

METODOS Y FORMULACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE OBESIDAD Y
ENFERMEDADES METABOLICAS RELACIONADAS CON LA OBESIDAD

La presente invención se relaciona con métodos y formulaciones de
tratamiento de enfermedades metabólicas. La invención tiene utilidad particular en
conexión con el tratamiento de obesidad y en general, también se pueden tratar
ventajosamente otras enfermedades y condiciones metabólicas relacionadas con
obesidad incluyendo, pero no limitado a diabetes, pérdida de músculo debido a
desacondicionamiento, distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedad
hepática grasa no alcohólica o esteatohepatitis no alcohólica (NASH), recuperación
de cáncer, hipertensión y/o dislipidemia.

Más de 1.9 billones de personas a nivel mundial tienen sobrepeso y de esas
personas, más de 650 millones son obesas. La obesidad es la segunda causa
principal de muerte prevenible en los Estados Unidos y es una epidemia en
crecimiento. Ser obeso aumenta significativamente el riesgo de otras
enfermedades, tales como enfermedad cardiovascular, diabetes tipo II, cáncer
endometrial, cáncer de hígado, cáncer de riñón, y cáncer pancreático. Actualmente,
aproximadamente 5% de todas las muertes en los Estados Unidos están
relacionadas con la obesidad.

Los tratamientos actuales para la obesidad tienen resultados limitados y
efectos secundarios serios. Por ejemplo, los medicamentos de prescripción que se
enfocan en el sistema nervioso central, trayectorias hormonales, y/o el tracto
gastrointestinal exhiben mejoría física mínima e implican efectos secundarios
significativos. La cirugía bariátrica, incluyendo procedimientos de bypass gástrico,
banda LAP, y manga gástrica son altamente invasivos y costosos. Cambios en el
estilo de vida, tal como dieta y ejercicio, no son aplicables para casos serios de
obesidad y presentan resultados mezclados.

Los factores de riesgo que contribuyen a la obesidad son complejos y diversos. En particular, factores genéticos, condiciones médicas, ingesta de energía, gasto de energía, factores socioeconómicos, y/o factores fisiológicos pueden todos contribuir a un riesgo individual para obesidad. Los tratamientos
5 previamente conocidos para obesidad y condiciones relacionadas con inadecuados y típicamente abordan únicamente uno o dos de estos factores de riesgo.

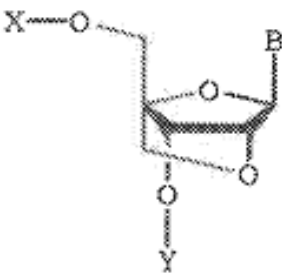
Acá se describen compuestos y formulaciones terapéuticas para el tratamiento de obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas con obesidad, junto con métodos de producción y uso. Los agentes terapéuticos divulgados
10 pueden mejorar significativamente los resultados de obesidad a largo plazo en comparación con otras opciones de tratamiento actualmente disponibles. A la fecha, las terapias divulgadas han demostrado alterar las características biológicas de ratones, células musculares humanas, y adipocitos. Estos efectos han estado bien documentados en modelos murinos, lo cual lleva a pérdida de peso significativa y
15 ganancia muscular en ratones obesos. Como se divulga en detalle más adelante, los terapéuticos y los métodos de tratamiento divulgados están diseñados para promover el crecimiento muscular y también disminuyen los adipocitos en pacientes (por ejemplo, humanos y otros animales).

Las formulaciones terapéuticas divulgadas son reguladores novedosos de
20 trayectoria de gen y trabajan para suministrar el tratamiento inicial, promover el crecimiento y el cambio metabólico, y suministrar efectos duraderos. Específicamente, al comienzo del tratamiento, una formulación de coctel regula la expresión de varios genes para aumentar el crecimiento de músculo esquelético y disminuyen la acumulación de grasa en adipocitos. Durante el tratamiento, se
25 presenta el crecimiento y el cambio metabólico a medida que la masa muscular esquelética comienza a aumentar al quemar masa de adipocito y el almacenamiento de grasa. A medida que el tratamiento continúa, se experimentan efectos duraderos

(tal como acumulación disminuida persistente de grasa), incluso después que las formulaciones terapéuticas no sean más suministradas a un paciente.

En un aspecto de la invención, se suministra un método para el tratamiento de obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad en animales incluyendo humanos, dicho método comprende aumentar la función metabólica del animal al administrar al animal una cantidad terapéuticamente efectiva de un oligonucleótido antisentido.

En una modalidad, el oligonucleótido antisentido tiene una estructura definida por la siguiente fórmula:



en donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, un análogo de ésta, X y Y son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo alarquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, o un grupo sililo, o un derivado de amidita de éstos. En dicha modalidad, B preferiblemente incluye la siguiente secuencia:

Secuencia (5'-3'): +G*+T*+T*G*A*G*A*T*A*G*C*A*+T*C*+A*G.

En otra modalidad, el agente terapéutico puede ser administrado oralmente, parenteralmente, tópicamente, directamente a los pulmones, rectalmente o vaginalmente.

