

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de agosto de 2012 (30.08.2012) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/113963 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070111

(22) Fecha de presentación internacional:

23 de febrero de 2012 (23.02.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201130250

25 de febrero de 2011 (25.02.2011)

ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

NOGUEIRAS POZO, Rubén [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **DIÉGUEZ GONZÁLEZ, Carlos** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **VÁZQUEZ VILLAR, María Jesús** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **VELÁSQUEZ RAIMUNDO, Douglas Alfredo** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **MARTÍNEZ RÍO, Gloria** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **ROMERO PICÓ, Amparo** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **DA BOIT MARTINELLO, Katia** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **LÓPEZ PÉREZ, Miguel** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782

Santiago de Compostela (ES). **VIDAL FIGUEROA, Anxo** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **BEIROA TARRÍO, Daniel** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **IMBERNÓN PIEDRA, Mónica** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(74) Mandatario: **ACUÑA ÁLVAREZ, Laura**; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF P53 INHIBITORS FOR REDUCING FOOD INTAKE AND LOWERING BODY WEIGHT

(54) Título : USO DE INHIBIDORES DE P53 PARA REDUCIR LA INGESTA Y PARA REDUCIR EL PESO CORPORAL

(57) Abstract: The present invention relates to the use of p53 inhibitors in the hypothalamus to reduce food intake and to lower body weight in the treatment of obesity or obesity-associated metabolic disorders.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de inhibidores de p53 a nivel hipotalámico para reducir la ingesta de alimentos y para la reducción del peso corporal en el tratamiento de la obesidad o de trastornos metabólicos asociados a la obesidad.



WO 2012/113963 A1

Uso de inhibidores de p53 para reducir la ingesta y para reducir el peso corporal

5 La presente invención se enmarca en el campo de la Biología Molecular, la Biología Celular, la Biotecnología y la Biomedicina. La presente invención se refiere al uso de inhibidores de p53 a nivel hipotalámico para reducir la ingesta de alimentos y para la reducción del peso corporal en el tratamiento de la obesidad o de trastornos metabólicos asociados a la obesidad.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Los trastornos de la conducta alimentaria se caracterizan por anomalías graves en el comportamiento de la ingesta, y en muchos de ellos la base de dicho comportamiento se encuentra en una alteración psicológica. Algunos
15 ejemplos de trastornos de este tipo son la bulimia nerviosa, la depresión atípica, el abuso de drogas psicoactivas, o el enanismo psicosocial. En general, el tratamiento en este tipo de trastornos requiere un enfoque multidimensional, incluyendo tanto terapia psicológica como la renutrición del paciente, siendo imprescindible para este último aspecto regular o controlar la
20 ingesta de alimentos. Así, las terapias farmacológicas más comunes en este tipo de alteraciones incluyen, entre otros, antidepresivos, antagonistas opioides, y otros compuestos conducentes a evitar conductas impulsivas, con resultados sólo parciales.

25 Por otra parte, los desórdenes metabólicos que provocan la obesidad se caracterizan principalmente por alteraciones producidas en los mecanismos reguladores del apetito y del gasto energético. Las alteraciones de este "balance energético" (energía ingerida *versus* energía gastada) darán lugar a variaciones en la masa corporal. La obesidad se caracteriza por un incremento
30 de la cantidad de grasa que determina un exceso de peso hasta un punto donde está asociado con ciertas condiciones perjudiciales para la salud. Es el trastorno nutricional más importante a nivel mundial, con efectos seriamente adversos para la salud, habiéndose demostrado que la obesidad aumenta el

2

riesgo a sufrir distintos trastornos tales como la resistencia a insulina, la diabetes tipo 2, la osteoartritis, la apnea del sueño, y ciertos tipos de cánceres, asociándose con un aumento en la morbilidad y mortalidad, de tal manera que la pérdida de peso permite disminuir significativamente estos riesgos. De hecho, es fundamental destacar que una pequeña pérdida de peso en los pacientes obesos se acompaña de mejoras significativas en los distintos factores de riesgo como la tensión arterial, la tolerancia a la glucosa y la concentración de lípidos séricos.

