



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 341 204**

⑫ Número de solicitud: 200801306

⑬ Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **06.05.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2010**

Fecha de la concesión: **13.01.2011**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **25.01.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
25.01.2011

⑲ Titular/es:
Universidade de Santiago de Compostela
Edif. CACTUS-CITT Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑳ Inventor/es: **Varela, Luis;**
Tovar, Sulay;
Nogueiras, Rubén;
Vázquez, María J.;
López, Miguel;
Diéguez, Carlos;
Sangiao-Alvarellos, Susana;
Lage, Ricardo y
González, C. Ruth

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Uso de RSTN para la reducción de peso corporal.**

㉓ Resumen:

Uso de RSTN para la reducción de peso corporal.

Uso de RSTN para la elaboración de una composición farmacéutica para la modulación del metabolismo de ácidos grasos en un mamífero, para su reducción del peso corporal, y más particularmente para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad.

ES 2 341 204 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de RSTN para la reducción de peso corporal.

- 5 La invención se refiere al uso de la resistina (RSTN) para la reducción del peso corporal de mamíferos, y más particularmente para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad.

Estado de la técnica anterior

- 10 El hipotálamo es un área especializada del cerebro que consta de grupos neuronales anatómicamente definidos (núcleos), que integran tanto el control de la homeostasis energética como la regulación de la ingesta. Los núcleos hipotalámicos forman circuitos neuronales vía proyecciones axonales. La teoría clásica del control de ingesta planteaba la hipótesis de que estos núcleos respondían directamente a cambios en el estado energético modificando la expresión de neurotransmisores/neuromoduladores, que provocan cambios en la ingesta y en el gasto energético. Hay, además, 15 evidencias que sugieren que las rutas metabólicas hipotalámicas, tales como el metabolismo de ácidos grasos, también juegan un gran papel en el control de la ingesta, mediante la integración de estímulos periféricos y neuropéptidos. A pesar de los considerables progresos en la identificación de estos circuitos centrales implicados en la regulación de la ingesta, el mecanismo mediante el cual el estado energético está inicialmente monitorizado por neuronas hipotalámicas no es completamente conocido. Está bien establecido que las hormonas circulantes tales como insulina, 20 leptina, ghrelin, el péptido YY y los glucocorticoides y estrógenos actúan en el hipotálamo aportando información sobre la homeostasis energética desde tejidos periféricos. Sin embargo, nuevas hormonas periféricas, tales como resistina (RSTN), han surgido como potenciales señales que conectan el sistema nervioso central (SNC) con el estado metabólico.

- 25 La RSTN, también conocida como análogo 3 de la familia de moléculas FIZZ (encontradas en la zona inflamatoria), es una hormona producida por tejido adiposo, inicialmente involucrada en la modificación de la sensibilidad a insulina, diferenciación del adipocito e inflamación (Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001), *Nature* 409:307-312; Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2003), *J Clin Invest* 111:225-230; Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala 30 MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA (2004), *Science* 303:1195-1198). Al igual que otras adipocitoquinas, la expresión de RSTN está muy afectada por el estado nutricional y metabólico, ya que la privación de comida lleva a un descenso en la expresión de mRNA RSTN, y la RSTN circulante está aumentada en roedores obesos y también en humanos obesos. A pesar de su producción y función en el adipocito, ha sido recientemente publicado que RSTN está también expresada en el hipotálamo y que activa neuronas hipotalámicas 35 *in vitro*.

- La administración central de RSTN tiene un doble efecto sobre la homeostasis metabólica mediante la inhibición de la ingesta (Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castañeda TR, Vázquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Dieguez C (2005), *Eur J Endocrinol* 153.R1-R5) y controlando la homeostasis de glucosa induciendo resistencia 40 hepática a la insulina (Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS (2007), *J Neurosci* 27:12924-12932).

Descripción de la invención

- 45 En la presente invención se demuestra que la administración crónica de RSTN reduce de manera significativa el peso corporal e induce un mayor cambio en la lipogénesis *de novo* periférica, de un modo tejido específico y dependiente de nutrición. Así, en condiciones de alimentación *ad libitum* la RSTN central estimula la síntesis de ácidos grasos en el hígado mientras en condiciones de ayuno esto sucede también en tejido adiposo blanco ("*white adipose tissue*" - WAT-).

- 50 Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de RSTN para la elaboración de un compuesto farmacéutico que modifique el metabolismo de ácidos grasos en un mamífero, por su capacidad de reducir el peso corporal en dichos mamíferos (animales o humanos). Como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la administración de la RSTN interviene en diversas rutas metabólicas tales como el metabolismo de ácidos grasos, tanto a nivel hipotalámico como periférico. El efecto de la administración de este compuesto de forma continuada deriva en una 55 disminución del peso corporal.

Por tanto, en una realización preferida, la composición farmacéutica se utiliza para controlar o reducir el peso corporal en mamíferos que se ven afectados por una enfermedad que se agrava por el aumento de peso corporal.

- 60 En este sentido, otro aspecto de la invención versaría sobre una composición farmacéutica que comprende RSTN, útil para controlar o reducir el peso corporal y su aplicación, entre otras cosas para el tratamiento de la obesidad, preferiblemente para el tratamiento de la obesidad mórbida.

Esta composición farmacéutica puede comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 65 En cada caso la composición se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición descrita anteriormente se puede presentar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida (e.g., comprimidos, grageas, cápsulas, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), por vía parenteral

(e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), rectal,..... o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición proporcionada por esta invención es continuada.

Por tanto, cualquier dispositivo adecuado para administración continua de la composición farmacéutica sería adecuado en el contexto de la presente invención.

Los datos obtenidos en la presente invención muestran que el tratamiento de RSTN induce un marcado descenso en el nivel de neuropéptidos orexigénicos, especialmente AgRP (péptido relacionado con agutí) y NPY (neuropéptido Y), y un notable incremento en los niveles del neuropéptido anorexigénico CART (*transcrito regulado por cocaína y anfetamina*), que podría explicar su potente efecto en la reducción de ingesta en ratas alimentadas. Ya que el receptor que medio el efecto de la resistina está todavía sin caracterizar, no es posible, de momento, medir los eventos moleculares implicados en la activación del receptor de RSTN.

A pesar de que esos datos de neuropéptidos en ratas realimentadas (sometidas a ayuno y realimentadas durante el tratamiento) se corresponden bastante bien con los efectos anorécticos de la RSTN, la ausencia de efectos de resistina sobre animales alimentados es paradójica. Más trabajos midiendo los efectos de la RSTN sobre animales con delección específica de los genes que codifican estos neuropéptidos deberían responder esta cuestión.

Los resultados sugieren que el efecto anoréctico de RSTN podría estar mediado a través de acciones específicas sobre el ARC (núcleo arcuato) y el VMH (hipotálamo ventromedial). Puesto que está bien establecido que el ARC es el principal centro regulador hipotalámico de la ingesta se ha examinado primero el efecto de la administración central RSTN sobre los neuropéptidos derivados del ARC. Los datos muestran que el tratamiento con RSTN induce un marcado descenso en los niveles de neuropéptidos orexigénicos, especialmente de AgRP y NPY, y un notable incremento en los niveles del neuropéptido anorexigénico CART, se explica así su potente efecto reductor de ingesta en ratas realimentadas.

Recientes evidencias sugieren que las rutas metabólicas hipotalámicas, tales como el metabolismo de ácidos grasos, también juegan un papel clave en el control de la ingesta, por lo que se ha medido el efecto de RSTN sobre el metabolismo lipídico hipotalámico.

La administración aguda de RSTN disminuye la expresión de FAS (sintasa de ácidos grasos) en el VMH de ratas alimentadas. Puesto que recientes evidencias indican que la inhibición farmacológica y genética de FAS en este núcleo disminuye la ingesta, estos resultados sugieren que la acción anorexigénica de RSTN podría estar mediada por inhibición específica de la expresión de FAS en el VMH de ratas alimentadas. La ausencia de efecto de la resistina sobre la expresión de FAS en ratas en ayuno está relacionado con la expresión de FAS ya reducida en estos animales; en este sentido, recientes datos de nuestro grupo sugieren que la expresión de FAS en el hipotálamo no puede caer hasta el umbral para asegurar una tasa basal de síntesis de ácidos grasos.

