (grasa perigonadal, retroperitoneal y mesentérica) se retiraron de inmediato, se pesaron (Tabla VI) y se fotografiaron. La figura 9 (A) muestra las fotografías representativas de cada grupo al final de la semana 12. El peso corporal se monitorizó semanalmente y el peso corporal promedio de cada grupo se expresó como la media ± SE. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. (*)P<0,01, comparado con el grupo ND; (#)P<0,01, en comparación con el grupo HFD. ND, dieta normal y HFD, dieta alta en grasa (figura 9 (B)).

Las figuras 10 (A), (B) y (C) muestran las fotografías de grasa perigonadal, grasa retroperitoneal y mesentérica y también la representación gráfica del % de peso relativo de grasa perigonadal, retroperitoneal y mesentérica.

Tabla IV

Composición de las dietas experimentales				
Composición/Ingrediente	ND	HFD	HFD+0,25% Calebina A	HFD+1% Calebina A
Composición de macronutrientes				

% de energía de proteína	20,0	14,0	14,0	14,0
% de energía de carbohidrato	65,0	46,0	46,0	46,0
% de energía de grasa	15,0	40,0	40,0	40,0
Ingrediente g/kg				
Manteca de cerdo	-	150,0	150,0	150,0
Aceite de soja	-	15,0	15,0	15,0
Colesterol	-	1,0	1,0	1,0
Calebina A	-	-	2,5	10,0
Contenido energético kJ/g	35,8	50,7	50,7	50,7

Tabla V

Efecto de Calebina A en el aumento de peso corporal y la ingesta de alimentos en ratones alimentados con HFD ^a				
Parámetros de peso	ND	HFD	HFD + 0,25% Calebina A	HFD + 1% Calebina A
Peso inicial (g)	21,06 ± 0,99	22,13 ± 1,13	22,27 ± 0,49	21,88 ± 0,91
Peso final (g)	28,05 ± 1,08	38,63 ± 3,92***	35,28 ± 2,38	31,99 ± 2,50 [#]
Ganancia en peso (g)	6,99 ± 0,48	16,50 ± 2,90*	13,02 ± 2,52	10,12 ± 2,48 ^{##}
Ingesta de alimentos (g/ratón/día)	4,35 ± 0,63	3,77 ± 0,52	3,57 ± 0,47	3,57 ± 0,40

5 ^aLos ratones fueron alimentados con dieta durante 12 semanas como se describe en materiales y métodos, y los pesos corporales se controlaron dos veces por semana. El peso corporal promedio de cada grupo se expresa como la media ± SE (n=8 por grupo), y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. ND, dieta normal; HFD, dieta alta en grasas. *,P<0,01, y ***,P<0,0001 en comparación con el grupo ND. #,P<0,01, y ##P<0,001 en comparación con el grupo HFD.

10

Tabla VI

Efectos de Calebina A sobre el peso relativo de los órganos en ratones alimentados con HFD ^a				
órgano	ND	HFD	HFD + 0,25% Calebina A	HFD + 1% Calebina A
hígado (%)	3,86 ± 0,36	4,74 ± 0,66	4,05 ± 0,28	4,00 ± 0,25
Riñón (%)	1,30 ± 0,07	1,29 ± 0,23	1,22 ± 0,12	1,30 ± 0,15
Vaso (%)	0,20 ± 0,07	0,22 ± 0,09	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,04

15 ^a Los ratones recibieron HFD suplementado con o sin Calebina A (0,25 y 1%) durante 12 semanas. Los ratones de cada grupo se sacrificaron al final de la semana 12; el hígado, bazo y riñón se extrajeron, fotografiaron, pesaron y registraron. Los datos se presentan como la media ± SE (n=8 por grupo). El peso relativo de los órganos se expresa como un porcentaje del peso corporal (peso del hígado/peso corporal × 100). ND, dieta normal y HFD, dieta alta en grasa.

20 Experimento animal: Estudio 2: demostración de la pérdida de peso corporal en modelos de mamíferos obesos

Detalles del sistema de prueba

Especies animales	Ratones
Cepa	C57
origen	interno
intervalo de peso corporal	Machos: 22,1–25,8 g Hembras: 20,3–23,9 g

Edad al tratamiento	8-10 semanas
Número de Grupos	5 grupos (un control, un control de dieta alta en grasas y tres grupos de tratamiento)
Número de animales/grupo	Cada grupo consta de 10 animales (5 machos + 5 hembras). Las hembras utilizadas fueron núlparas y no embarazadas
Número total de animales	50
Identificación	Tarjetas de jaula y método de muesca del animal individual

Rendimiento de la prueba

A. Crianza

- 5 a. Condiciones: Los animales se alojaron bajo condiciones de laboratorio estándar, con aire acondicionado y suministro de aire fresco adecuado (cambios de aire de 12 a 15 por hora), temperatura ambiente de 22 ± 3 °C, humedad relativa de 30-70%, con ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se registran una vez al día.
- 10 b. Alojamiento: Los animales individuales se alojaron en una jaula de polipropileno estándar (Tamaño: L 290 x B 140 x H 140 mm) con una rejilla superior de malla de acero inoxidable que tiene instalaciones para contener pellas de pienso y agua potable en una botella de agua equipada con un tubo para succión de acero inoxidable. La cáscara de arroz esterilizada limpia se proporciona como material de cama.
- 15 c. Aclimatación: Los animales se aclimataron durante 5 días a condiciones de laboratorio y se observaron signos clínicos diariamente.
- 20 d. Dieta: los animales se alimentaron ad libitum con pienso de laboratorio AMRUT fabricado por Pranav Agro Industries Limited, Sangli, Maharashtra durante la aclimatación. Dieta de fuente abierta D12450B (con 10 kcal% de grasa) y dieta de fuente abierta D12492 dieta alta en grasa (con 60 kcal% de grasa) fabricado por Research Diet Inc, Estados Unidos, obtenido de Indus Marketing, Hyderabad, Andhra Pradesh, India se utilizó para la inducción de la obesidad y el estudio principal.
- 25 e. Agua: Se proporcionó agua potable limpia ad libitum durante el período de aclimatación y de inducción de la obesidad. Se proporcionó agua de pozo profundo pasada a través de la unidad de ósmosis inversa en botellas plásticas de agua con tubos para succión de acero inoxidable.

B. Agrupamiento

30 La agrupación de animales se realizó el último día de aclimatación mediante el método de aleatorización y estratificación del peso corporal. La agrupación de animales se realizó de tal manera que la variación del peso corporal de los animales utilizados no exceda de $\pm 20\%$ del peso corporal medio de cada grupo.

C. Diseño del estudio

35 Los animales se dividieron en 5 grupos, a saber, los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 consistían en 10 animales (5 machos y 5 hembras) cada uno. Los detalles del grupo, las dosis y el número/sexo de los animales por grupo se presentan en la Tabla VII.

Tabla VII

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg peso corporal)	Número de animales		Números de animales	
			Macho	Hembra	Macho	Hembra
G1	Control (con 10 kcal% de grasa)	-	5	5	1-5	26-30
G2	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	-	5	5	6-10	31-35
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	5	5	5	11-15	36-40

G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	10	5	5	16-20	41-45
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	20	5	5	21-25	46-50
Total:			25	25	-	-
Número total de animales:			50			

D. Tratamiento animal

5 a. Volumen de dosis: volumen de dosis/animal= 10 ml/kg de peso corporal para todos los animales durante todo el período de estudio

10 b. Inducción de la obesidad: los animales del grupo de control G1 se alimentaron con la dieta de control normal pienso D12450B que contenía 10 kcal% de grasa y los animales del grupo G2 a G5 se alimentaron con la dieta de alto contenido en grasa pienso D12492 que contenía 60 kcal% de grasa durante la inducción de la obesidad y durante el estudio principal.