De este modo, se acepta que una reducción de al menos un 5% del peso corporal inicial es suficiente para obtener mejoras clínicamente significativas de los trastornos metabólicos asociados a la obesidad. Esta pérdida de peso en los pacientes obesos se asocia a: reducciones de las concentraciones de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos, y aumentos de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes con hiperlipemia; aumentos de la sensibilidad a la insulina y disminuciones de las concentraciones de glucosa e insulina en plasma en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2; reducciones significativas de la presión arterial en los pacientes con hipertensión; aumento de la longevidad, de la autoestima y de las emociones positivas.

Aunque sabemos que la obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial, y que el enfoque del tratamiento debe en cierto modo comprender terapia dietaria y actividad física, la utilidad de la farmacoterapia para reducir el peso no debe ser subestimada. En este sentido, varios fármacos han llegado a ser utilizados en pacientes obesos (sibutramina, orlistat, rimonabant) disminuyendo el peso de los mismos y mejorando algunos de los factores de riesgo asociados a la obesidad. Sin embargo, distintos estudios han ido señalando que los efectos adversos que producen los fármacos son superiores a los beneficios que aportan. Así, el principio activo sibutramina, comercializado en España con el nombre Reductil® (laboratorios Abbott), estaba indicado -junto a dieta y ejercicio- para promover pérdidas de peso en pacientes obesos. Sin embargo, la Agencia Europea del Medicamento (EMA

en sus siglas en inglés) recomendó su suspensión en 2010 por haberse asociado con un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Además, el principio activo orlistat, comercializado en España con el nombre Xenical® (laboratorios Roche), evita que parte de la grasa de los alimentos se absorba y digiera en el intestino. Sin embargo, existen bastantes contraindicaciones para su consumo, ya que debido a que las grasas no son digeridas, éstas pasan íntegras por el conducto digestivo haciendo muy difícil que el paciente pueda contener su flujo. Además, la Agencia Americana del Medicamento (*FDA*, por sus siglas en inglés) ha informado del registro de 13 casos de daño hepático grave producido por el uso de orlistat. Asimismo, el principio activo rimonabant, comercializado en España con el nombre Acomplia® (laboratorios Sanofi-Aventis), ha sido el último tratamiento contra la obesidad que se ha lanzado al mercado. A finales de 2008, la *EMEA* concluyó que los beneficios de Acomplia® ya no justificaban los riesgos añadidos, y que éstos implicaban doblar la incidencia de desórdenes psiquiátricos (ansiedad y depresión) en los pacientes obesos o con sobrepeso, comparándolo con los pacientes que recibieron placebo.

Además de los numerosos efectos secundarios, aunque algunos de estos métodos consiguen una reducción inicial de peso, el mantenimiento a largo plazo de dicha reducción continúa siendo un desafío. La mayoría de personas que consiguen reducir su peso inicialmente, acaban volviendo a recuperarlo más tarde.

Además de estos 3 fármacos que han llegado al mercado, en los últimos años, y mediante el desarrollo de nuevas tecnologías, se está investigando el diseño de nuevos tratamientos biológicos basados en la inhibición de señales estimuladoras del apetito localizadas en el sistema nervioso central, cuya eficacia todavía no ha sido demostrada.

30

La ghrelina es la única hormona sintetizada en nuestro organismo, principalmente en el estómago, que incrementa la ingesta. Para ello, la ghrelina desencadena una serie de procesos moleculares en el hipotálamo que

finalmente producen el incremento de los niveles de ciertos neuropéptidos orexigénicos. Para desencadenar estas vías moleculares, la ghrelina necesita activar la proteína kinasa activada por AMP (AMPK) en el hipotálamo. Sin embargo, los mecanismos moleculares iniciados por el receptor de ghrelina y que llevan a la activación de AMPK no se conocen.

p53 (*tumor protein p53*) es una proteína estudiada principalmente como un supresor de tumores en humanos y otros mamíferos. La delección o mutación de p53 está fuertemente asociada con un aumento de la susceptibilidad al cáncer. Sin embargo, publicaciones recientes están demostrando que p53 no sólo tiene un papel esencial en acciones oncogénicas, sino que también juega un rol importante en la longevidad y el envejecimiento, el metabolismo de la glucosa y el estrés (Jones, R. G. *et al.*, *Molecular Cell*, 2005, 18 (3): 283-293; Matoba, S. *et al.*, *Science*, 2006, 312 (5780): 1650-1653; Lee, C. H. *et al.*, *The EMBO Journal*, 2007, 26 (23): 4812-4823; Zhao, Y. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (52): 36344-36353; Mathupala, S. P., Heese, C., and Pedersen, P. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (36): 22776-22780).