Además de FAS, datos recientes han implicado también a AMPK (proteína quinasa dependiente de AMP) hipotalámica y su enzima diana ACC (acetil CoA carboxilasa) en el control del ingesta, integrando señales periféricas, tales como adiponectina y leptina, con el sistema de neuropéptidos. La actividad ACC está alostéricamente regulada mediante fosforilación de AMPK. AMPK activada fosforila e inhibe ACC, reduciendo el flujo de sustratos en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos hipotalámicos e incrementando la ingesta. Como la resistina (RSTN) inhibe AMPK en el hígado se investigaron los efectos de la administración central de RSTN sobre el sistema AMPK/ACC. Así los datos muestran que la RSTN induce una marcada activación de AMPK y una consecuente inactivación de ACC en el hipotálamo. Dado el efecto anoréctico de la RSTN y la inactivación del AMPK hepático después del tratamiento con RSTN, los resultados podrían parecer contradictorios; sin embargo, efectos opuestos sobre AMPK han sido también descritos para leptina en el hipotálamo y periferia. En cualquier caso, las razones para esta discrepancia son interesantes. De hecho, la inactivación de ACC, después de la activación de AMPK, podría ser un mecanismo de compensación fisiológico que contribuye a prevenir los altos niveles de malonil-CoA en el hipotálamo después de la inhibición de FAS en el VMH, que también explica el transitorio efecto anoréctico de RSTN. En este sentido, la medida de la actividad de CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa I) no revela ningún cambio en el hipotálamo de ratas alimentadas tratadas con RSTN, por lo que los niveles de malonil-CoA no cambian como consecuencia de la inactivación de ACC.

Datos recientes sugieren que el sistema nervioso central juega un papel clave en el control de la glucosa periférica y el metabolismo lipídico. Así, nosotros evaluamos los efectos de la administración crónica de RSTN sobre el metabolismo lipídico en tejido adiposo blanco e hígado. Nuestros datos mostraron que la RSTN inducía lipogénesis *de novo* en ambos tejidos de modo dependiente del estado nutricional, estando incrementado en el hígado de ratas alimentadas y en el tejido adiposo de ratas en ayuno. El significado fisiológico de este efecto es interesante. La disminución del metabolismo lipídico es una de las características ya establecidas de la resistencia a la insulina y puede estar mediada por cambios en la expresión génica y en rutas de señalización intracelular, llevando así a un desequilibrio energético, alteración de la acción de la insulina, y síndrome metabólico. Además, triglicéridos, ácidos grasos libres (FFAs), y

colesterol, como se ha demostrado, intervienen en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y resistencia a la insulina. En consecuencia, los cambios inducidos por RSTN en enzimas implicados en la regulación del consumo de triglicéridos y el metabolismo lipídico, tales como LPL (lipoproteín lipasa), ACC, FAS y SCD-1 (estearoil-CoA desaturasa), así como de factores transcripcionales que regulan el metabolismo lipídico, tales como SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador de esteróles) están probablemente relacionados con la alterada sensibilidad a insulina observada después de la administración crónica de RSTN. Datos recientes han propuesto que la RSTN central induce resistencia a insulina hepática incrementando la expresión de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α y IL-6, mediante un mecanismo nervioso autónomo no identificado. Cogiendo juntos estos datos sugieren que las alteraciones en adipocitoquinas proinflamatorias pueden ser parcialmente debidas al exceso de acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado después del tratamiento central con RSTN. Interesantemente, el consumo de triglicéridos y lipogénesis *de novo* fueron incrementados por la RSTN en WAT, pero no en el hígado, en estado de ayuno. Considerando que la privación de comida lleva a la disminución de la expresión de RSTN y la RSTN circulante está incrementada en roedores y en humanos obesos, es tentador especular que la suplementación de RSTN a animales en ayuno es suficiente para mimetizar el efecto del estado alimentadas sobre la activación de la salida de lípidos y anabolismo, que hace de la RSTN una molécula de doble acción: anabólica en la periferia y catabólica en el hipotálamo.

En resumen, los datos demuestran que la resistina regula la ingesta y el peso corporal en roedores. Esta acción anoréctica implica la activación del AMPK hipotalámico y la inactivación de pasos enzimáticos de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos *de novo*, concretamente ACC y FAS. Además, los datos apuntan que la resistina induce simultáneos cambios metabólicos en diferentes tejidos que son relevantes para ambos, control de la homeostasis del peso corporal y el uso de sustratos y reparto de nutrientes a nivel periférico. Así, cuando la actividad de la resistina hipotalámica está incrementada una respuesta coordinada provoca la deposición de grasa incrementando la síntesis de lípidos en el hígado y WAT, y que este efecto podría estar implicado en la resistencia a insulina inducida por RSTN.

El conocimiento de las acciones centrales de RSTN aporta un modelo excepcional para desenredar las interacciones entre el hipotálamo, adipocitoquinas, y periferia, que mejoran el conocimiento del síndrome metabólico y obesidad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35 Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la ingesta en ratas alimentadas y realimentadas (previamente ayuno) (A) y expresión de SOCS-3 en hipotálamo mediobasal (B) después de la administración aguda de RSTN (1.5 horas) a nivel central; **:P<0.01 vs. control vehículo; ***:P<0.001 vs. control vehículo; ###: P<0.001 ayuno vehículo vs. ayuno RSTN.

Fig. 2. Muestra la expresión (superior: 5X; inferior: 20X) de AgRP (A), NPY (B), POMC (C) y CART (D) en el ARC de ratas control y en ayuno después de la administración aguda de RSTN (1.5 horas) a nivel central **:P<0.01 vs. control vehículo; ***:P<0.001 vs. control vehículo; ##: P<0.01 ayuno vehículo vs. ayuno RSTN; ###: P<0.001 ayuno vehículo vs. ayuno RSTN.

Fig. 3. Muestra la expresión (5X) de MCH (A) y OX (B) en el LHA de control y fase ratas después de la administración central aguda de RSTN (1.5 horas).

Fig. 4 Muestra los niveles de proteína hipotalámica de pAMPK, AMPK α 1, AMPK α 2, pACC, ACC α , y ACC β 5 (A y B) y niveles de mRNA de FAS en el VMH (C y D) de ratas control y ayuno después de la administración central aguda de RSTN (1.5 horas). *: P<0.05 vs. control vehículo; **:P<0.01 vs. control vehículo; ***:P<0.001 vs. control vehículo.

Fig. 5. Muestra los cambios en el peso corporal (A y B) e ingesta (C) de ratas control y ayuno que recibían la administración crónica de RSTN icv durante 6 días. El grupo en ayuno recibía alimentación *ad libitum* durante los 4 primeros días y se les quitaba la comida las últimas 48 h de tratamiento. *: P<0.05 vs. control vehículo.

Fig. 6. Muestra la expresión de LPL (A), ACC α (B), FAS (C), SCD-1 (D) y SREBP-1c (E) y actividad CPT-1 (F) en el hígado de ratas control y ayuno después de la administración crónica de RSTN (6 días). *: P<0.05 vs. control vehículo; **:P<0.01 vs. control vehículo; ***:P<0.001 vs. control vehículo.

Fig. 7. Muestra la expresión de LPL (A), ACC α (B), FAS (C), SCD-1 (D) y SREBP-1c (E) y actividad CPT-1 (F) en WAT de ratas control y ayuno después de la administración crónica de RSTN (6 días) *: P<0.05 vs. control vehículo; **:P<0.01 vs. control vehículo; ***:P<0.001 vs. control vehículo; #: P<0.05 ayuno vehículo vs. Fast RSTN; ##: P<0.01 ayuno vehículo vs. Ayuno RSTN.