15 c. Estudio principal: el estudio principal se inició después de la inducción de la obesidad. Las 3 dosis de Calebina A se administraron a animales a partir del día 29 diariamente de forma consecutiva durante un período de 28 días. La alimentación con dietas continuó en el estudio principal de manera similar a la realizada en la inducción de la obesidad. A los animales del grupo de control G1 y el grupo de control de dieta alta en grasas G2 se les administró CMC al 0,5% (carboxi metil celulosa), mientras que animales de otro grupo recibieron el objeto de prueba desde el día 29 hasta el día 56 del período de estudio. El volumen de dosis de administración se mantuvo de acuerdo con el peso corporal semanal de los animales individuales. La duración total del estudio fue de 61 días (5 días de período de aclimatación + 28 días de inducción de obesidad + 28 días de estudio principal).

20 Análisis estadístico: los datos sin procesar obtenidos del presente estudio se sometieron a procesamiento estadístico por ordenador. La impresión en ordenador de los datos (en forma de apéndice) se verificó con los datos sin procesar originales. Después de la verificación, los datos se sometieron a ANOVA de una vía (Análisis de varianza) con la prueba posterior de Dunnett para los datos sobre pesos corporales, hematología y parámetros de química clínica, pesos de órganos usando GraphPad Prism versión 5.01, GraphPad Software. Todos los análisis y comparaciones se evaluaron a un nivel de confianza del 95% (P<0,05), indicado por los superíndices designados de ^a donde G1 se compara con G3, G4, G5 y G6 y ^b donde G2 se compara con G3, G4, G5 y G6 a lo largo del informe como se indica a continuación: *: estadísticamente significativo (P<0,05), donde sea aplicable.

30 Los datos se sometieron a un análisis estadístico ANOVA de una vía mediante la comparación de lo siguiente:

35 Grupo G1 {Grupo control (con 10 kcal% de grasa)} al grupo G3 {Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, Grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G5 {Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} como se representa a continuación:

Grupo control G1 (con 10 kcal% de grasa)	Grupo G3 Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G4 Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G5 Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)

40 G2: control de la dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa) al grupo G3 {Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G5 {Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} como se representa a continuación:

Grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	Grupo G3 Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G4 Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)

	Grupo G5 Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
--	---

Resultados

5 Peso corporal: los pesos corporales individuales de los animales se registraron el día de la recepción el día 1 y semanalmente (± 1 día) a partir de entonces durante el período de estudio.

El resumen del peso corporal semanal de los animales machos y hembras se presenta en las Tablas VIII (a)/VIII (b) y IX (a)/IX (b), respectivamente.

10

Tabla VIII (a)

PESO CORPORAL (gramos)					
GRUPO	TRATAMIENTO	DÍAS			
		1	8	15	22
G1 ^a	Control (con 10 kcal% de grasa)	25,30 \pm 1,49	26,12 \pm 1,83	26,60 \pm 2,03	26,86 \pm 2,01
G2 ^b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	25,20 \pm 0,89	26,30 \pm 1,44	28,22 \pm 1,10	30,10 \pm 1,44
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas	25,02 \pm 1,45	25,78 \pm 1,14	27,68 \pm 0,95	29,98 ^{***a} \pm 1,03
G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	25,28 \pm 0,88	25,82 \pm 0,91	27,58 \pm 0,65	29,92 ^{***a} \pm 0,97
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	25,88 \pm 1,25	26,66 \pm 1,73	28,94 ^{*a} \pm 1,59	30,64 ^{***a} \pm 1,16

n=5; Los valores son Media \pm Desviación Estándar; *-Diferencia significativa, P>0,05

Tabla VIII (b)

PESO CORPORAL (gramos)						
GRUPO	TRATAMIENTO	DÍAS				
		29	36	43	50	56
G1 ^a	Control (con 10 kcal% de grasa)	27,26 \pm 2,45	28,42 \pm 3,09	28,64 \pm 3,16	28,90 \pm 3,35	29,26 \pm 3,49
G2 ^b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	31,72 \pm 1,66	32,50 \pm 1,47	33,90 \pm 1,52	34,94 \pm 1,19	35,96 \pm 0,90
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas	30,92 ^{***a} \pm 1,37	31,70 ^{*a} \pm 1,09	30,84 ^{***b} \pm 1,49	30,04 ^{***b} \pm 2,13	29,98 ^{***b} \pm 1,93
G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	31,02 ^{***a} \pm 0,70	31,06 ^{***b} \pm 1,55	29,80 ^{***b} \pm 1,48	28,98 ^{***b} \pm 1,10	28,62 ^{***b} \pm 1,18
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	31,86 ^{***a} \pm 1,14	31,48 ^{***b} \pm 1,21	29,12 ^{***b} \pm 1,34	27,74 ^{***b} \pm 1,28	27,54 ^{***b} \pm 1,87

n=5; Los valores son Media \pm Desviación Estándar; *-Diferencia significativa, P>0,05

Tabla IX (a)

PESO CORPORAL (gramos)					
GRUPO	TRATAMIENTO	DÍAS			
		1	8	15	22
G1 ^a	Control (con 10 kcal% de grasa)	23,18 ± 0,91	24,12 ± 1,21	24,68 ± 0,90	25,36 ± 0,80
G2 ^b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	22,86 ± 1,05	23,82 ± 0,94	25,18 ± 1,00	26,48 ± 0,55
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas	22,36 ± 0,65	23,18 ± 0,79	24,36 ± 0,87	25,66 ± 0,48
G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,16 ± 0,99	24,16 ± 1,29	25,62 ± 1,26	26,76 ± 1,27
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,52 ± 1,10	24,66 ± 1,24	26,26 ^{*a} ± 1,05	27,26 ^{*a} ± 1,25

n=5; Los valores son Media ± Desviación Estándar; *-Diferencia significativa, P>0,05

Tabla IX (b)

PESO CORPORAL (gramos)						
GRUPO	TRATAMIENTO	DÍAS				
		29	36	43	50	56
G1 ^a	Control (con 10 kcal% de grasa)	25,68 ± 0,79	26,28 ± 0,86	26,88 ± 0,83	27,52 ± 0,70	28,08 ± 0,73
G2 ^b	Dieta alta en grasas	28,10	29,14	30,26	32,00	33,16
	Control (con 60 kcal% de grasa)	± 0,42	± 0,36	± 0,63	± 0,54	± 0,36
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasas	27,40 ^{* a} ± 0,60	28,18 ^{**a} ± 0,68	28,46 ^{* a, **b} ± 0,71	28,20 ^{***b} ± 0,45	28,12 ^{***b} ± 0,70
G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	28,46 ^{*** a} ± 1,10	28,64 ^{***a} ± 0,62	28,16 ^{* a, ***b} ± 0,36	27,54 ^{***b} ± 0,38	27,04 ^{***b} ± 0,47
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	28,74 ^{***a} ± 0,93	28,40 ^{**a} ± 1,03	27,80 ^{***b} ± 0,99	27,44 ^{***b} ± 0,95	27,10 ^{***b} ± 0,93

n=5; Los valores son Media ± Desviación Estándar; *-Diferencia significativa, P>0,05

5 En animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en el día 15 en el grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {grupo control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron relacionados con la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

10 En animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en los días 22 y 29 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

15 En animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en el día 36 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {grupo control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

20

5 En animales machos, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores de peso corporal semanal medio en el día 36 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 {dieta control alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron relacionados con el efecto de la administración del objeto de prueba Calebina A.

10 En animales machos, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores de peso corporal semanal medio en los días 43, 50 y 56 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 {control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la administración del objeto de prueba Calebina A.

15 En animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en los días 15 y 22 en el grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {grupo control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

20 En animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en los días 29 y 36 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {grupo control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

25 En animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio en el día 43 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, en comparación con el grupo G1 {Grupo control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la diferencia en el contenido de grasa del pienso.

30 En animales hembras, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores de peso corporal semanal medio en los días 43, 50 y 56 en el grupo G3 {Calebina A-5 mg/kg + dieta alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {Calebina A-10 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {Calebina A-20 mg/kg + dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 {dieta control alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)}. Estos cambios se consideraron debidos a la administración del objeto de prueba Calebina A.

35 Por lo tanto, se podría concluir que Calebina A tuvo un efecto en la disminución de los pesos corporales de los animales C57 machos y hembras, obesos por inducción con dieta alta en grasa a concentraciones de prueba de 5, 10 y 20 mg/kg de peso corporal.