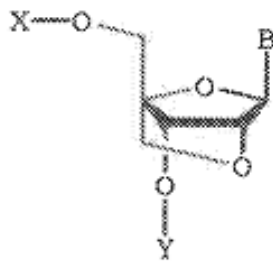
En una modalidad, el oligonucleótido antisentido es administrado en una dosis de entre 1 mg/kg y 20 mg/kg con base en el peso en kg del paciente. En dicha modalidad, la dosis es preferiblemente administrada una vez, dos veces o, tres veces o más por día.

En otra modalidad, el tratamiento se continúa diariamente por 30, 45, 60 o 90 días.

En otra modalidad, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedad hepática grasa no alcohólica, síndrome metabólico, distrofia muscular de Duchenne (DMD), diabetes, recuperación de cáncer, pérdida muscular debido a desacondicionamiento, hipertensión, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), dislipidemia y obesidad.

La presente invención también suministra una formulación terapéutica para el tratamiento de obesidad, y enfermedades metabólicas relacionadas con obesidad que comprende un oligonucleótido antisentido en un portador farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el oligonucleótido antisentido tiene una estructura definida por la siguiente fórmula:



en donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, un análogo de ésta, X y Y son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo alarquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, o un grupo sililo, o un derivado de amidita de éstos. En dicha modalidad, B preferiblemente incluye la siguiente secuencia:

Secuencia (5'-3'): +G*+T*+T*G*A*G*A*T*A*G*C*A*+T*C*+A*G.

En los ejemplos de trabajo más adelante, este compuesto es designado como “M4”.

En otra modalidad, el agente terapéutico está en un portador farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de una tableta,

cápsula, líquido, solución, suspensión, jarabe, elixir, crema, ungüento, loción, gel, parche, polvo seco y supositorio.

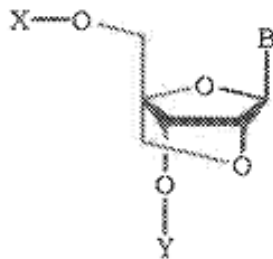
En otra modalidad, el oligonucleótido antisentido está en una forma de dosificación unitaria.

5 En otra modalidad, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedad hepática grasa no alcohólica, síndrome metabólico, distrofia muscular de Duchenne (DMD), diabetes, recuperación de cáncer, pérdida muscular debido a desacondicionamiento, hipertensión, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), dislipidemia y obesidad.

10 La obesidad tiene un número de trayectorias etiológicas. Una de dichas trayectorias de interés está limitada a masa muscular. Dieta, inactividad, y/o predisposición genética puede llevar a masa muscular reducida, aumentando la incapacidad de quemar el exceso de calorías y llevando a adipocitos que almacenan el exceso de calorías como grasa. La presente divulgación suministra agentes
15 terapéuticos que pueden regular efectivamente el crecimiento muscular de pacientes obesos, a través de terapia de eliminación de genes, y mejora su función metabólica general. Específicamente, los compuestos y formulaciones divulgadas han mostrado regular la expresión de varios genes para aumentar el crecimiento de músculo esquelético y disminuir la acumulación de grasa en adipocitos.
20 Adicionalmente, la masa muscular esquelética comienza a aumentar durante los tratamientos a medida que la masa de adipocitos se reduce. Las terapias divulgadas acá también han demostrado suministrar resultados duraderos, incluso meses después que el tratamiento ha concluido, con acumulación disminuida de grasa reportada después del tratamiento.

25 Como se describe más adelante en detalle, los agentes terapéuticos divulgados (por ejemplo, compuestos, mezclas, formulaciones, y/o cocteles) incluyen uno o más oligonucleótidos antisentido con un núcleo bloqueado. Por ejemplo, en algunas modalidades, los oligonucleótidos antisentido usados en las

terapias divulgadas pueden ser preparados de acuerdo con los métodos descritos en las Patentes No. US 6,268,490, US 6,770,748 y US RE44,779, las cuales se incorporan acá por referencia. En algunas modalidades particulares, el oligonucleótido antisentido tiene una estructura definida por la siguiente fórmula:



5

en donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, un análogo de ésta, X y Y son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo alarquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, o un grupo sililo, o un derivado de amidita de éstos.

10

El grupo alquilo representa un grupo alquilo de cadena recta o cadena ramificada con 1 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo.

El grupo alquenilo representa un grupo alquenilo de cadena recta o cadena ramificada con 2 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, geranilo, y farnesilo.

15

El grupo alquinilo representa un grupo alquinilo de cadena recta o cadena ramificada con 2 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen etinilo, propinilo, y butinilo.

El grupo cicloalquilo representa un grupo cicloalquilo con 3 a 8 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo. Otro ejemplo es un grupo heterocíclico en el cual uno o más grupos de metileno arbitrario en el anillo del grupo cicloalquilo han sido sustituidos por un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, o un átomo de nitrógeno sustituido con alquilo. Este es, por ejemplo, un grupo tetrahidropiranilo.

20

25

El grupo arilo se refiere a un sustituyente monovalente formado al remover un átomo de hidrógeno de un grupo heterocíclico aromático o un grupo hidrocarburo aromático. Preferiblemente, representa un sustituyente monovalente formado al remover un átomo de hidrógeno de un grupo hidrocarburo aromático, e incluye, por ejemplo, fenilo, toloilo, xililo, bifenilo, naftilo, antrilo, y fenantrilo. El átomo de carbono en el anillo del grupo arilo puede ser sustituido por uno o más de un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo nitro, y un grupo trifluorometilo. El sustituyente en este caso es, por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo alcoxi, o un grupo ariloxi.