Ejemplos

Animales

- 5 Para la realización de estos experimentos se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (300-350 g). Las ratas fueron estabuladas en cajas en una habitación con temperatura controlada y con ciclos de luz de 12 h/12 h oscuridad (la luz se enciende desde las 8:00 a las 20:00). Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Ley Internacional de Experimentación Animal.

10 *Implantación de cánula intracerebroventricular*

- La cánula intracerebroventricular (ICV) crónica fue implantada tras anestesiarse a los animales con una mezcla de ketamina y xilazina como previamente se ha descrito. La correcta localización de la cánula en el ventrículo lateral fue confirmada mediante la tinción con azul de metileno. Los animales fueron dispuestos en jaulas individuales, donde permanecieron una semana antes del experimento para permitir que se recuperen totalmente. Durante los 5 días de recuperación postoperatorios, las ratas fueron manipuladas regularmente bajo condiciones sin stress.

20 *Tratamiento agudo de RSTN*

- Un grupo de ratas fueron alimentadas *ad libitum* (control) y otro grupo fue privado de comida durante 12 horas (ayuno nocturno). Las ratas recibían después una única inyección de RSTN (Phoenix Peptides; 10 µg/rata disueltos en 5 µl de salino) o vehículo. Los animales fueron sacrificados 1.5 horas después de la administración. Durante el tratamiento, ambos grupos, control y con ayuno previo (ayuno) recibieron comida *ad libitum*. Los tratamientos se iniciaron a las 8:00 y fueron llevados a cabo en la fase de luz.

Tratamiento crónico de RSTN

- 30 La disposición de la cánula en el cerebro se llevó a cabo siguiendo unas coordenadas que nos permiten acceder al ventrículo lateral como se describe anteriormente. Un catéter fue conectado desde la cánula dispuesta en el cerebro hasta la minibomba osmótica de flujo controlado (modelo 2001D o 20 2ML2, Alza Corp., Palo Alto, CA). La bomba osmótica se dispone subcutánea en la zona dorsal mediante una incisión en la piel, que se cierra posteriormente mediante sutura. Para colaborar en su recuperación se les aplica calor. Las ratas recibían posteriormente vehículo o RSTN (10 µg/día) durante 6 días. A día 4, un grupo de ratas se mantenía en condiciones de comida *ad libitum* (control), y el otro grupo era privado de comida las últimas 48 h del tratamiento de RSTN.

40 *RT-PCR a tiempo real*

- Los niveles de mRNA de ACCα, FAS, LPL, SCD-1 y SREBP-1c en el hígado y en WAT epididimal, fueron estudiados mediante PCR a tiempo real (TaqMan®; Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) usando cebadores y sondas (datos Tabla Suplementaria 1) como se habían descrito previamente. Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo unos parámetros cíclicos: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 sec, 60°C durante 1 min. Para el análisis de datos hipotalámicos, el valor de los genes de interés fue estandarizado con el valor de 18S para el grupo de muestras y era expresado en comparación con el valor medio del grupo control. Se usaron 6-8 ratas/grupo.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 341 204 B2

TABLA SUPLEMENTARIA 1

Cebadores y sondas para RT-PCR en tiempo real (TaqMan®)

mRNA	No. acceso GenBank	(secuencias 5'-3')
ACCA	NM_022193	SEQ N° 1 (Cebador Directo ACCA)
		SEQ N° 2 (Cebador Reverso ACCA)
		SEQ N° 3 (Sonda ACCA)
FAS	NM_017332	SEQ N° 4 (Cebador Directo FAS)
		SEQ N° 5 (Cebador Reverso FAS)
		SEQ N° 6 (Sonda FAS)
LPL	NM_012598	SEQ N° 7 (Cebador Directo LPL)
		SEQ N° 8 (Cebador Reverso LPL)
		SEQ N° 9 (Sonda LPL)
SCD-1	NM_139192	SEQ N° 10 (Cebador Directo SCD-1)
		SEQ N° 11 (Cebador Reverso SCD-1)
		SEQ N° 12 (Sonda SCD-1)
SREBP-1c	XM_213329	SEQ N° 13 (Cebador Directo SREBP-1c)
		SEQ N° 14 (Cebador Reverso SREBP-1c)
		SEQ N° 15 (Sonda SREBP-1c)
TNF α	NM_012675	SEQ N° 23 (Cebador Directo TNF α)
		SEQ N° 24 (Cebador Reverso TNF α)
		SEQ N° 25 (Sonda TNF α)
IL-6	NM_012589	SEQ N° 26 (Cebador Directo IL-6)
		SEQ N° 27 (Cebador Reverso IL-6)
		SEQ N° 28 (Sonda IL-6)

Hibridación in situ

Secciones coronales del cerebro (16 μ m) fueron incubadas con oligos antisentido contra AgRP, CART, FAS, NPY, MCH, OX y POMC (Tabla Suplementaria 2) y una ribosonda complementaria de SOCS-3. Las hibridaciones *in situ* fueron realizadas como se indica en publicaciones previas. Para el análisis *in situ*, usamos entre 8 y 10 animales por grupo experimental; y unas 16-20 secciones de cada animal (4-5 portas, con 4 secciones por porta). La media de esos 16-20 valores fue usada como el valor densitométrico de cada animal.

TABLA SUPLEMENTARIA 2

Oligonucleotidos antisentido para hibridación in situ

mRNA	No. Acceso GenBank	Secuencia
AgRP	AF206017	SEQ N° 16
CART	M29712	SEQ N° 17
FAS	NM_017332	SEQ N° 18
MCH	M29712	SEQ N° 19
NPY	M20373	SEQ N° 20
OX	AF041241	SEQ N° 21
POMC	AF510391	SEQ N° 22

Western blotting

La electroforesis de la proteína hipotalámica total se realiza en geles de SDS-PAGE, se transfiere sobre membranas de PVDF e incubados con los anticuerpos indicados: ACC, pACC-Ser79, AMPK α 1 and AMPK α 2 (Upstate; Lake Place, NY, USA); FAS (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), pAMPK-Thr172 (Cell Signaling; Danvers, MA, USA); β -Actin (Abcam; Cambridge, UK). Para la detección de la proteína usamos anticuerpo secundario unido a HRP y quimioluminiscencia (Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK). Usamos 8-12 ratas/grupo.

Actividad de FAS

Determinación de la actividad de FAS fue realizada como se ha descrito previamente. Resumiendo, a 250 μ g de proteína se añade 200 μ M NADPH/Acetyl-CoA e incubado durante 10 minutos a 37°C. Para iniciar la reacción se añaden 600 μ M de malonil-CoA. La absorbancia fue medida a 340 nm. Se usaron 8-10 ratas/grupo.

Actividad CPT1

La actividad de CPT1 fue medida en el sobrenadante, usando el protocolo descrito por Bieber *et al.* and Zammit and Newsholm. La mezcla de reacción estaba compuesta de 60 mM de Tris HCl a pH 8.0, 1.5 mM de EDTA con 0.05% TritonX-100 y 0.25 mM 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), y 1.67 mM de carnitina. Un total de 100 μ l de sobrenadante y el sustrato 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) y carnitina fueron añadidos justo antes de medir la actividad enzimática. La reacción se inició al añadir 0.025 mM de palmitoyl-CoA. El aumento de absorbancia a 412 nm fue seguido durante 5 min. Se usaron 8-10 ratas/group.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media±SEM. La significación estadística fue determinada mediante ANOVA y test *post-hoc* Bonferroni. $P < 0.05$ fue considerado significativo.