40 Además, una vez completado el período de estudio (día 57), los animales se sacrificaron humanamente mediante exposición al exceso de CO₂ en la cámara de gas y se anotaron los pesos de los órganos. El cerebro, timo, hígado, glándulas suprarrenales, riñones (emparejados), bazo, corazón y ovarios/testículos (emparejados) de todos los animales se recortaron del tejido adherente, según corresponda, y se pesaron en húmedo lo antes posible para evitar el secado. Si bien en general, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso de los órganos en machos y hembras, se observaron mejoras en el peso, específicas de los órganos, por ejemplo, el hígado en el grupo de machos (ver Tabla X). Este resultado se corrobora con los de la Tabla VI para hígado. Cabe señalar que Behnke, A. R. 1953. Lean body mass. A.M.A. Arch. Int. Med. 91, 585 indica que el hígado es un índice de la promoción de la masa corporal magra y H.F. Kraybill et al, J ANIM SCI 1954, 13:548-555 indican que otros órganos viscerales también pueden ser igualmente predictivos de la promoción de la masa corporal magra. Es bastante posible que la importancia estadística en términos de aumento sostenible en el peso de los órganos sin indicaciones de toxicidad pueda lograrse con un tamaño de muestra más grande (mayor número de animales analizados) durante períodos de prueba prolongados. Los resultados de la Tabla VI y la Tabla X pueden interpretarse como una indicación preliminar del potencial de Calebina A no solo para inhibir la adipogénesis y reducir el peso corporal, sino también para promover la masa corporal magra.

55

Tabla X

GRUPO	TRATAMIENTO	PESO DEL HÍGADO (g)
G1 ^a	Control (con 10 kcal% de grasa)	1,47 ± 0,36
G2 ^b	Dieta control alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)	1,60 ± 0,35
G3	Calebina A 5 mg/kg + dieta alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)	1,41 ± 0,17
G4	Calebina A 10 mg/kg + dieta alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)	1,25 ± 0,17
G5	Calebina A 20 mg/kg + dieta alta en grasa (con 60 kcal% de grasa)	1,79 ± 0,19

Además, al finalizar el período de estudio, se recogieron muestras de sangre de todos los animales en tubos que contenían anticoagulante de ácido etilendiamida tetraacético potásico (K2-EDTA) para la estimación de la expresión sistémica de leptina y adiponectina. Las muestras de sangre se recolectaron humanamente con el método de punción del plexo retro-orbital bajo anestesia suave con éter con la ayuda de un tubo capilar fino. Las muestras de sangre recolectadas en tubos sin anticoagulante se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos para obtener un suero que se sometió a una técnica ELISA para la estimación de leptina y adiponectina. La importancia de la expresión de leptina y adiponectina como biomarcadores en la obesidad se ha discutido bien en los párrafos 0050 y 0051. La Calebina A mostró un efecto insignificante en la inhibición de la expresión de leptina en el suero de animales obesos (Figura 11) y mostró un efecto significativo en la potenciación de la expresión de adiponectina en los niveles séricos de animales obesos (Figura 12). Los niveles sistémicos bajos de adiponectina se han citado como factores predictivos en la progresión de estados de enfermedad como la diabetes mellitus tipo II (Chamukuttan Snehalatha et al, "Plasma Adiponectin Is an Independent Predictor of Type 2 Diabetes in Asian Indians", Diabetes Care December 2003 vol. 26 no. 12 3226-3229). La capacidad de Calebina A para potenciar significativamente los niveles de adiponectina sistémica en modelos de obesidad en mamíferos indica su capacidad para ayudar a prevenir la aparición de diabetes mellitus tipo II en dichos mamíferos.

20 Calebina A y su efecto sobre la lipólisis y el tamaño de los lipocitos

Los adipocitos completamente diferenciados (8 días) sin tratamiento previo con Calebina A como se describe en las etapas del procedimiento descritas en los párrafos [0067] y [0068] se trataron con Calebina A en concentraciones de 5-30 μ M. La lipólisis se vinculó a la descomposición de los lípidos en glicerol que se liberó en el medio de cultivo celular y se detectó del mismo. Se observó que Calebina A en una concentración de 5-20 μ M no produjo la liberación de glicerol en el medio. El glicerol se detectó cuando se utilizó Calebina A a una concentración de 30 μ M para tratar los adipocitos. Por lo tanto, en otra realización más preferida, la presente invención se relaciona con un método para inducir lipólisis en adipocitos de mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de tratar adipocitos de mamíferos con concentraciones variables de Calebina A para provocar el efecto de la lipólisis dependiente de la dosis en dichos adipocitos. Refiriéndose a los párrafos 0073 y 0074 aquí anteriormente, la inducción de la obesidad en ratones C57BL/6J machos mediante el tratamiento con HFD durante un período de 12 semanas y la evaluación de las secciones histológicas de la grasa del epidídimo (adipocitos) o en el tejido conectivo de la grasa en general, mostró un agrandamiento notable en el tamaño de adipocitos. Las almohadillas de grasa del epidídimo se diseccionaron y se fijaron en formalina regulada al 10% durante al menos 24 horas, luego se deshidrataron con una secuencia de soluciones de etanol y se procesaron para su inclusión en parafina. Se cortaron secciones de 5-6 μ m de grosor, se eliminó la parafina, se rehidrataron, se tiñeron con haema-toxilina y eosina (H&E) y se sometieron a evaluación fotomicroscópica. El tamaño de los adipocitos se determinó utilizando un microscopio de luz Nikon (Japón) equipado con un micrómetro ocular a 200X de magnificación en 10 campos aleatorios por sección. Cuando los ratones HFD se trataron con Calebina A en concentraciones de 0,25% y 1%, se observó una reducción notable en el tamaño de los adipocitos y los adipocitos mostraron una morfología normal (figura 13). Por lo tanto, en otra realización más preferida, la presente invención se relaciona con un método para restaurar el tamaño de adipocitos en el tejido graso de mamíferos obesos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto (a) adipocitos de mamíferos agrandados en los que el agrandamiento resulta de un régimen de dieta alta en grasa, y (b) Calebina A derivada a través de la administración oral de concentraciones efectivas de Calebina A a dichos mamíferos, para lograr el efecto de la restauración del tamaño normal de adipocitos en el tejido graso.

La Calebina A y su efecto sobre la esteatosis hepática inducida en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (figura 14)

50 Los ratones C57BL/6J alimentados con HFD durante un período de 12 semanas se evaluaron para determinar los niveles séricos de GOT y GTP. Los resultados indicaron GOT y GTP séricos potenciados (Tabla XI) en comparación con el grupo ND.

Tabla XI

	ND	HFD	HFD + 0,25% Calebina A	HFD + 1% Calebina A
TCHO (mg/dl)	117,00 ± 3,61 ^a	162,67 ± 15,89 ^b	136,50 ± 7,51 ^c	110,50 ± 17,97 ^a
TG (mg/dl)	144,33 ± 10,41 ^a	151,00 ± 8,89 ^a	121,25 ± 6,55 ^b	89,75 ± 5,85 ^b
HDL (mg/dl)	100,80 ± 7,95 ^a	109,40 ± 1,34 ^a	107,80 ± 2,05 ^a	104,50 ± 8,80 ^a
GOT (U/l)	120,33 ± 17,10 ^a	335,28 ± 18,80 ^b	110,33 ± 2,52 ^b	77,50 ± 11,12 ^c
GPT (U/l)	25,80 ± 6,91 ^a	38,25 ± 8,92 ^b	23,00 ± 2,92 ^c	32,50 ± 3,00 ^a

5 Los datos se presentaron como la media ± SE (n=8 por grupo). Los valores medios dentro de cada columna con diferentes marcadores (a, b, c) son significativamente diferentes (p<0,05) por ANOVA de una vía y la Prueba de rangos múltiples de Duncan. ND: dieta normal; HFD: dieta alta en grasa.