El grupo aralquilo se refiere a un grupo alquilo unido a un grupo arilo, y puede ser sustituido. El grupo aralquilo que puede ser sustituido representa un grupo alquilo unido a un grupo arilo, con uno o más átomos de hidrógeno arbitrarios del grupo arilo y el grupo alquilo que es opcionalmente sustituido por los siguientes sustituyentes: Ejemplos de los sustituyentes son acilo, amino, arilo, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, hidroxilo, nitro, y halógeno.

El grupo amino no necesita ser sustituido, pero cuando el grupo amino es sustituido incluye, por ejemplo, alquilamino, arilamino, y acilamino. Ejemplos del grupo alcoxi son metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-propoxi, n-butoxi, 1-butoxi, s-butoxi, t-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, y fenoxi. Ejemplos del átomo de halógeno son flúor, cloro, bromo, y yodo.

Los ejemplos preferidos del grupo aralquilo son tritilo, benzilo, fenetilo, tritilmetilo, difenilmetilo, naftilmetilo, y 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr). Particularmente se prefiere un grupo DMTr.

Como el grupo acilo, se puede ejemplificar acetilo, formilo, propionilo, bezoilo, y benziloxicarbonilo. Un ejemplo del grupo sililo es un grupo trialquilsililo, preferiblemente trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo, t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo, y más preferiblemente trimetilsililo.

En modalidades seleccionadas, B incluye la siguiente secuencia:

Secuencia (5'-3'): +G*+T*+T*G*A*G*A*T*A*G*C*A*+T*C*+A*G el cual fue designado como "M4".

Los oligonucleótidos antisentido y otros compuestos terapéuticos (si están presentes) pueden ser administrados a un paciente en forma líquida o sólida. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos pueden ser administrados oralmente (por ejemplo, como una tableta, cápsula, líquido, solución, suspensión, jarabe, o elixir), parenteralmente (por ejemplo, a través de una aguja o catéter insertado intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intra arterial, intratecalmente, o intradérmicamente), tópicamente (por ejemplo, como una crema, ungüento, loción, gel o parche transdérmico), rectal o vaginalmente (por ejemplo, como un supositorio) o directamente a los pulmones (por ejemplo, usando un DPI, MDI o nebulizador).

Los compuestos terapéuticos pueden ser administrados a un paciente usando cualquier esquema de dosificación adecuado determinado por un profesional médico. En algunas modalidades de ejemplo, una dosis entre 1 mg/kg y 20 mg/kg puede ser administrada a un paciente (con base en el peso del paciente en kg). En otras modalidades, sin embargo, la dosificación puede ser 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o 18 mg/kg (con base en el peso del paciente en kg).

En algunas modalidades, un paciente puede ser tratado con una dosis adecuada de agente terapéutico una vez, dos veces, tres veces, o más durante un día. El tratamiento puede continuar por número seleccionado de días, tal como 30 días, 45 días, 60 días, 90 días, o más.

Después que el tratamiento ha concluido, el paciente puede presentar mejorías medibles en la salud física. Por ejemplo, en algunos casos, los pacientes pueden experimentar masa muscular aumentada, una reducción en células grasas, y/o otras mejoras durante o después del tratamiento. En algunas modalidades particulares, un paciente puede experimentar por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%,

25%, 30%, 35%, 40%, o más de pérdida de grasa (después, por ejemplo, de 30 días de tratamiento). En estas y otras modalidades, un paciente puede presentar una ganancia muscular de por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, o más (después, por ejemplo, de 30 días o semanas de tratamiento). También se pueden
5 experimentar numerosas mejoras de salud por un paciente durante y después del tratamiento.

En algunas modalidades, las mejoras en salud experimentadas durante el tratamiento pueden persistir después del tratamiento. Por ejemplo, en algunas modalidades, la ganancia muscular y/o pérdida de grasa experimentada durante el
10 tratamiento puede continuar o estabilizar después del tratamiento por un periodo de por lo menos tres meses, por lo menos seis meses, por lo menos nueve meses, o más.

Adicionar a tratar obesidad, las formulaciones divulgadas también pueden ser usadas para tratar, prevenir, y/o gestionar síntomas de otras enfermedades y
15 condiciones metabólicas relacionadas con la obesidad, tales como enfermedad hepática grasa no alcohólica, síndrome metabólico, distrofia muscular de Duchenne (DMD), diabetes, pérdida muscular debido a desacondicionamiento, recuperación de cáncer, hipertensión, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/o dislipidemia. Durante el tratamiento, las células musculares crecen a expensas del
20 almacenamiento de grasa del hígado, revirtiendo así la causa de hígado graso. Las mejoras metabólicas generadas por el tratamiento también pueden prevenir que el hígado acumule exceso de grasa después del tratamiento. El síndrome metabólico incluye varios síntomas comunes, incluyendo azúcar alto en la sangre (diabetes tipo II), alta presión sanguínea (hipertensión), conteo anormal de lípidos (dislipidemia),
25 y una variedad de otras condiciones. Aunque las medicinas actuales para síndrome metabólico se pueden enfocar únicamente en estas condiciones individualmente, los tratamientos divulgados son capaces de mejorar todo el sistema metabólico, tratando así las causas básicas de estas enfermedades. DMD es un tipo severo de