Administración aguda de RSTN a nivel central reduce la ingesta e induce expresión de SOCS-3 en el hipotálamo mediobasal

Administración central (ICV) de RSTN a ambos grupos de ratas, control y ayuno (Fig. 1A). Como ha sido publicado que la RSTN induce la expresión de SOCS-3 en tejidos periféricos, evaluamos si esto sucede también en el hipotálamo. Nuestros datos mostraron que la RSTN aumenta de modo significativo la expresión de SOCS-3 en el hipotálamo mediobasal, especialmente en los núcleos dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) y arcuato (ARC) de ambos grupos de ratas, control y ayunados (Fig. 1B). Todos estos datos sugieren que el efecto anoréctico de la RSTN puede estar mediado por acciones específicas sobre estos núcleos.

La RSTN previene el efecto inducidos por el ayuno sobre la expresión de AgRP, NPY and CART

La administración aguda de RSTN a nivel central no tiene ningún efecto notable sobre la expresión de neuropéptidos en el ARC en el estado control. Sin embargo, cuando se administra en ratas sometidas a ayuno, la RSTN inhibe el esperado incremento en la expresión de AgRP y NPY, y el predecible descenso en la expresión de CART (Fig. 2A, 2B y 2C). Curiosamente, la administración de RSTN no tiene ningún efecto sobre la expresión de mRNA de POMC, que se coexpresa con CART en el ARC (Fig. 2D).

De forma similar, la administración de RSTN no mostraba ningún efecto sobre los niveles de expresión de MCH y OX en el LHA (Fig. 3). Sobre todo estos datos sugieren que la acción anoréctica de la RSTN sobre la realimentación puede que esté mediado por la regulación de las neuronas que expresan AgRP/NPY y CART.

La RSTN regula el metabolismo hipotalámico de ácidos grasos

La administración aguda de RSTN a nivel central estimuló la fosforilación de AMPK, y ACC en ratas control pero no en las ayuno, que mostraba el incremento esperado en la fosforilación de ambas enzimas (Fig. 4A y 4B). Estos resultados indican que la lipogénesis *de novo* podrían estar disminuidos en el hipotálamo de ratas tratadas con RSTN. En concordancia con estos datos, nuestros análisis *in situ* mostraron que la administración de RSTN inducía un descenso de los niveles de mRNA de FAS en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VHM) (Fig. 4C y 4D).

La administración crónica de RSTN a nivel central reduce el peso corporal y la ingesta

Dado el profundo efecto anoréctico de la RSTN a corto plazo, quisimos evaluar si la administración constante de RSTN, usando bombas osmóticas, tenía algún efecto sobre el peso corporal. Nuestros datos mostraron que la RSTN inducía un descenso significativo en el peso corporal (Fig. 5A) y en la ingesta de ratas control (Fig. 5C). Por otro lado, las ratas ayuno tratadas con RSTN, no mostraban ese descenso ni en el peso corporal ni en la ingesta, cuando las comparábamos con ratas ayuno tratadas con vehículo (Fig. 5B).

La administración crónica de RSTN a nivel central induce síntesis de ácidos grasos en el hígado de ratas control

El tratamiento con RSTN inducía un marcado incremento en los niveles de expresión de LPL, ACC α , FAS y SCD-1 en el hígado de ratas control (Fig. 6A-6D), indicando una activación de la entrada de triglicéridos desde el plasma y síntesis de ácidos grasos en este órgano. Estos cambios en enzimas lipogénicos están asociados a un marcado incremento en la expresión de SREBP-1c (Fig. 6E), un factor de transcripción que regula su expresión. Por otro lado en tratamiento con RSTN no inducía ningún cambio en el incremento hepático de LPL inducido por ayuno (Fig. 6A) y un descenso en el contenido hepático de mRNA de ACC α , FAS, SCD-1 y SREBP-1c (Fig. 6B-6E). La actividad CPT1 era inhibida en el hígado de las ratas tratadas con RSTN (Fig. 6F), lo que indica una tasa reducida de beta-oxidación; este efecto está probablemente relacionado con el incremento, inducida por RSTN, en la expresión de ACC α y la consecuente elevación en los niveles de malonil-CoA.

La administración crónica de RSTN a nivel central induce síntesis de ácidos grasos en WAT de ratas ayuno

Al contrario que en el hígado el tratamiento con RSTN inducía un marcado incremento en los niveles de expresión de LPL, ACC α , FAS, SCD-1 y SREBP-1c en WAT de ratas ayuno (pero no control) (Fig. 7A-7E), indicando una activación del consumo de triglicéridos y síntesis de ácidos grasos en este órgano bajo estas condiciones. Como sucedía en el hígado, la actividad de CPT1 estaba inhibida en WAT de ratas tratadas con RSTN (Fig. 7F).

REIVINDICACIONES

1. Uso de RSTN para la elaboración de una composición farmacéutica para la modulación del metabolismo de ácidos grasos en un mamífero, por su capacidad de reducir el peso corporal.

2. Uso de RSTN según la reivindicación 1, donde el mamífero se ve afectado por una enfermedad que se agrava por el aumento de peso corporal y la composición farmacéutica se utiliza para controlar o reducir el peso corporal.

3. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, para controlar o reducir el peso corporal.

4. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el tratamiento de la obesidad.

5. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el tratamiento de la obesidad mórbida.

6. Composición farmacéutica que comprende RSTN para su uso en el control o reducción de peso corporal.

7. Composición farmacéutica según reivindicación anterior, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 en una forma adaptada a la administración oral.