Recientemente se ha demostrado que la expresión de p53 se induce en los adipocitos de ratones deficientes en leptina, que son obesos y resistentes a insulina (Yahagi, N. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 25395-25400). La sobreexpresión de p53 suprime la actividad del promotor del gen lipogénico SREBP-1c. Por lo tanto, la activación de p53 disminuye la acumulación de grasa en los adipocitos (Yahagi, N. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 25395-25400).

La expresión de p53 en el tejido adiposo es también crucial, participando en el desarrollo de resistencia a la insulina (Minamino, T. *et al.*, *Nature Medicine*, 2009, 15: 1082-1087). La inhibición de la actividad de p53 en el tejido adiposo disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias y mejora notablemente la resistencia a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Minamino, T. *et al.*, *Nature Medicine*, 2009, 15: 1082-1087). Por el contrario, la

activación de p53 en el tejido adiposo provoca resistencia a la insulina (Minamino, T. *et al.*, *Nature Medicine*, 2009, 15: 1082-1087).

La esteatosis hepática es un desorden metabólico fuertemente asociado a la
5 obesidad. p53 está implicado en los mecanismos moleculares de la lesión
hepatocelular asociados con esteatosis. La expresión de p53 es elevada en el
hígado de modelos de ratón obesos que presentan un hígado graso (Yahagi,
N. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279:20571- 20575). Por
otra parte, la deficiencia de p53 en los ratones obesos deficientes en leptina
10 (*ob/ob*) provoca una notable mejora de los niveles plasmáticos de alanina
aminotransferasa, demostrando que p53 está involucrada en los mecanismos
de lesión hepatocelular (Yahagi, N. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*,
2004, 279:20571- 20575).

15 La sirtuina 1 (SIRT1 o *Sirtuin1*) es una deacetilasa dependiente de NAD⁺ que
ejerce sus distintas acciones biológicas a través de numerosos factores de
transcripción y microARNs, tales como FOXO1, FOXO3, *Histones*, Ku70, p300,
HSF1, PPAR γ , PGC1 α , PPAR α , LXRs, SREBP-1c, UCP-2, PTP1B, MyoD,
TIP60, NF-kappa β y p53 (Cakir I. *et al.*, *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8322; Sasaki
20 *et al.*, *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2556–2566; Haigis and Sinclair, *Annual
Review of Pathology* 2010, 5: 253–295). Así, se sabe que en algunas
ocasiones SIRT1 actúa sobre supresores de tumores tales como p53,
produciendo su deacetilación y por tanto su inactivación, con el efecto final de
restaurar la progresión normal del ciclo celular (Kim E.J. *et al.*, *Molecular Cell*,
25 2007, 28 (2): 277-290). Sin embargo, la interacción entre SIRT1 y p53 es
compleja y específica de cada tejido (Nemoto S. *et al.*, *Science*, 2004, 306:
2105-2108). Así, mientras que en procesos tumorales SIRT1 reprime a p53
(Kim E.J. *et al.*, *Molecular Cell*, 2007, 28 (2): 277-290), en tejidos periféricos
(tejido hepático y músculo-esquelético) y bajo condiciones alimentarias
30 normales, es p53 quien reprime a SIRT1, mientras que bajo condiciones de
ayuno en estos tejidos p53 participa en la estimulación de la transcripción de
SIRT1 (Nemoto S. *et al.*, *Science*, 2004, 306: 2105-2108). La complejidad en
las interrelaciones entre ambas proteínas se ha puesto de manifiesto al

estudiar otras funciones biológicas, habiéndose demostrado que algunas de las funciones dependientes de p53, tales como la apoptosis y mecanismos relacionados con el desarrollo, son independientes de regulación por SIRT1 (Kamel C. *et al.*, *Aging cell*, 2006, 5 (1): 81-88).