distrofia muscular, y una de las enfermedades Mendelianas recesivas enlazadas con X más comunes. Aproximadamente 1 en 5000 hombres nacen con DMD; resultando en pérdida muscular, aumento en contenido de grasa y pérdida de la capacidad de caminar. Actualmente, esteroides (con efectos laterales extensivos) son el único tratamiento disponible para DMD. En comparación a los esteroides, los tratamientos divulgados tienen mayor eficacia y efectos secundarios reducidos y así, tienen el potencial de mejorar significativamente las vidas de pacientes con DMD.

Los compuestos terapéuticos y métodos de tratamiento divulgados están diseñados para reducir (y en algunos casos eliminar) la obesidad en un paciente, así como enfermedades y condiciones relacionadas. Los compuestos y métodos divulgados pueden ser usados en cualquier paciente mamífero, incluyendo humanos, primates, perros, gatos, ratones, o cualquier otro mamífero. Antes de realizar pruebas clínicas en humanos, se realizaron experimentos en adipocitos y miocitos de ratones y humanos. Los datos clínicos de estas pruebas se describen a continuación.

Modelos Murinos

En un primer experimento clínico, el efecto de un compuesto terapéutico, como se describió anteriormente, a veces referido acá como "M4", fue evaluado en ratones obesos y no obesos contra un control.

El compuesto terapéutico "M4" administrados a los sujetos de prueba se preparó siguiendo las enseñanzas de US RE44,779.

Se incluyó un total de 42 sujetos de prueba en el estudio, con 21 sujetos de prueba obesos y 21 no obesos. Los sujetos de prueba fueron suministrados con tres dosis diferentes (5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg) del compuesto terapéutico por un periodo de cuatro semanas. Durante el curso del tratamiento, los sujetos obesos fueron alimentados con una dieta de 60% de grasa y los sujetos no obesos fueron

alimentados con una dieta de 10% de grasa. Se registró el peso de estos sujetos de prueba dos veces por semana.

Los sujetos de prueba (ratones) que participan en este estudio fueron negros 6 (B6-M) y B6 obesos inducidos por dieta (B6-DIO-M), provistos por Taconic Biosciences. Ambos modelos compartieron el mismo genotipo. Las diferentes fenotípicas en los sujetos de prueba se debió al porcentaje de grasa en la dieta (es decir, 10% en comparación de 60%).

La dieta para los sujetos de prueba fue una dieta de roedor con 10% de kcal% de grasa (#D12450J) y dieta de roedor con 60% de kcal% de grasa (#D12492i), provista por Research Diets, Inc.

Todos los sujetos de prueba se alojaron separadamente en un vivario filtrado absorbedor particular de alta energía de 0.22 micrómetros (HEPA). Hubo tres grupos de tratamiento en el estudio: un grupo de tratamiento de dosis baja (5 mg/kg), un grupo de tratamiento de dosis media (10 mg/kg), y un grupo de tratamiento de dosis alta (20 mg/kg). Se incluyeron tres ratones en cada grupo de tratamiento. Se administraron formulaciones de droga y formulaciones de control por medio de inyección en la vena de la cola dos veces por semana.

Se produjeron tres soluciones de serie de M4 y LNA revuelto para el estudio y se esterilizaron por filtración. Las soluciones de serie fueron producidas así: una solución de 2.5 mg/kg para el grupo de 5 mg/kg, una solución de 5 mg/kg para el grupo de 10 mg/kg, y una solución de 10 mg/kg para el grupo de 20 mg/kg. Para cada tratamiento, se administró una dosificación de 2 µl/g a los sujetos de prueba. La dosificación fue determinada por peso de modelo (en gramos).

Resultado de Estudio No Obeso de Dosis Baja

La Figura 1 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control no obeso de dosis baja (5 mg/kg) y el grupo de prueba durante los días 1-32 del estudio. Como se muestra en la Figura 1, el control no obeso exhibió una tendencia de aumento gradual a lo largo del periodo de prueba y el grupo tratado

con M4 mostró una tendencia similar, sin embargo, el cambio de peso disminuyó después del día 28 para el grupo M4. Sin desear atarse por la teoría, M4 parece presenta mayor ganancia de peso en comparación con el control. La ganancia de peso observada es ampliamente atribuida a ganancia muscular en los individuos que tienen poca grasa que perder. Al final del periodo de tiempo del tratamiento, los modelos no obesos que fueron inyectados con 5 mg/kg del control tuvieron 4.85% mayor cambio en peso en comparación con los tratados con M4.

La Figura 2 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control no obeso de dosis baja (5 mg/kg) y el grupo tratado con M4 durante los días 59-85 del estudio.

Como se muestra en la Figura 2, el grupo de control no obeso presentó una tendencia en aumento gradual a lo largo del periodo de prueba y el grupo M4 mostró un aumento ligero, pero presentó fluctuaciones en cambio de peso a lo largo de los días 59-85.