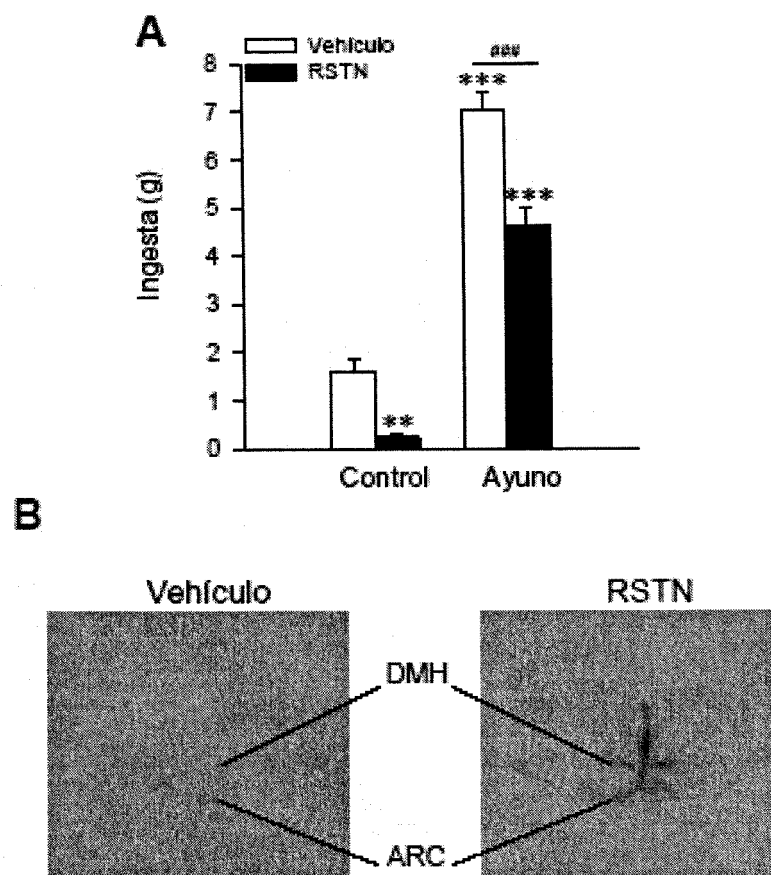


FIG.1

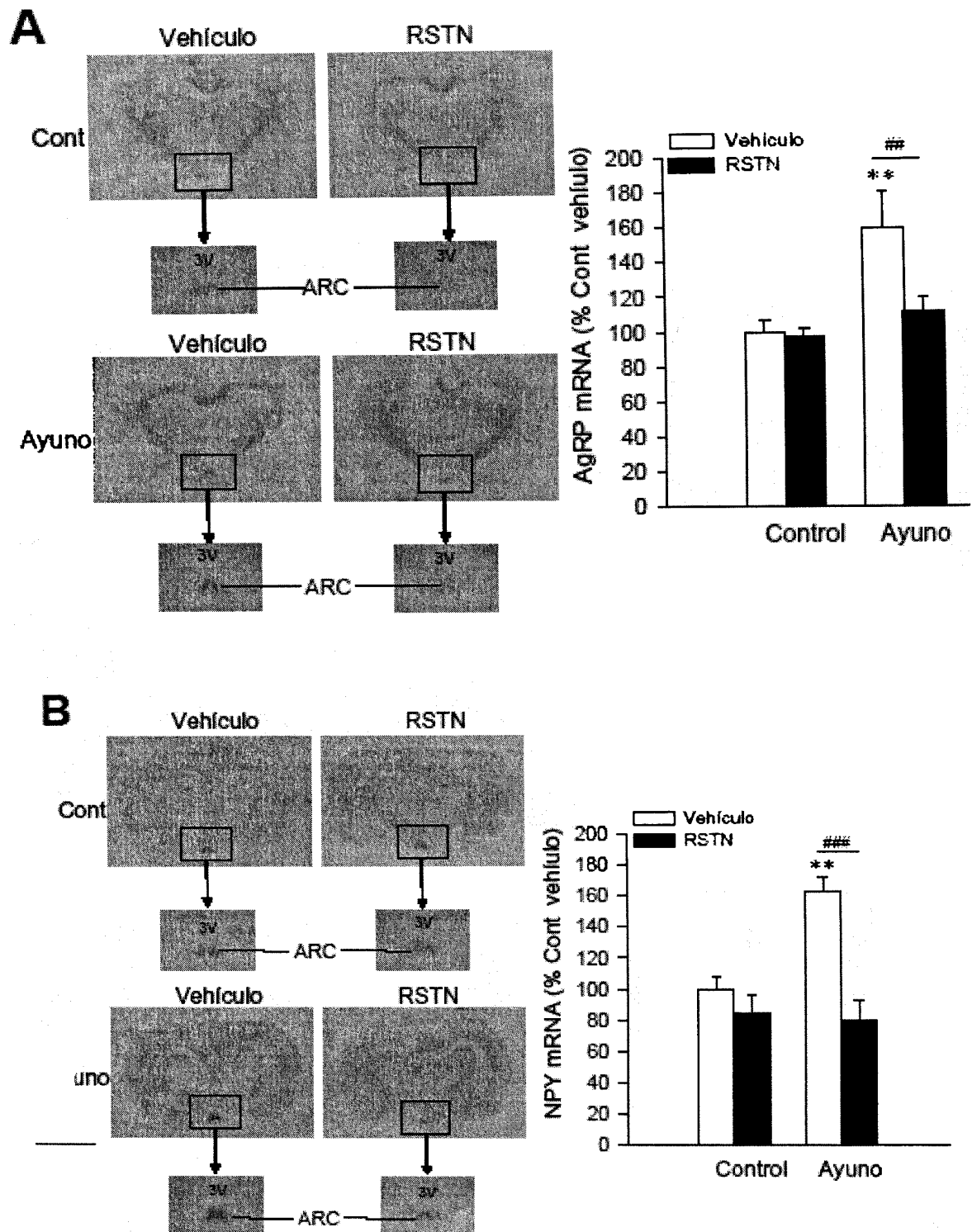


FIG. 2 (A, B)

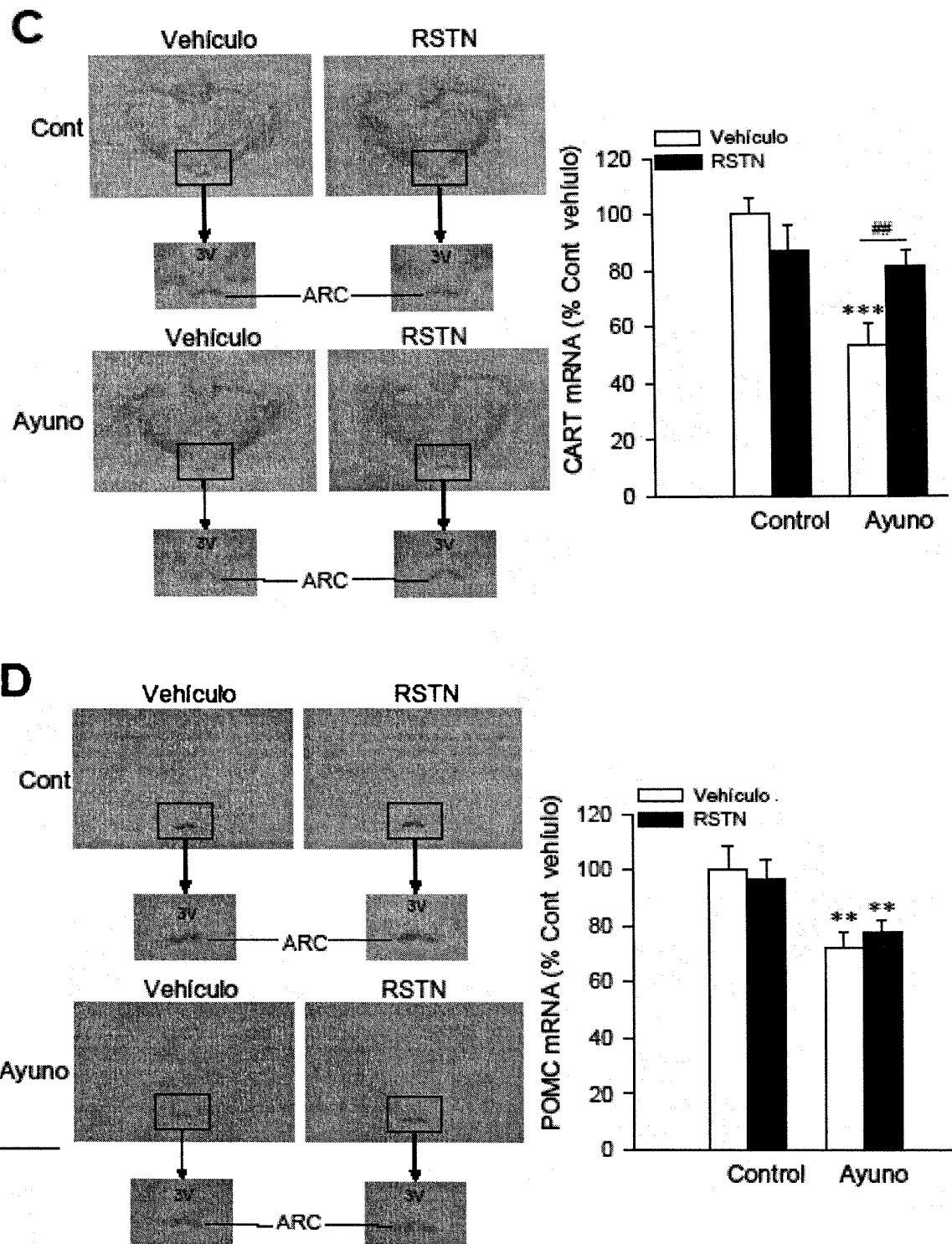


FIG. 2 (C, D)