10 En comparación con el grupo ND, el hígado del grupo HFD estaba notablemente agrandado como se ve en la observación morfológica general (daño hepático inducido por HFD, esteatosis hepática). Una porción de los hígados en diferentes grupos se diseccionó y se fijó en formalina regulada al 10% durante al menos 24 horas, luego se deshidrató con una secuencia de soluciones de etanol y se procesó para su inclusión en parafina. Se cortaron secciones de 5-6 µm de grosor, se eliminó la parafina, se rehidrataron, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se sometieron a evaluación fotomicroscópica. La histopatología hepática se evaluó de acuerdo con el sistema NAFLD descrito en Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van, N.M., Behling, C. et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005, 41, 1313-1321. La puntuación de la balonización hepatocelular se calificó de 0 a 2 en función del número de células balonizadas por campo a un aumento de 200x (calificación: 0= sin células balonizadas; 1= pocas células balonizadas; 2= células balonizadas prominentes) en las secciones teñidas con H&E. El número de células inmunes infiltrantes se contó con un aumento de 200x en cinco áreas diferentes. En el grupo HFD se observó una degeneración inflamatoria significativa, degeneración balonizante hepatocelular y acumulación de triglicéridos. El análisis cuantitativo indicó niveles elevados de triglicéridos hepáticos en comparación con el grupo ND. La administración de Calebina A a concentraciones de 0,25% y 1% de HFD atenuado indujo triglicéridos, degeneración balonizante hepatocelular e infiltración inflamatoria de forma dependiente de la dosis. Por consiguiente, también se divulga un método para tratar la esteatosis hepática inducida por dieta alta en grasa (HFD) en mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto células hepáticas afectadas por HFD marcadas por infiltración inflamatoria, degeneración balonizante hepatocelular y altos niveles de triglicéridos con Calebina A derivado de la administración oral a dichos mamíferos de concentraciones efectivas de Calebina A para provocar el efecto de la atenuación de la esteatosis hepática de una manera dependiente de la dosis. Alternativamente, la presente divulgación también divulga Calebina A para tratar la esteatosis hepática inducida por dieta rica en grasas (HFD) en mamíferos.

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

5 1. Calebina-A para uso en la restauración del tamaño normal de adipocitos, de adipocitos agrandados en tejido graso de un mamífero obeso mediante la administración oral de Calebina-A a dicho mamífero, en la que el agrandamiento de los adipocitos resultó de un régimen de dieta alta en grasas.

10 2. Un método para inducir lipólisis en adipocitos de mamíferos, comprendiendo dicho método la etapa de tratar adipocitos de mamíferos con concentraciones variables de Calebina-A in vitro para provocar el efecto de la lipólisis dependiente de la dosis en dichos adipocitos.