Las Figuras 3A y 3B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes de control y de prueba no obesos suministrados con el tratamiento de dosis baja (5 mg/kg) en el estudio.

Las Figuras 4A y 4B son fotografías del músculo (con grasa subcutánea removida) de participantes de control y prueba no obesos suministrados con el tratamiento de dosis baja (5 mg/kg) en el estudio.

Las Figuras 5A-5C son fotografías de los hígados de participantes no obesos de estudio de dosis baja. En particular, la Figura 5A muestra el hígado de un ratón ingenuo, la Figura 5B muestra el hígado de un ratón de control, y la Figura 5C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

La Figura 6 es un gráfico que ilustra el peso promedio de corazón para participantes no obesos del estudio que recibieron un tratamiento de dosis baja (5 mg/kg). Como se muestra en la Figura 6, en promedio, los ratones de control no obesos tuvieron los corazones más pesados mientras que los ingenuos tuvieron los

corazones más livianos. Sin embargo, los promedios entre los tres grupos están dentro del mismo rango.

Las Figuras 7A-7C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio de dosis baja. En particular, la Figura 7A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 7B muestra el corazón de un ratón de control, y la Figura 7C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

Las Figuras 8A-8C son fotografías que muestran grasa subcutánea de participantes de estudio no obesos de dosis baja (5 mg/kg). En particular, la Figura 8A muestra la grasa subcutánea de un espécimen ingenuo, la Figura 8B muestra la grasa subcutánea de un espécimen de control y la Figura 8C muestra la grasa subcutánea de un espécimen M4.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio para participantes de estudio no obesos de dosis baja (5 mg/kg).

Las Figuras 10A-10C son fotografías que muestran la grasa IP promedio de participantes de estudio no obesos de dosis baja (5 mg/kg). En particular, la Figura 10A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 10B muestra la grasa IP de un espécimen de control, y la Figura 10C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

Las Figuras 11A-11C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio no obesos de dosis baja (5 mg/kg). En particular, la Figura 11A muestra un riñón de un espécimen ingenuo, la Figura 11B muestra un riñón de un espécimen de control, y la Figura 11C muestra un riñón de un espécimen M4.

La Figura 12 es un gráfico de peso promedio de riñón en participantes de estudio no obesos de dosis baja (5 mg/kg).

Resultados de Estudio No Obeso de Dosis Media

La Figura 13 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control no obeso de dosis media (10 mg/kg) y el grupo de prueba durante los días 1-32 del estudio. Como se muestra en la Figura 13, tanto el grupo de control

como el grupo tratado con M4 exhibieron un cambio de peso positivo a partir del día 2-32. En general, M4 tiene el mayor patrón de cambio de peso y los especímenes inyectados con M4 exhibieron mayor ganancia de peso. Al final del periodo de tratamiento, los participantes no obesos inyectados con control tuvieron 7.73% menor cambio en peso en comparación con los inyectados con M4.

La Figura 14 ilustra el cambio de peso promedio de estos participantes de estudio durante los días 57-85 del estudio.

Las Figuras 15A y 15B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes no obesos de prueba y de control suministrados con tratamiento de dosis media (10 mg/kg) en el estudio.

Las Figuras 16A y 16B son fotografías del músculo (con grasa subcutánea removida) de participantes no obesos de prueba y control suministrados con el tratamiento de dosis media (10 mg/kg) en el estudio.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el peso de hígado promedio para participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 18A-18C son fotografías de los hígados de participantes de estudio no obesos de dosis media. En particular, la Figura 18A muestra el hígado de un ratón ingenuo, la Figura 18B muestra el hígado de un ratón de control, y la Figura 18C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

Las Figuras 19A-19C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio de dosis media. En particular, la Figura 19A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 19B muestra el corazón de un ratón de control, y la Figura 19C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

La Figura 20 es un gráfico que ilustra la grasa subcutánea promedio para participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 21A-21C son fotografías que muestran grasa subcutánea de participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 21A muestra la grasa subcutánea de un espécimen ingenuo, la Figura 21B

muestra la grasa subcutánea de un espécimen de control y la Figura 21C muestra la grasa subcutánea de un espécimen M4.

La Figura 22 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio para participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg).

5 Las Figuras 23A-23C son fotografías que muestran la grasa IP de participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 23A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 23B muestra la grasa IP de un espécimen de control, y la Figura 23C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

10 La Figura 24 es un gráfico de peso de riñón promedio en participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 25A-25C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio no obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 25A muestra un riñón de un espécimen ingenuo, la Figura 25B muestra un riñón de un espécimen de control, y la Figura 25C muestra un riñón de un espécimen M4.

Resultados de Estudio No Obeso de Dosis Alta

La Figura 26 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control no obeso de dosis alta (20 mg/kg) y grupo de prueba durante los días 1-33 del estudio. Como se muestra en la Figura 26, tanto el grupo de control como el grupo tratado con M4 exhibieron un cambio de peso positivo a partir del día 3-33. En general, M4 parece exhibir un patrón de cambio de peso promedio menor en comparación con el control. Al final del periodo de tratamiento, los participantes no obesos inyectados con control tuvieron 3.89% mayor cambio en peso en comparación con los inyectados con M4.