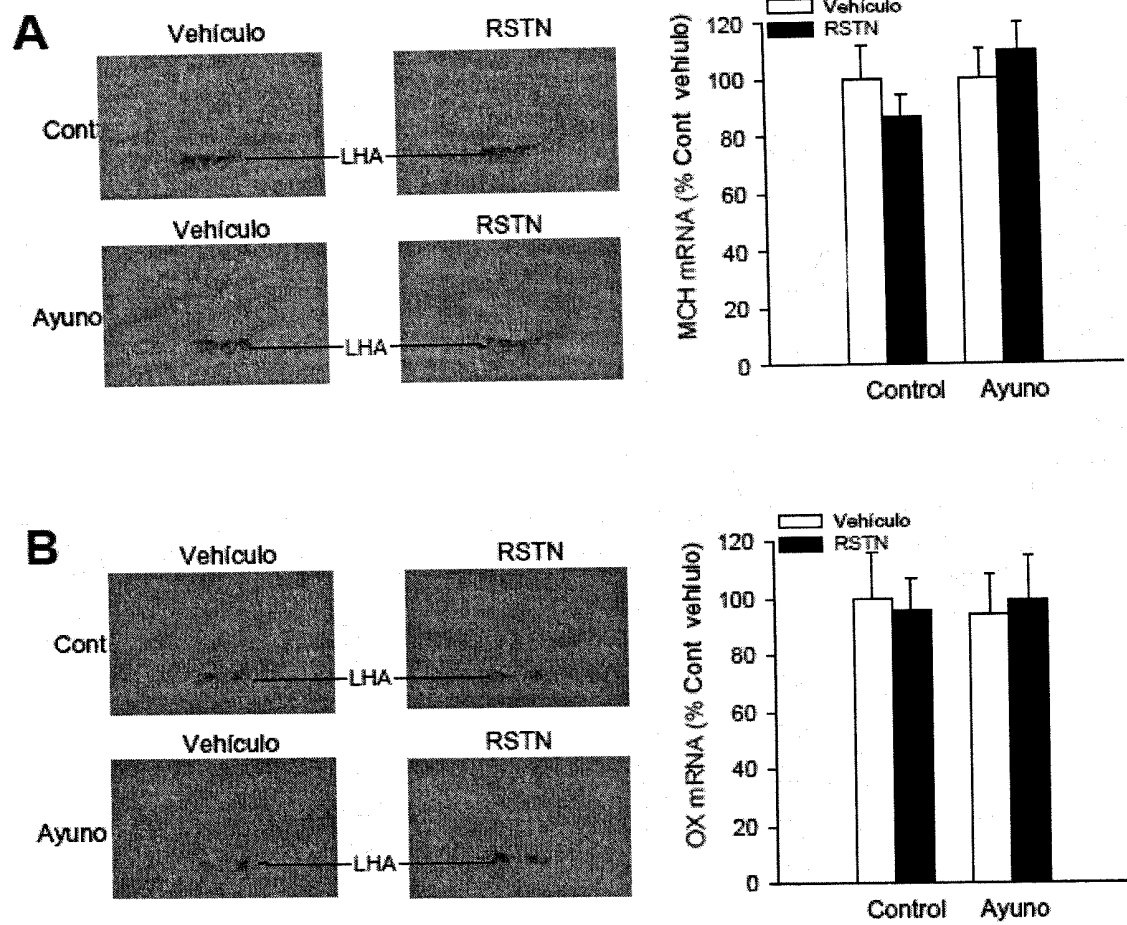


FIG. 3

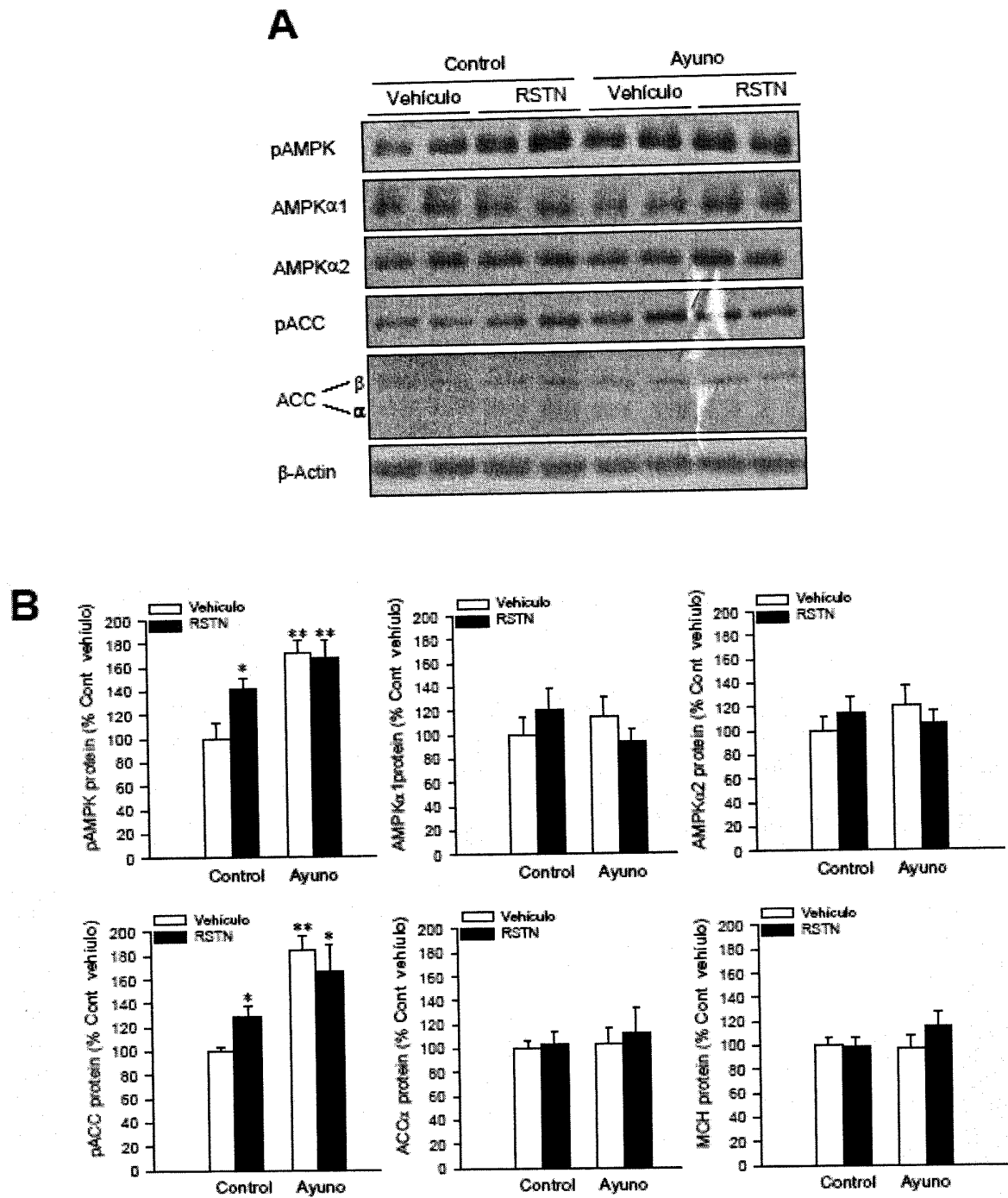


FIG. 4 (A, B)