Fig.1

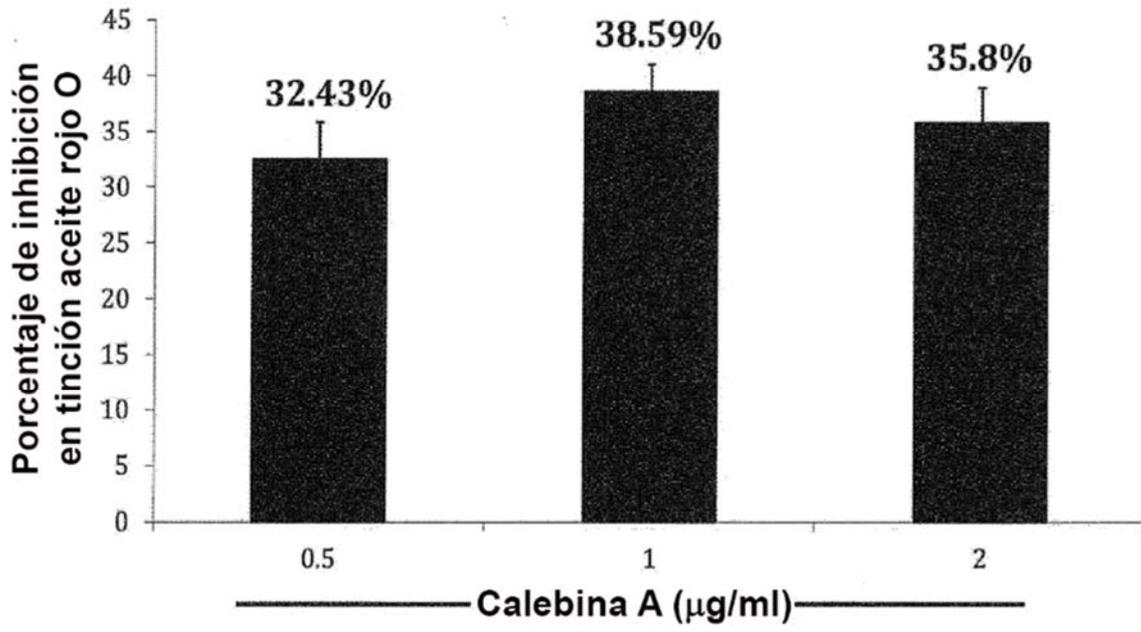


Fig.2

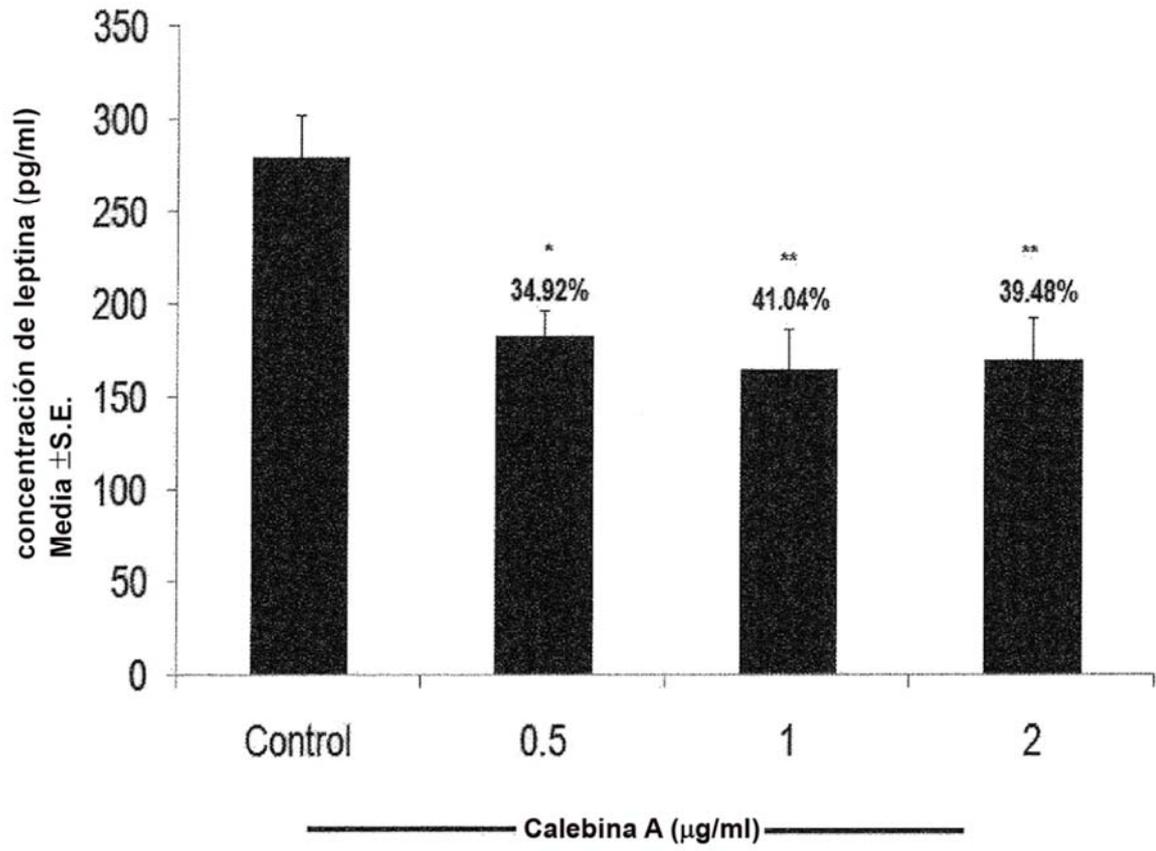


Fig.3

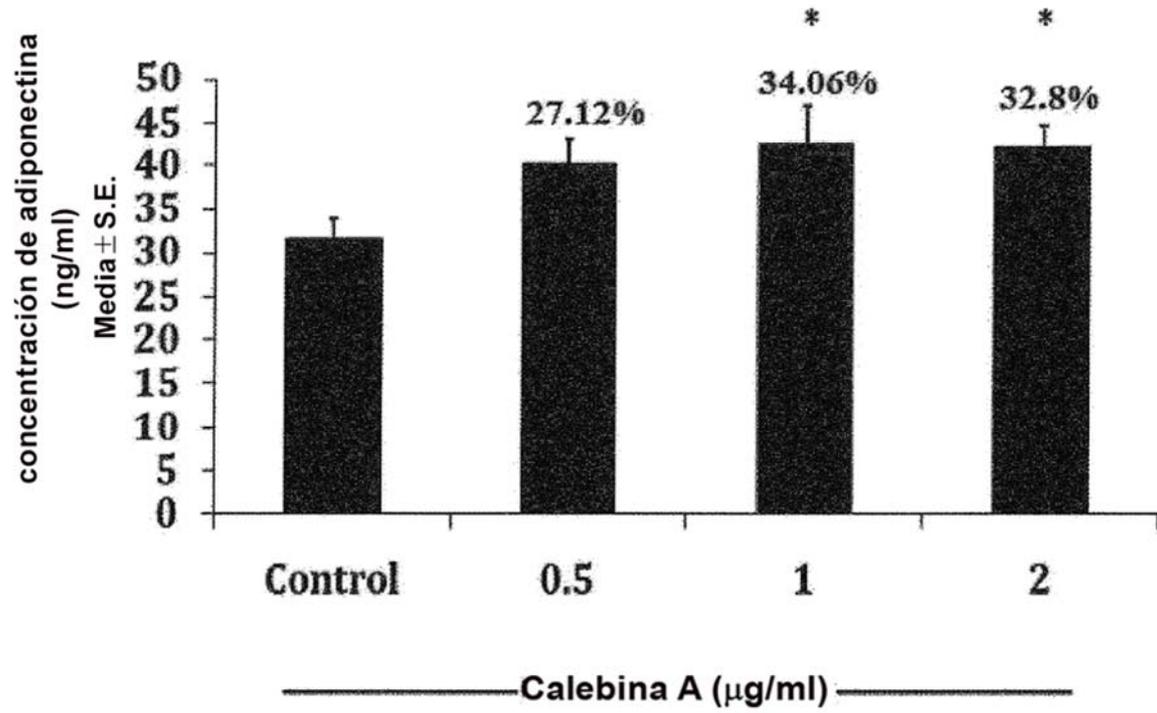


Fig.4

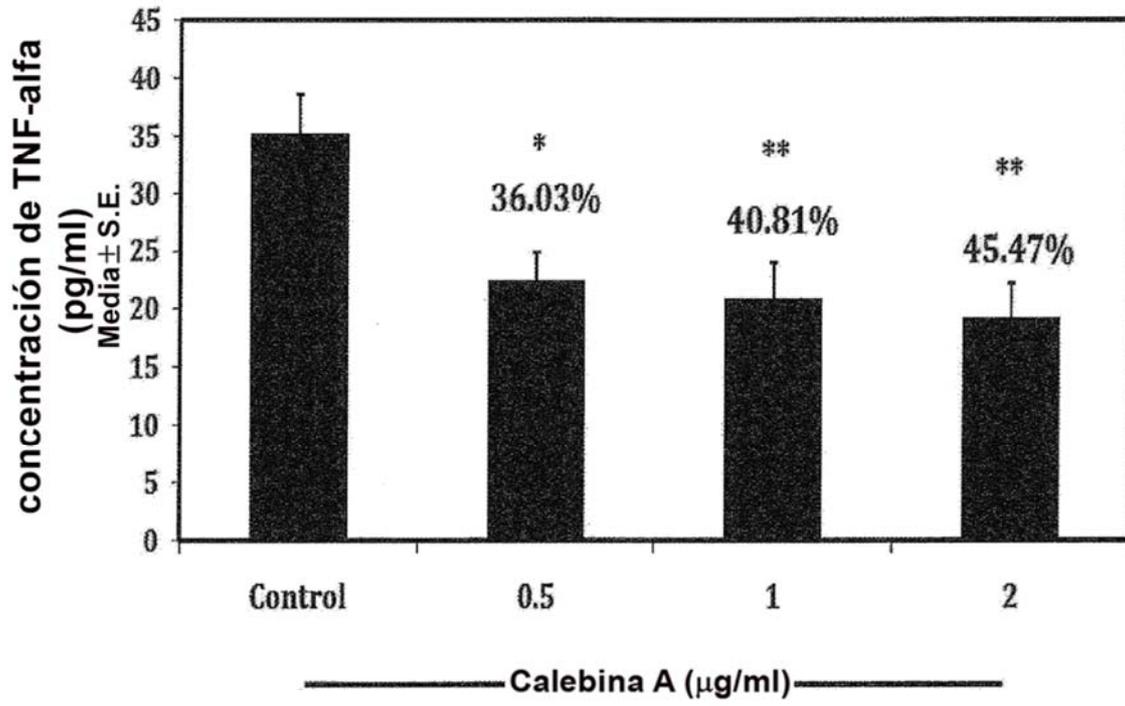


Fig.5