25 La Figura 27 ilustra el cambio de peso promedio de estos participantes de estudio durante los días 63-88 del estudio.

Las Figuras 28A y 28B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes no obesos de prueba y control suministrados con el tratamiento de

dosis alta (20 mg/kg) en el estudio. La Figura 28A muestra el participante de control y la Figura 28B muestra el participante M4.

La Figura 29 es un gráfico que muestra el peso de hígado promedio para participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg).

5 Las Figuras 30A-30C son fotografías de los hígados de participantes de estudio no obesos de dosis alta. En particular, la Figura 30A muestra el hígado de un ratón ingenuo, la Figura 30B muestra el hígado de un ratón de control y la Figura 30C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

La Figura 31 muestra un gráfico que ilustra el peso de corazón promedio para
10 participantes de estudio no obesos que recibieron un tratamiento de dosis alta (20 mg/kg).

Las Figuras 32A-32C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio de dosis alta. En particular, la Figura 32A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 32B muestra el corazón de un ratón de
15 control y la Figura 32C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

La Figura 33 es un gráfico que ilustra la grasa subcutánea promedio para participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg).

Las Figuras 34A-34C son fotografías que muestran la grasa subcutánea de participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg). En particular, la Figura
20 34A muestra la grasa subcutánea de un espécimen ingenuo, la Figura 34B muestra la grasa subcutánea de un espécimen de control, y la Figura 34C muestra la grasa subcutánea de un espécimen M4.

La Figura 35 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio para participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg).

25 Las Figuras 36A-36C son fotografías que muestran la grasa IP de participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg). En particular, la Figura 36A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 36B muestra la grasa

IP de un espécimen de control, y la Figura 36C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

La Figura 37 es un gráfico de peso de riñón promedio en participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg).

5 Las Figuras 38A-38C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio no obesos de dosis alta (20 mg/kg). En particular, la Figura 38A muestra un riñón de un espécimen ingenuo, la Figura 38B muestra un riñón de un espécimen de control, y la Figura 38C muestra un riñón de un espécimen M4.

Resultados de Estudio Obeso de Dosis Baja

10 La Figura 39 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis baja (5 mg/kg) y grupo de prueba durante los días 1-33 del estudio. Como se muestra en la Figura 39, el control obeso exhibió una tendencia de peso en aumento gradual por 31 días. M4 muestra la misma tendencia con un aumento porcentual alto en peso a partir de los días 14-24 y una disminución
15 alta en peso en el día 28. Al final del periodo de tiempo de tratamiento, los modelos obesos que fueron inyectados con 5 mg/kg del control tuvieron 2.02% de menor cambio en peso en comparación con los tratados con M4.

La Figura 40 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis baja (5 mg/kg) y el grupo tratado con M4 durante los días
20 59-74 del estudio.

Las Figuras 41A y 41B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes obesos de prueba y control suministrados con el tratamiento de dosis baja (5 mg/kg) en el estudio. La Figura 41A muestra el participante de control y la Figura 41B muestra el participante M4.

25 La Figura 42 es un gráfico que muestra el peso de hígado promedio para participantes de estudio obesos de dosis baja (5 mg/kg).

Las Figuras 43A-43C son fotografías de los hígados de participantes de estudio obesos de dosis baja. En particular, la Figura 43A muestra el hígado de un

ratón ingenuo, la Figura 43B muestra el hígado de un ratón de control, y la Figura 43C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

La Figura 44 es un gráfico que ilustra el peso de corazón promedio para participantes de estudio obesos que recibieron un tratamiento de dosis baja (5 mg/kg).

Las Figuras 45A-45C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio obesos de dosis baja. En particular, la Figura 45A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 45B muestra el corazón de un ratón de control, y la Figura 45C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

La Figura 46 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio de participantes de estudio obesos de dosis baja (5 mg/kg).

Las Figuras 47A-47C son fotografías que muestran la grasa IP de participantes de estudio obesos de dosis baja (5 mg/kg). En particular, la Figura 47A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 47B muestra la grasa IP de un espécimen de control, y la Figura 47C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

La Figura 48 es un gráfico del peso de riñón promedio en participantes de estudio obesos de dosis baja (5 mg/kg).

Las Figuras 49A-49C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio obesos de dosis baja (5 mg/kg). En particular, la Figura 49A muestra riñones de un espécimen ingenuo, la Figura 49B muestra riñones de un espécimen de control, y la Figura 49C muestra riñones de un espécimen M4.

Resultados de Estudio Obeso de Dosis Media

La Figura 50 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis media (10 mg/kg) y grupo de prueba durante los días 1-32 del estudio. Como se muestra en la Figura 50, el control obeso exhibió una tendencia de peso en aumento gradual por 31 días. M4 muestra la misma tendencia con fluctuaciones entre los días 8 y 18. Las fluctuaciones cesan después del día 18 y exhiben un mayor aumento después de esto. Al final del periodo de tiempo de

tratamiento, los modelos obesos que fueron inyectados con 10 mg/kg del control tuvieron 2.02% de menor cambio en peso en comparación con los tratados con M4.