5

Recientemente, se ha descrito que SIRT1 actúa sobre la ingesta a nivel hipotalámico, aumentando la respuesta a la ghrelina en condiciones de restricción alimentaria (Satoh A. *et al.*, *The Journal of Neuroscience*, 2010, 30(30): 10220-10232). También se ha demostrado que la inhibición farmacológica y genética de SIRT1 a nivel hipotalámico es capaz de reducir la ingesta en ratas, contribuyendo a la pérdida de peso (Cakir I. *et al.*, *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8322). Además, la solicitud de patente WO2010042868 describe un método para tratar la obesidad mediante la administración de inhibidores farmacológicos de SIRT1, entre estos últimos sirtinol y Ex 527. Sin embargo, uno de los problemas de esta última aproximación es que los inhibidores e inductores farmacológicos de SIRT1 no son tan específicos como los genéticos; así, por ejemplo, se sospecha que inductores farmacológicos de SIRT1 como el resveratrol, no consiguen activar la ingesta debido, por un lado, a que ejerce efectos opuestos simultáneos sobre SIRT1 y sobre otras dianas tales como AMPK, lo cual contrarresta su efecto sobre SIRT1, y por otro, a que su eficacia para alcanzar a los grupos neuronales específicos donde está SIRT1 es baja (Cakir I. *et al.*, *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8322). Por ello, se necesitan alternativas capaces de alcanzar a las dianas hipotalámicas que intervienen en la ingesta con mayor eficacia, y que tengan efectos sobre éstas de forma más específica, como pueden ser los inhibidores genéticos. En cuanto a la inhibición genética de SIRT1, el mayor problema que puede plantear el abordar SIRT1 como una diana anti-obesidad, es que al ser una deacetilasa que actúa sobre múltiples moléculas que ejercen acciones biológicas muy diversas, es muy probable que la inhibición hipotalámica de SIRT1 provoque otros efectos fisiológicos que todavía desconocemos y, es más que predecible que algunos de esos efectos serían no deseables.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al nuevo uso de inhibidores de p53 a nivel hipotalámico para reducir la ingesta de alimentos (agentes anorexigénicos), y que también pueden ser útiles para reducir el peso corporal, por ejemplo en el tratamiento de aquellos trastornos donde es importante alcanzar una reducción de peso significativa, tales como la obesidad u otros trastornos metabólicos asociados a la obesidad.

Los autores de la presente invención han demostrado que la inhibición genética de p53 con un ARN de interferencia para el mismo a nivel hipotalámico: a) disminuye la ingesta de alimentos en ratones, y b) impide la respuesta normal a la ghrelina (hormona que induce el apetito en condiciones normales), de modo que en dichos animales no se produce un aumento en la ingesta de alimentos cuando son estimulados con la administración de esta hormona. Por tanto, los autores de la presente invención han demostrado que la inhibición genética de p53 a nivel hipotalámico es eficaz como terapia anorexigénica y por tanto es eficaz en el tratamiento de trastornos donde es necesario regular o controlar la ingesta de alimentos, es decir, en alteraciones de la conducta alimentaria que pueden conllevar conductas impulsivas de ingesta, tales como la bulimia nerviosa, la depresión atípica, el abuso de drogas psicoactivas, o el enanismo psicosocial, dado que animales a los que se administra un ARN de interferencia para este gen a nivel hipotalámico han demostrado reducir su ingesta. Además, los autores han demostrado que la disminución de la ingesta provocada por el ARN de interferencia para p53 es específica, ya que la secuencia inactiva o control (que recibe el nombre de *sense*, y que no interfiere en la expresión del gen p53) no bloqueó el efecto orexigénico (inductor de ingesta) de la ghrelina. Asimismo, la inhibición de p53 a nivel hipotalámico puede ser también eficaz en trastornos donde la reducción de peso corporal es necesaria para obtener una mejora clínica, como por ejemplo la obesidad, y los trastornos metabólicos asociados a la misma, dado que la reducción en la ingesta de alimentos puede ayudar a reducir el peso

corporal de forma más eficaz y con menos efectos secundarios que los fármacos que inducen cambios en el metabolismo de las grasas, por ejemplo.