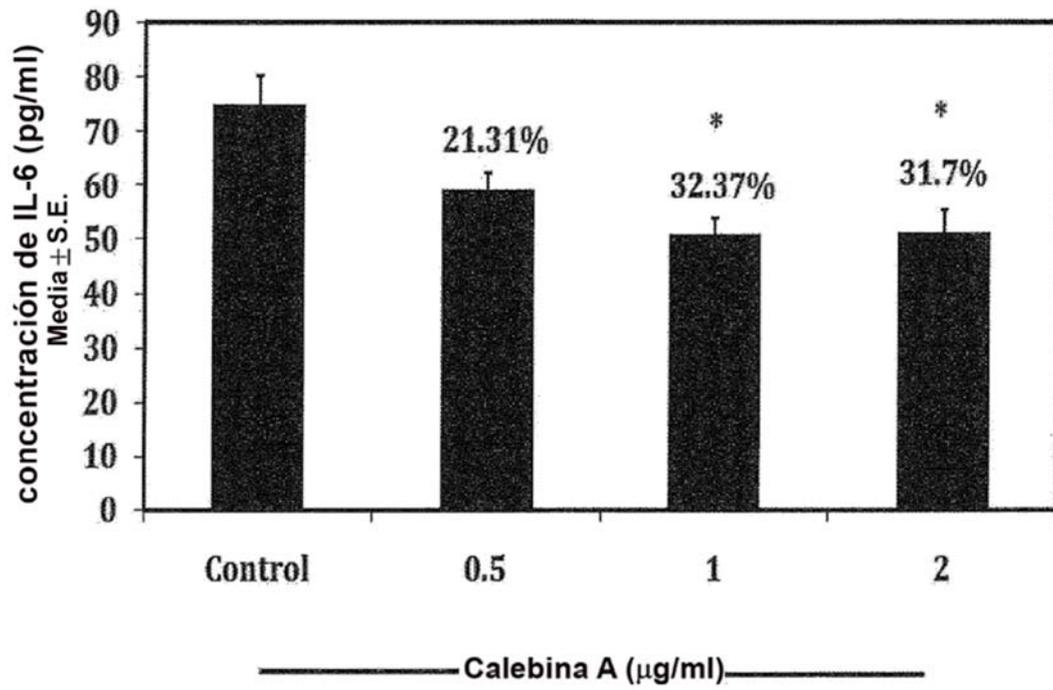


Fig.6

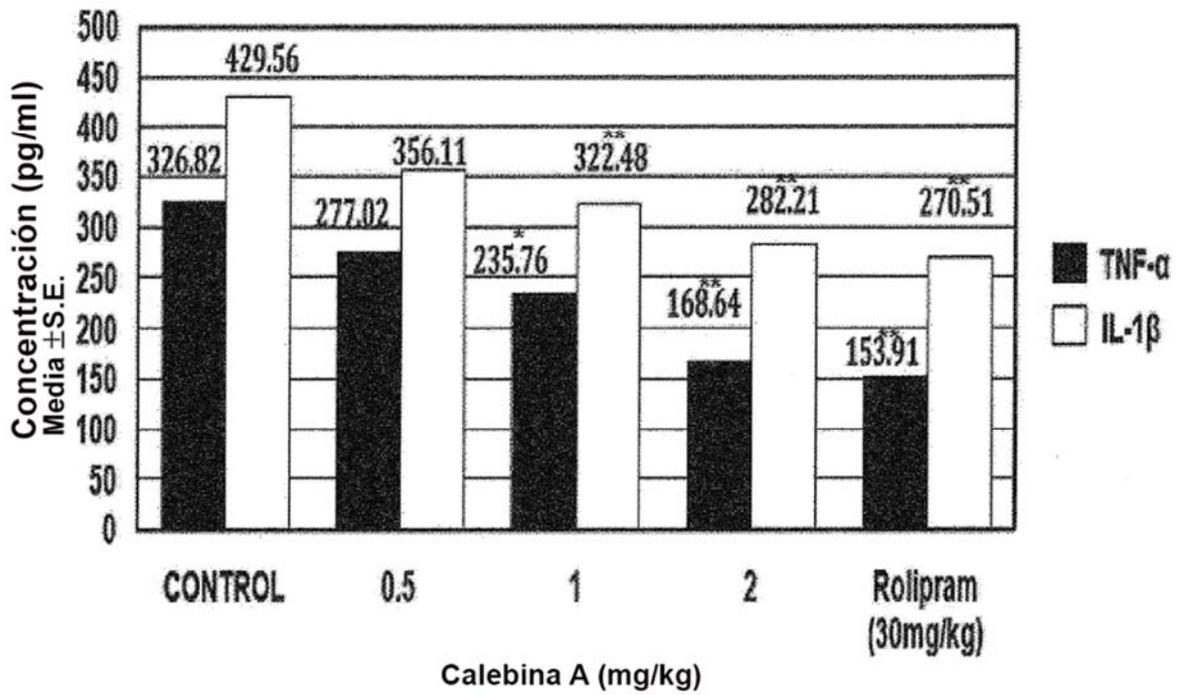


Fig.7

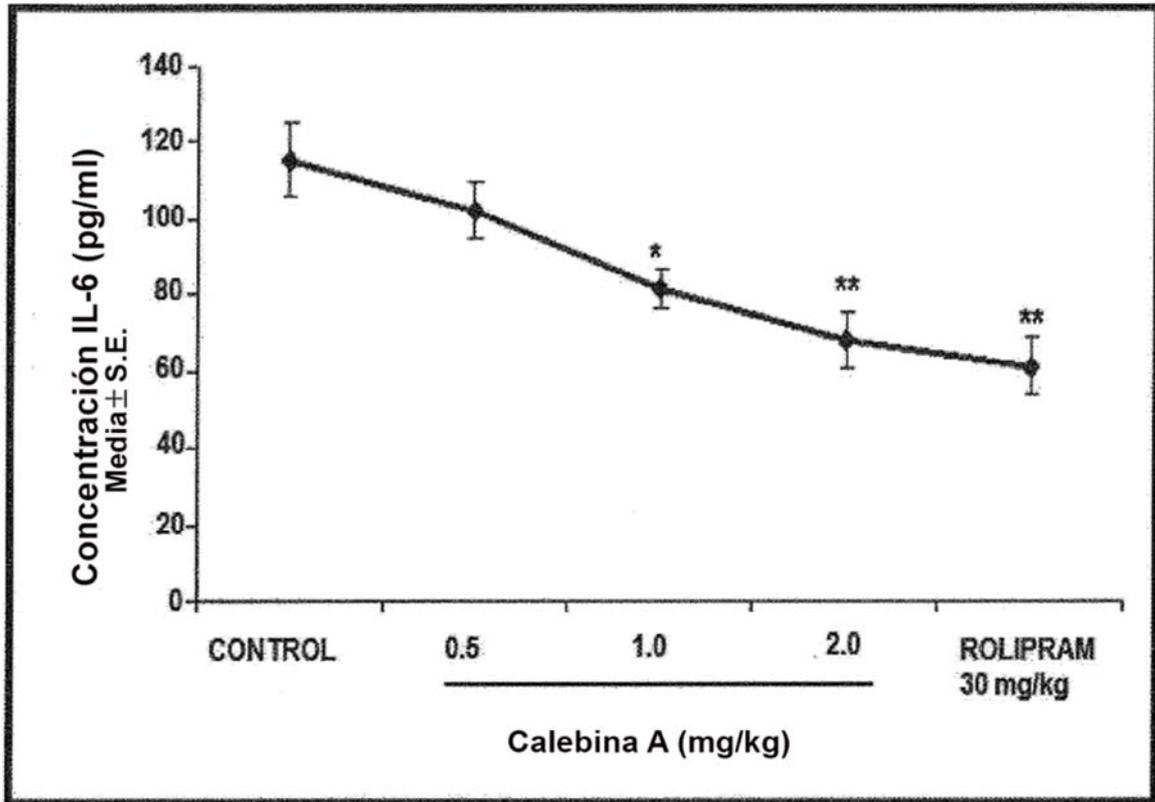


Fig.8

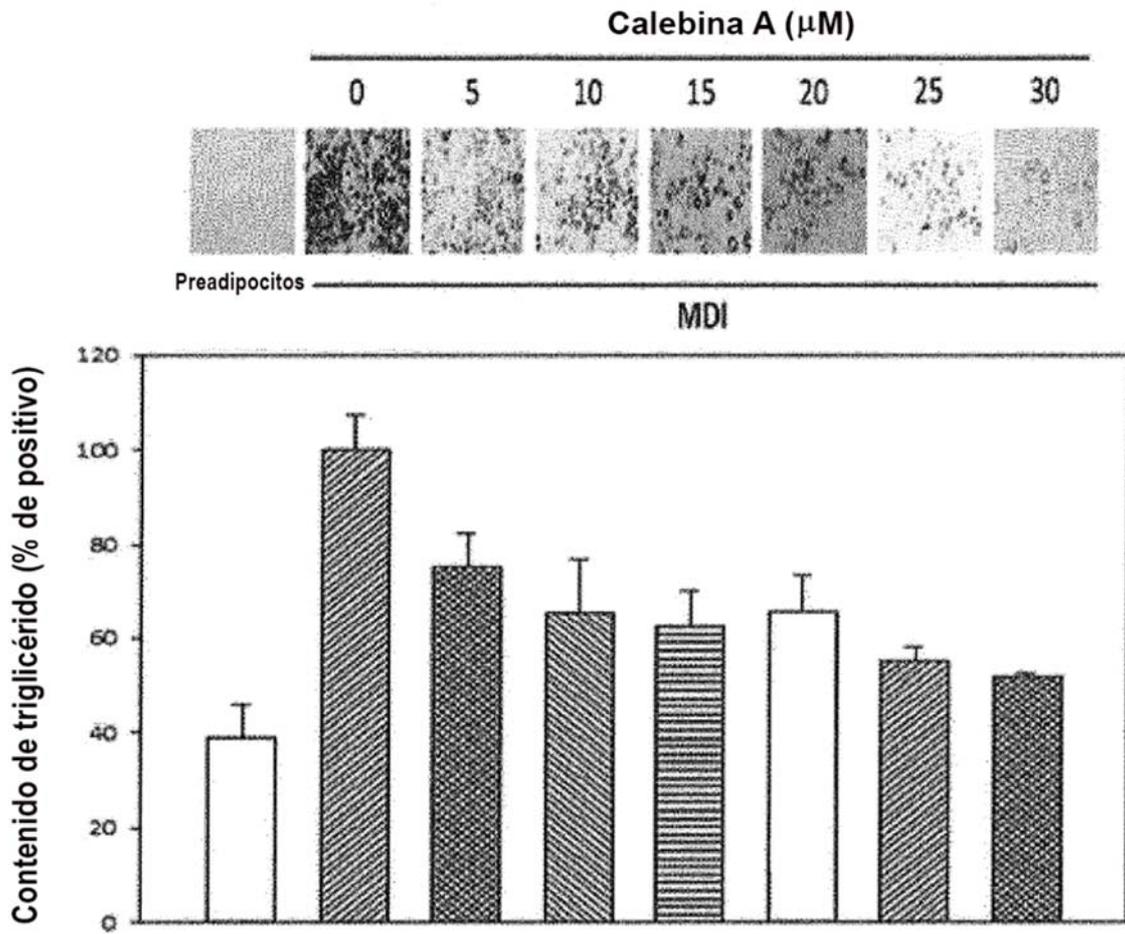
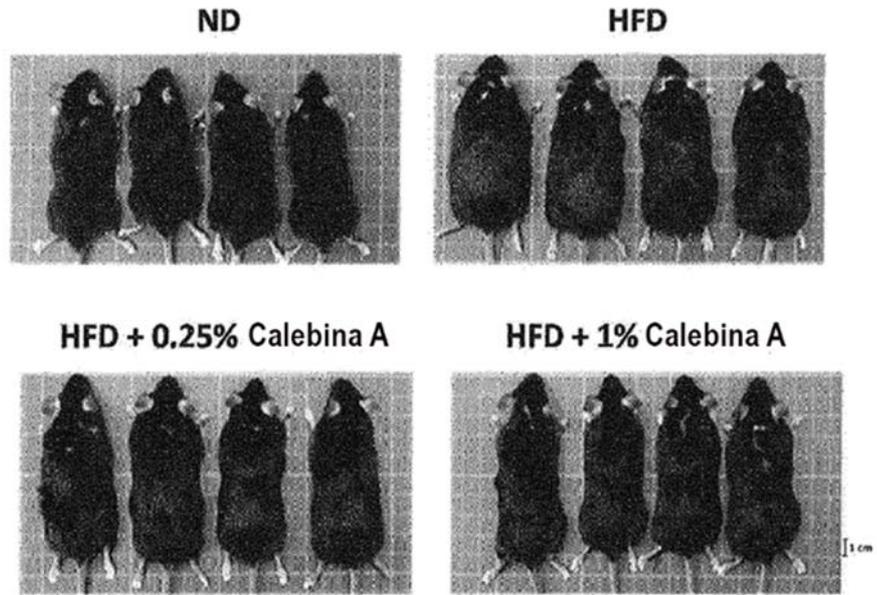