La Figura 51 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis media (10 mg/kg) y el grupo tratado con M4 durante los días 57-75 del estudio.

Las Figuras 52A y 52B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes obesos de prueba y control suministrados con el tratamiento de dosis media (10 mg/kg) en el estudio. La Figura 52A muestra el participante de control y la Figura 52B muestra el participante M4.

La Figura 53 es un gráfico que muestra el peso de hígado promedio para participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 54A-54C son fotografías de los hígados de participantes de estudio obesos de dosis media. En particular, la Figura 54A muestra el hígado de un ratón ingenuo, la Figura 54B muestra el hígado de un ratón de control, y la Figura 54C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

La Figura 55 es un gráfico que ilustra el peso de corazón promedio para participantes de estudio obesos que recibieron un tratamiento de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 56A-56C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio obesos de dosis media. En particular, la Figura 56A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 56B muestra el corazón de un ratón de control, y la Figura 56C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

La Figura 57 es un gráfico que muestra la grasa subcutánea promedio de participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 58A-58C son fotografías que muestran la grasa subcutánea de participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 58A muestra la grasa subcutánea de un espécimen ingenuo, la Figura 58B muestra

la grasa subcutánea de un espécimen de control, y la Figura 58C muestra la grasa subcutánea de un espécimen M4.

La Figura 59 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio de participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg).

5 Las Figuras 60A-60C son fotografías que muestran la gras IP de participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 60A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 60B muestra la grasa IP de un espécimen de control, y la Figura 60C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

10 La Figura 61 es un gráfico del peso de riñón promedio en participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg).

Las Figuras 62A-62C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio obesos de dosis media (10 mg/kg). En particular, la Figura 62A muestra riñones de un espécimen ingenuo, la Figura 62B muestra riñones de un espécimen de control, y la Figura 62C muestra riñones de un espécimen M4.

15 Resultados de Estudio Obeso de Dosis Alta

La Figura 63 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis alta (20 mg/kg) y el grupo de prueba durante los días 1-33 del estudio. Como se muestra en la Figura 65, tanto los grupos obesos de control como M4 exhibieron un cambio en peso positivo. M4 muestra un promedio general menor. Al final del periodo de tiempo de tratamiento, los modelos obesos que fueron inyectados con 20 mg/kg de M4 tuvieron 6.39% menos cambio en peso en comparación con los tratados con el control.

20

La Figura 64 ilustra el cambio de peso promedio con el tiempo para el grupo de control obeso de dosis alta (20 mg/kg) y el grupo tratado con M4 durante los días 63-81 del estudio.

25

Las Figuras 65A y 65B son fotografías de la grasa subcutánea de participantes obesos de prueba y de control suministrados con el tratamiento de

dosis alta (20 mg/kg) en el estudio. La Figura 65A muestra el participante de control y la Figura 65B muestra el participante M4.

La Figura 66 es un gráfico que muestra el peso de hígado promedio para participantes de estudio obesos de dosis alta (20 mg/kg).

5 Las Figuras 67A-67C son fotografías de los hígados de participantes de estudio obesos de dosis alta. En particular, la Figura 67A muestra el hígado de un ratón ingenuo, la Figura 67B muestra el hígado de un ratón de control, y la Figura 67C muestra el hígado de un ratón tratado con M4.

La Figura 68 es un gráfico que ilustra el peso de corazón promedio para
10 participantes de estudio obesos que recibieron un tratamiento de dosis alta (20 mg/kg).

Las Figuras 69A-69C son fotografías que muestran los corazones de participantes de estudio obesos de dosis alta. En particular, la Figura 69A muestra el corazón de un ratón ingenuo, la Figura 69B muestra el corazón de un ratón de
15 control y la Figura 69C muestra el corazón de un ratón tratado con M4.

La Figura 70 es un gráfico que muestra la grasa IP promedio de participantes de estudio obesos de dosis alta (20 mg/kg).

Las Figuras 71A-71C son fotografías que muestran la grasa IP de participantes de estudio obesos de dosis alta (20 mg/kg). En particular, la Figura
20 71A muestra la grasa IP de un espécimen ingenuo, la Figura 71B muestra la grasa IP de un espécimen de control, y la Figura 71C muestra la grasa IP de un espécimen M4.

La Figura 72 es un gráfico de peso de riñón promedio en participantes de estudio obesos de alta dosis (20 mg/kg).

25 Las Figuras 73A-73C son fotografías que muestran riñones de participantes de estudio obesos de dosis alta (20 mg/kg). En particular, la Figura 73A muestra riñones de un espécimen ingenuo, la Figura 73B muestra riñones de un espécimen de control, y la Figura 73C muestra riñones de un espécimen M4. En resumen, los

participantes de estudio murinos exhibieron un 30% (promedio) de pérdida de grasa. 25% de los participantes de estudio ganaron músculo. No hubo evidencia de toxicidad de los agentes terapéuticos. También se notó infiltración de hígado graso reducida para los participantes del estudio. Se notó efectividad que se extiende más allá de la línea de tiempo del tratamiento, tal como mayor a 6 meses de efectividad (20-50% de vida media de los ratones). También se notó prevención a largo plazo de síndrome metabólico.