5 Por tanto, la presente invención pretende aportar una solución al tratamiento de la hiperfagia que acompaña a diversas alteraciones de la conducta alimentaria, así como a trastornos en los que es importante obtener una reducción de peso corporal y que en muchos casos conlleva un estadio obeso, aportando con ello al campo de la técnica una herramienta muy útil en la solución de dos problemas todavía sin resolver. Así pues, el uso de los

10 inhibidores genéticos de p53 hipotalámico en este tipo de pacientes supone una mejora de la calidad de vida de los mismos, dado que al ser inhibidores genéticos éstos actúan con una mayor especificidad que los inhibidores farmacológicos descritos para otras dianas en este tipo de trastornos, lo que en general conlleva una mayor efectividad, menores dosis necesarias, menor

15 toxicidad y por tanto menores efectos secundarios para el paciente, aspecto que hasta la fecha no se ha podido lograr de manera satisfactoria.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica (en adelante composición farmacéutica de la invención) que

20 comprende:

- i. al menos un inhibidor específico de la expresión del gen codificante de la proteína p53, donde dicho inhibidor comprende un ácido nucleico (en adelante, "ácido nucleico de la invención") de secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias
- 25 SEQ ID NO: 1 a 7, y
- ii. al menos un elemento seleccionado de la lista que comprende: ghrelina, anticuerpo contra péptido relacionado con agoutí (AgRP), anticuerpo contra pro-opiomelanocortina (POMC), anticuerpo contra transcrito regulado por cocaína/anfetaminas
- 30 (CART), anticuerpo contra péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), anticuerpo contra neuropéptido Y (NPY), anticuerpo contra receptor de ghrelina (GHS-R1A) .

En una realización preferida de la invención, el inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1.

5 En la presente invención, la expresión "gen codificante de la proteína p53" y "gen p53" son equivalentes.

10 Las secuencias de diferentes transcritos (o *transcript variants*) de ARNm (ARN mensajero) del gen p53 humano son conocidas, por ejemplo las de SEQ ID NO: 1 a 7. La secuencia del transcrito número 1 (*transcript variant 1*) de ARNm del gen p53 humano corresponde a la SEQ ID NO: 1 y constituye la base para el desarrollo de ácidos nucleicos inhibidores de la expresión del gen p53 en la presente invención.

15 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "inhibidor específico de la expresión del gen codificante de la proteína p53" se refiere a una molécula que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína p53 humana o "*tumor protein p53*" (siendo la secuencia de aminoácidos de dicha proteína la SEQ ID NO: 9), es decir, que impide o disminuye la traducción o la maduración del ARN mensajero, con el efecto final de reducir la cantidad, efecto y/o actividad de la proteína p53 correspondiente. Un agente inhibidor puede estar constituido por un ácido nucleico, un oligonucleótido (un ácido nucleico de menos de 50 nucleótidos), o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimine la cantidad, efecto y/o la actividad de la proteína p53. En la presente invención, el inhibidor comprende un ácido nucleico cuya
20
25 secuencia es complementaria a una región o "secuencia diana" dentro de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 7, que son las secuencias de las distintas versiones de ARN mensajeros del gen p53 humano, lo cual permite que el ácido nucleico reconozca al ARN mensajero, hibridando con éste, e interfiriendo con la expresión de la proteína p53 correspondiente.

30

El término "hibrida", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la unión de cadenas de ADN simple con secuencias complementarias. En

Biología Molecular, la complementariedad es una propiedad de los ácidos nucleicos de doble cadena.