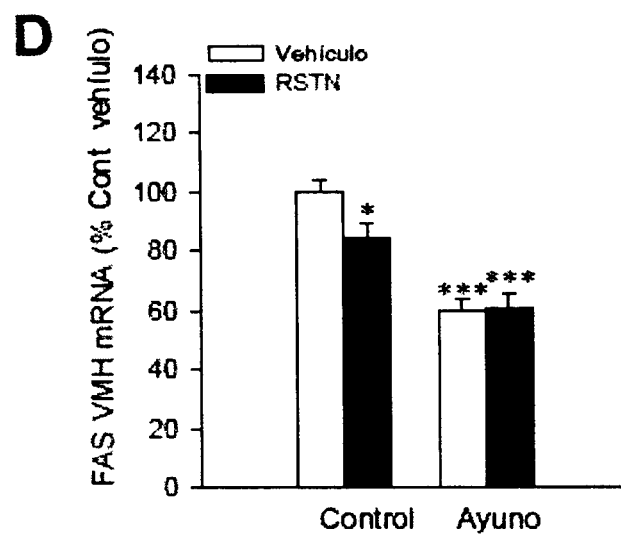
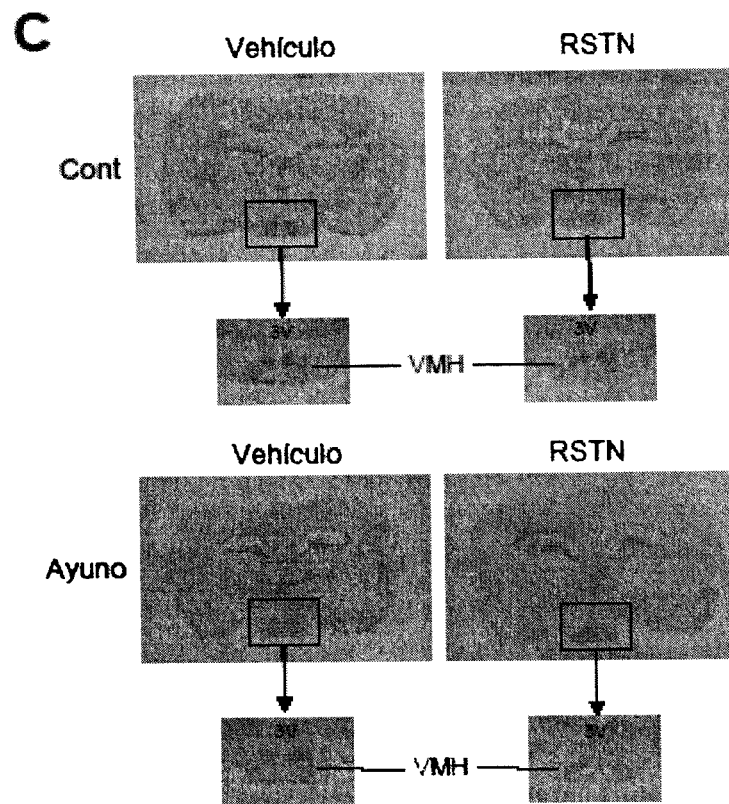


FIG. 4 (C, D)