FIG 9

(A)



(B)

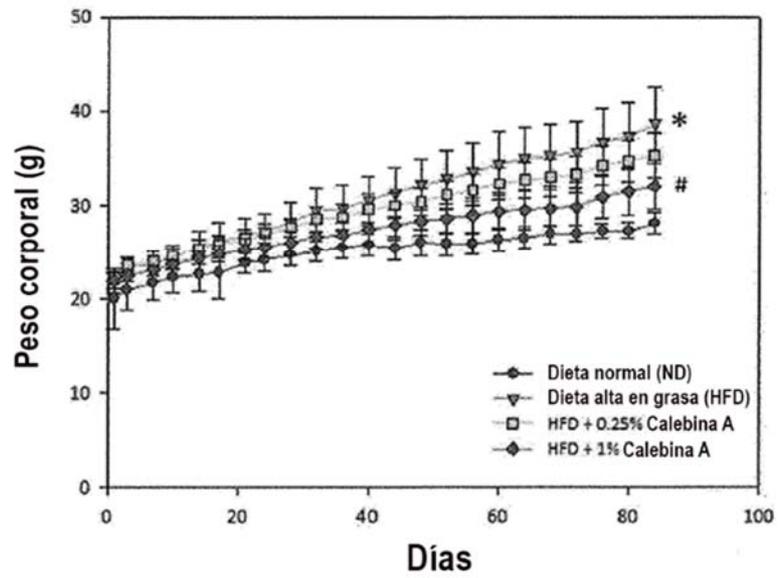


FIG 10 (A)

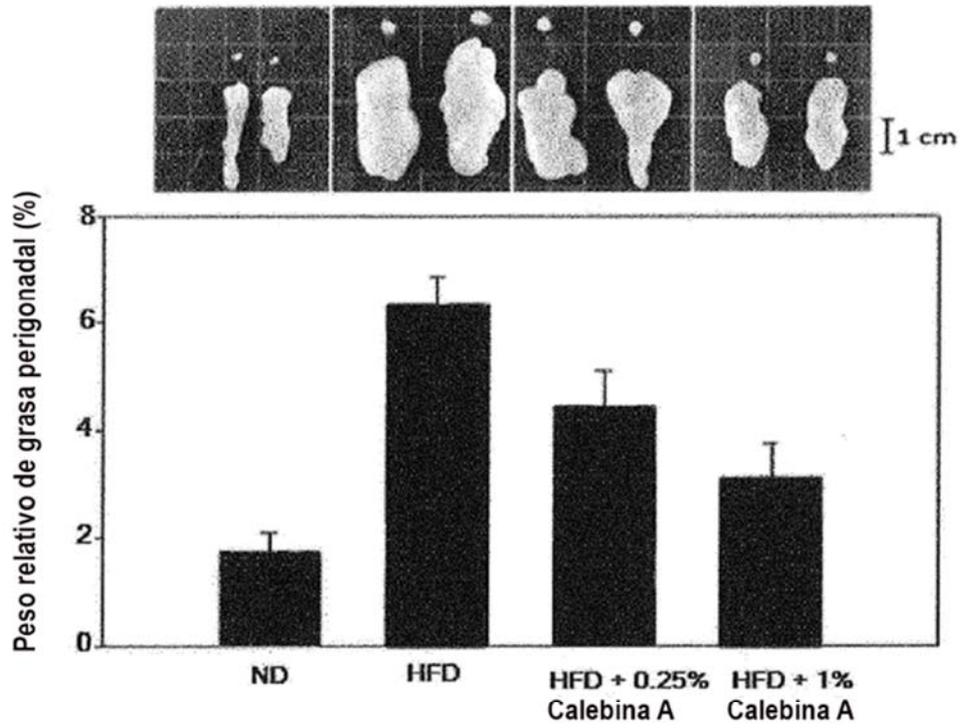


FIG 10 (B)

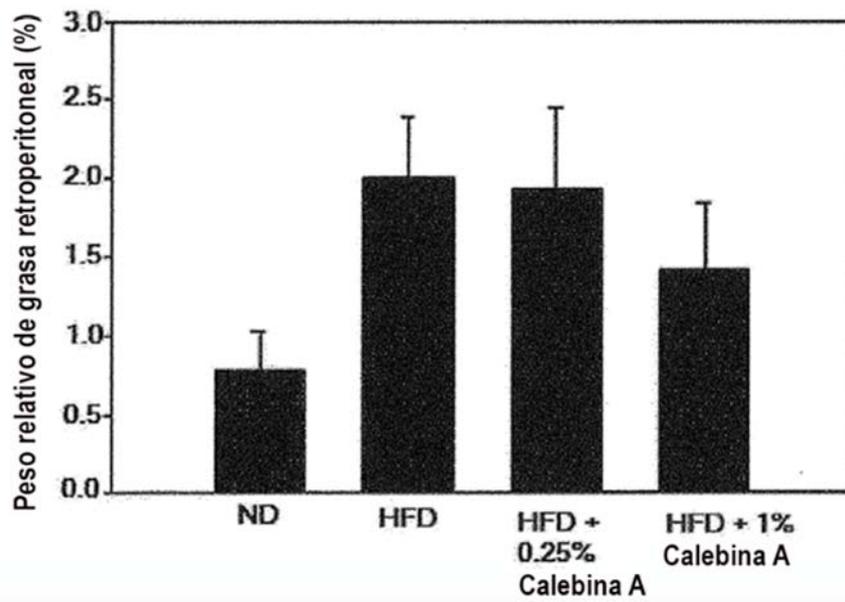


FIG 10 (C)