Modelos de Cultivo de Adipocito

Se realizó el siguiente experimento para determinar la eficacia del tratamiento M4 en células de adipocito humanas. En este experimento, los preadipocitos se obtuvieron de Lonza Group (Lonza, Basilea, Suiza). Los adipocitos fueron aislados de la grasa de donantes normales, sin enfermedades.

Las células de preadipocito humanas, opuesto a los adipocitos humanos, fueron usadas en el siguiente experimento. El medio de mantenimiento utilizado fue medio de crecimiento de preadipocito 2 (PGM-2) más complementos: medio basal de preadipocito (500 mL), FBS (10%), L-glutamina (2 mg/mL), GA-1000 (30 µg/mL). El medio de diferenciación usado fue PGM-2 (100 mL), insulina (2 mg/mL), dexametasona (0.2 mg/mL), indometacina (0.4 mg/mL), isobutil-metilxantina (0.2 mg/mL).

Preadipocitos humanos primarios fueron preubicados en placas en 6 placas e inducidos para volverse adipocitos. Los adipocitos luego fueron expuestos a 0.08 mg/mL de compuesto experimental o un vehículo de control por 14 días. Las células resultantes fueron analizadas por microscopia de contraste de fase configurada para identificar células congestionadas de lípidos, MTT (viabilidad), un manchado celular.

Las Figuras 74A-74B muestran imágenes de cultivos de adipocito humano de control obtenidos con microscopia de luz. En particular, la Figura 74A muestra un cultivo a alta ampliación y la Figura 74B muestra el mismo cultivo a ampliación

baja. Los adipocitos humanos congestionados de lípidos y no congestionados se pueden ver en las Figuras 74A-74B.

Las Figuras 75A y 75B muestran imágenes de cultivos de adipocito humano que tienen adipocitos congestionados de lípidos. Las imágenes mostradas en las Figuras 75A y 75B fueron obtenidas usando microscopia de contraste de fase con ampliación baja. La Figura 75A muestra células expuestas a un control y la Figura 75B muestran células expuestas a M4. Como se muestra en las Figuras 75A y 75B, significativamente más adipocitos congestionados de lípidos están presentes en la muestra de control en comparación con la muestra tratada con el compuesto experimental.

Las Figuras 76A y 76B muestran imágenes de cultivos de adipocito humano que tienen adipocitos congestionados de lípidos. Las imágenes mostradas en las Figuras 76A y 76B fueron obtenidas usando micrográficos de contraste de fase de ampliación baja. La Figura 76A muestra células expuestas a un control y la Figura 76B muestra células expuestas a M4. Como se muestra en las Figuras 76A y 76B, significativamente más adipocitos congestionados de lípidos están presentes en la muestra de control en comparación con la muestra tratada con el compuesto experimental.

Las Figuras 77A y 77B muestran imágenes de cultivos de adipocito humano que tienen adipocitos congestionados de lípidos. Las imágenes mostradas en las Figuras 77A y 77B fueron obtenidas usando micrográficos de contraste de fase de ampliación baja. La Figura 77A muestra células expuestas a un control y la Figura 77B muestra células expuestas a M4. Como se muestra en las Figuras 77A y 77B, significativamente más adipocitos congestionados de lípidos están presentes en la muestra de control en comparación con la muestra tratada con el compuesto experimental.

Las Figuras 78A y 78B muestran imágenes de cultivos de adipocito humano obtenidos usando mancha violeta de cristal (mancha de ADN y proteína). La Figura

78A muestra células expuestas a un control y la Figura 78B muestra células expuestas a M4. El número similar de células mostradas en las Figuras 78A y 78B sugiere que la diferencia en el número de células congestionadas de lípidos no es un resultado de citotoxicidad.

5 Las Figuras 79A y 79B son imágenes de adipocitos humanos obtenidos por MTT para aproximar niveles reducidos de cofactor NADH/NADPH. La Figura 79A muestra células expuestas a un control y la Figura 79B muestra células expuestas a M4. Como se muestra en las Figuras 79A y 79B, ambas poblaciones de adipocitos son viables y hay concentraciones ligeramente mayores de nucleótidos reducidos
10 en la muestra de control.

La Figura 80 es un gráfico que muestra los resultados cuantitativos de MTT medido para las muestras de control y las muestras M4. Como se muestra en la Figura 80, las células de control tienen niveles ligeramente mayores de NADH/NADPH. Sin desear atarse por la teoría, el tratamiento M4 puede reducir el
15 nivel de grasa blanca en un paciente, posiblemente reemplazando algo o toda la grasa blanca con grasa marrón. Dado que la grasa marrón utiliza cofactores reducidos para generar calor, los niveles reducidos de estos cofactores cuando hay el mismo número de células puede indicar que los adipocitos blancos son convertidos en adipocitos marrones durante el tratamiento con M4.

20 Estos resultados experimentales muestran que hay menos adipocitos congestionados de lípidos después del tratamiento con el compuesto experimental, M4. Adicionalmente, el número total de células es similar en los grupos de control y de tratamiento, lo que indica una baja toxicidad de M4. Además, hay menos reducción de MTT relacionada con cofactor reducido en el grupo de tratamiento, lo
25 cual es consistente con las células grasas marrones “agujereadas”.