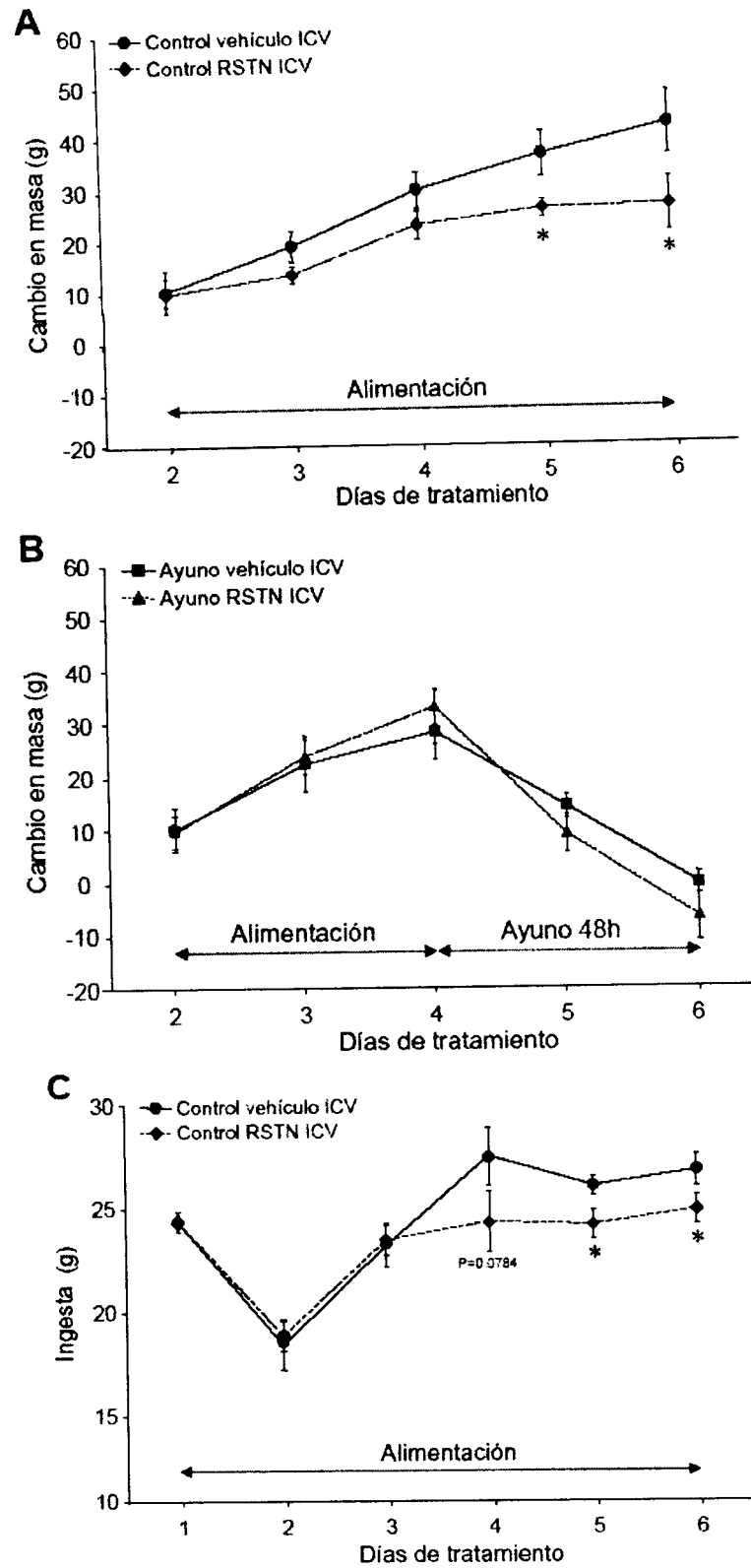


FIG. 5

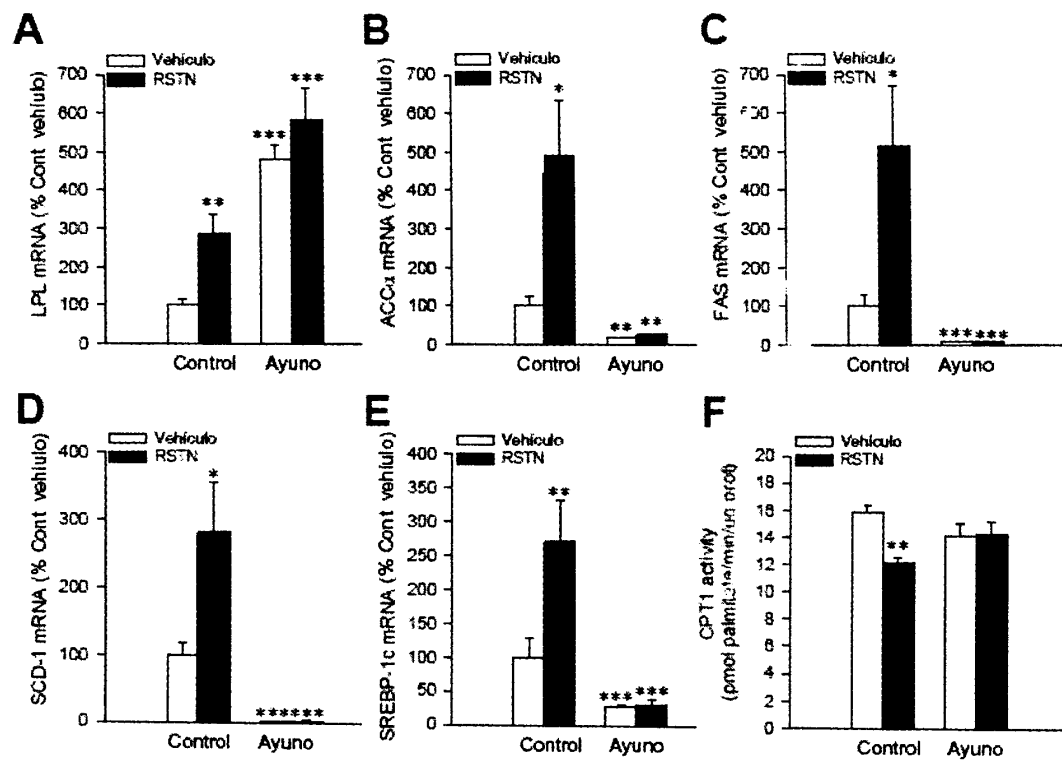


FIG. 6

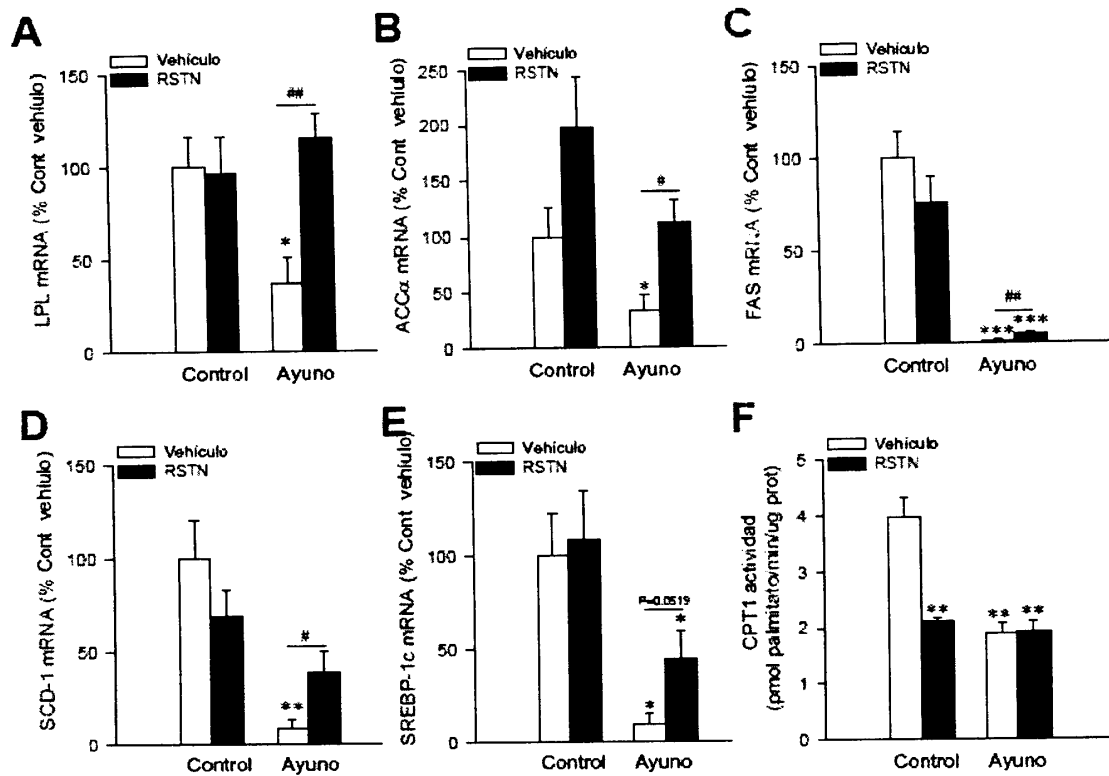


FIG. 7

ES 2 341 204 B2

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Universidad de Santiago de Compostela Universidade de Santiago de compostela	
	<120> uso de RSTN para la reducción de peso corporal	
10	<130> ES1596.9	
	<160> 28	
15	<170> PatentIn versión 3.4	
	<210> 1	
	<211> 19	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 1	
30	tgggcgggat ggtctcttt	19
	<210> 2	
	<211> 20	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador	
	<400> 2	
45	agtcgcagaa gcagccatt	20
	<210> 3	
	<211> 32	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> sonda	
	<400> 3	
60	accttgaag atttcgtcag gatctttgat ga	32
	<210> 4	
	<211> 19	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 341 204 B2

	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 4	
	gacatttcac cagggccacc	19
10	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 5	
	cctctagcag ccgcacctc	19
25	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> sonda	
35	<400> 6	
	ctgcccagga caggaaccg	19
40	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 7	
	ctgaaagtga gaacattccc ttca	24
55	<210> 8	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
65		

ES 2 341 204 B2

	<400> 8	
	ccgtgtaaat caagaaggag taggtt	26
5	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
15	<400> 9	
	cctgccggag gtcgccacaa ata	23
20	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 10	
	tgccagaggg aatagggaaa	20
35	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 11	
	ctctcccatc ctacttaca aacca	25
50	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
60	<400> 12	
	tcaccttgag agaagaatta gcacgcacgg	30
65	<210> 13	
	<211> 20	

ES 2 341 204 B2

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 13	
10	ctcatcaaca accaagacag	20
	<210> 14	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 14	
25	cctgtctcac ccccagcat	19
	<210> 15	
30	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> SEQ ID NO: 15	
	<400> 15	
40	ccctggccta ttgatgcc	19
	<210> 16	
45	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
	<400> 16	
55	cgacgcggag aacgagactc gcggttctgt ggatctagca cctctgcc	48
	<210> 17	
60	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	

ES 2 341 204 B2

	<400> 17	
	ccgaaggagg ctgtcacccc ttaca	26
5	<210> 18	
	<211> 29	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
15	<400> 18	
	gggtccattg tgtgtgcctg cttgggggtg	29
20	<210> 19	
	<211> 30	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
30	<400> 19	
	ccaacagggt cggtagactc gtcccagcat	30
35	<210> 20	
	<211> 50	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
45	<400> 20	
	agatgagatg tggggggaaa ctaggaaaag tcaggagagc aagtttcatt	50
50	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
60	<400> 21	
	ttcgtagaga cggcaggaac acgtcttctg gcgaca	36
65	<210> 22	
	<211> 48	

ES 2 341 204 B2

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido para el análisis de hibridación <i>in situ</i> .	
	<400> 22	
10	cttgatgatg gcgttcttga agagcgtcac caggggcgtc tggctctt	48
	<210> 23	
15	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 23	
25	ctaactccca gaaaagcaag caa	23
	<210> 24	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 24	
40	cctcgggccca gtgtatgaga	20
	<210> 25	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> sonda	
	<400> 25	
55	cagccaggca ggttcggtcc	20
	<210> 26	
60	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador	

ES 2 341 204 B2

<400> 26

tgcccttcag gaacagctat g

21

5

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 27

tgtaacaac atcagtccca agaa

24

20

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>

<223> sonda

30

<400> 28

ctccgcaaga gacttcacg cagttg

26

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 341 204

⑫ Nº de solicitud: 200801306

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: A61K 38/17 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2005/0233954 A1 (JASKUNAS ET AL) 20.10.2005, párrafos 114-129.	6-8
A	US 2003/0032099 A1 (HUDSON ET AL) 13.02.2003, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.06.2010

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-5	SÍ
	Reivindicaciones	4-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-5	SÍ
	Reivindicaciones	4-6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2005/0233954 A1	20-10-2005
D02	US 2003/0032099 A1	13-02-2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de resistina (RSTN) para la elaboración de una composición farmacéutica para la modulación del metabolismo de ácidos grasos en un mamífero, por su capacidad para reducir el peso corporal y a la composición farmacéutica que comprende la comprende.

El documento D1 se refiere al uso de la resistina para tratar los desordenes hematopoyéticos. En los párrafos 114-129 se describen las composiciones farmacéuticas que contienen la resistina, formas de administración y dosis.

Por lo tanto, a la vista del documento D1 las reivindicaciones 6-8 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la LP.

En el documento D2 se hace mención a la implicación de la hormona resistina (también llamada FFIZZ3/ADSF) en los problemas de tolerancia a la glucosa y en la obesidad.

Ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de ellos hace mención al uso de la resistina en la preparación de una composición farmacéutica para su utilización en la reducción del peso corporal.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-5 de presente solicitud, tienen novedad, actividad inventiva y aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 de la LP.