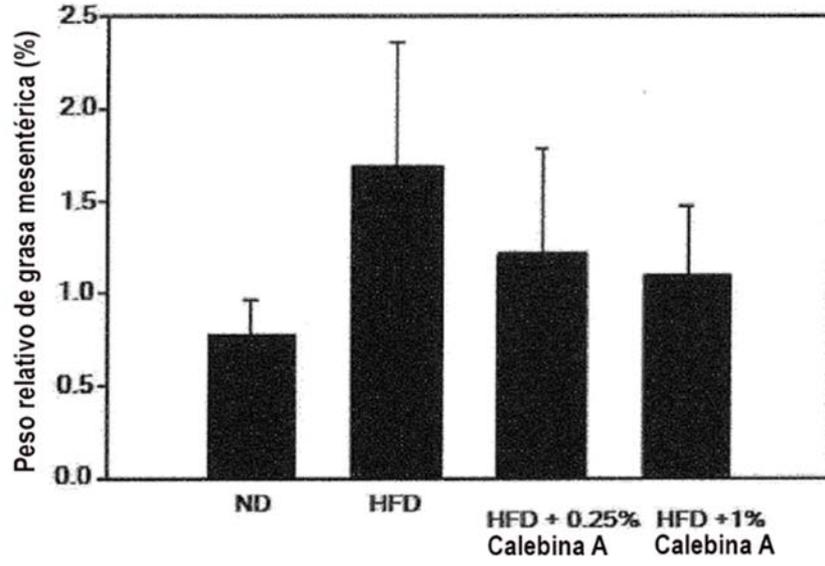


FIG.11

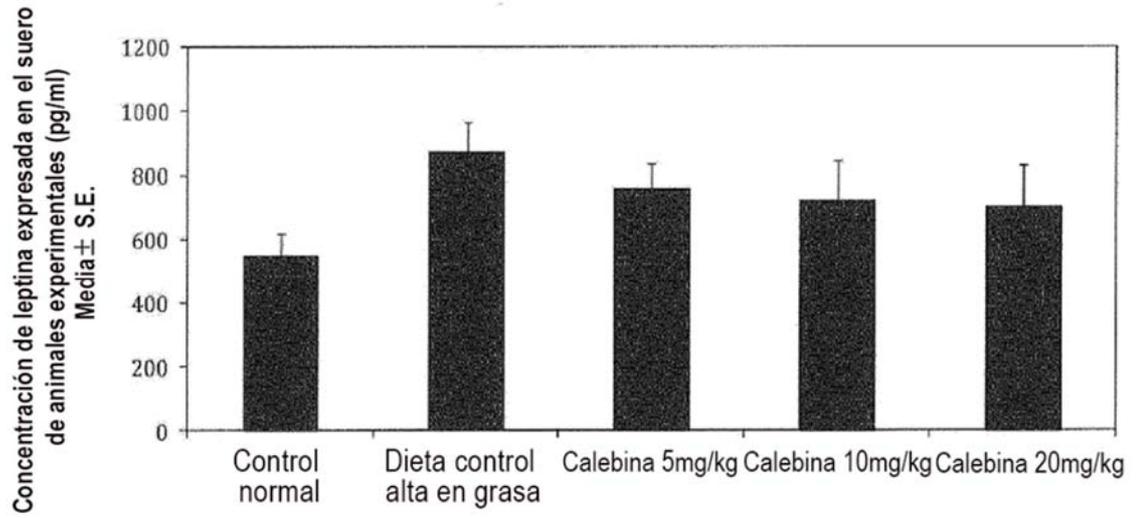
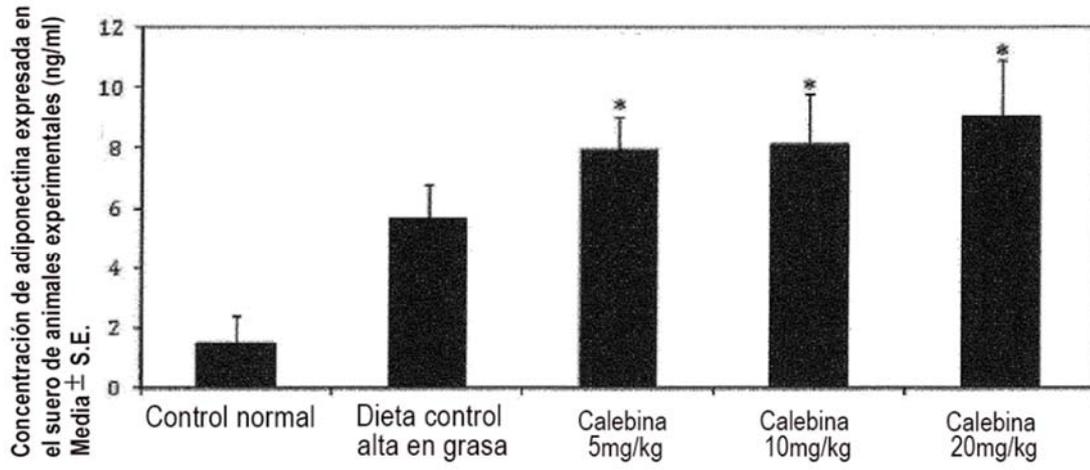


FIG.12



*: valor $P < 0,01$

FIG. 13

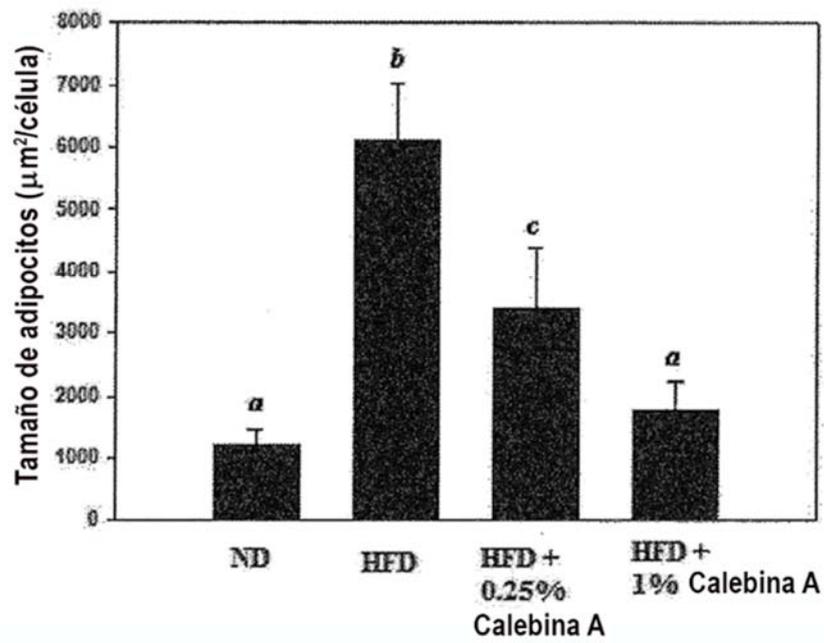
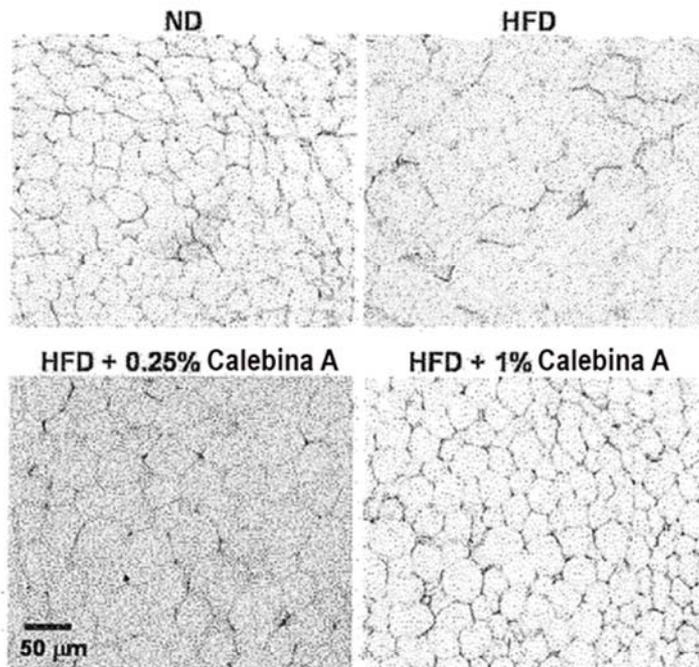


FIG. 14