El término “complementario” se refiere a la existencia de una relación de complementariedad de bases nitrogenadas, empleando el emparejamiento de bases de Watson y Crick, entre ácidos nucleicos, por ejemplo entre el ácido nucleico de la invención y la secuencia complementaria o secuencia diana en el ARN mensajero de p53, que es suficiente para dar lugar a la unión específica entre ambos dentro de una célula. Se entiende por apareamiento de bases de Watson y Crick a la unión entre la adenina y la timina mediante dos puentes de hidrógeno, y a la unión entre la guanina y la citosina mediante tres puentes de hidrógeno. Dado que en el ARN no existe timina, la complementariedad se establece entre adenina y uracilo mediante dos puentes de hidrógeno. Una complementariedad perfecta, (es decir, del 100% de los nucleótidos del ácido nucleico de la invención con su secuencia diana en el ARN mensajero) es preferible, pero no absolutamente necesaria, especialmente cuando se emplean ácidos nucleicos de más de 20 nucleótidos. En el caso de ácidos nucleicos de entre 15 y 30 nucleótidos de largo, una complementariedad de al menos 10 de sus nucleótidos con la secuencia diana puede ser suficiente para el reconocimiento y la hibridación con dicha secuencia.

La identidad de la SEQ ID NO: 1, o transcrito número 1 (*transcript variant 1*) de ARNm del gen p53 humano, con las secuencias de los restantes 6 transcritos de ARNm que se han descrito para el gen p53 humano, así como de uno de los transcritos de ARNm para el gen p53 de ratón (*Mus musculus*), se muestran en la Tabla 1:

Especie	Transcrito	% Identidad	SEQ ID NO:	Número de acceso en NCBI
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 1	100	1	NM_000546
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 2	99.8	2	NM_001126112
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 3	53.9	3	NM_001126114
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 4	53.9	4	NM_001126113
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 5	77.9	5	NM_001126115
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 6	53.9	6	NM_001126116
<i>Homo sapiens</i>	Transcrito 7	53.9	7	NM_001126117
<i>Mus musculus</i>	Transcrito 2	35.2	8	NM_001127233

5 Tabla 1: % de identidad de secuencia entre el transcrito número 1 (*transcript variant 1*) de ARNm del gen p53 humano con los restantes 6 transcritos de ARNm del gen p53 humano, y con el transcrito 2 de ARNm del gen p53 de
10 ratón (*Mus musculus*). Se indica también el número de identificación de secuencia en la lista de secuencias de la invención, y el número de acceso en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para la secuencia de ADN equivalente (es decir, la secuencia del NCBI es la secuencia del ARNm donde los uracilos (U) se encuentran sustituidos por
15 timinas (T)).

15 La expresión “% de identidad de secuencia” se refiere al porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que es idéntico a los nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, después de alinear las secuencias para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El % de identidad de secuencia se
20 puede determinar por cualquiera de los procedimientos o algoritmos establecidos en la técnica, tales como *ALIGN* o *BLAST*. En el presente documento, el % de identidad de secuencia se calcula dividiendo el número de nucleótidos que son idénticos después de alinear SEQ ID NO: 1 y la secuencia candidata, entre el número total de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y multiplicando el resultado por 100.

En la presente invención, el inhibidor va acompañado por al menos un elemento (en adelante “elemento que acompaña al inhibidor de la invención”) seleccionado de la lista que comprende:

-ghrelina,

- 5 -un anticuerpo contra alguna de las proteínas: péptido relacionado con agoutí (AgRP o *agouti-related peptide*), pro-opiomelanocortina (POMC), transcrito regulado por cocaína/anfetaminas (CART), péptido similar a glucagón 1 (GLP-1 o *glucagon like peptide*), neuropéptido Y (NPY), receptor de ghrelina (GHS-R1A o *growth hormone secretagogue receptor type 1 isoform 1a*).

10

La secuencia de aminoácidos del péptido relacionado con agoutí (AgRP o *agouti-related peptide*) es la SEQ ID NO: 16. La secuencia de aminoácidos de la pro-opiomelanocortina (POMC) es la SEQ ID NO: 17. La secuencia de aminoácidos del transcrito regulado por cocaína/anfetaminas (CART) es la

15 SEQ ID NO: 18. La secuencia de aminoácidos del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1 o *glucagon like peptide*) es la SEQ ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos del neuropéptido Y (NPY) es la SEQ ID NO: 20. La secuencia de aminoácidos del receptor de ghrelina (GHS-R1A) es la SEQ ID NO: 21. La secuencia de aminoácidos de la ghrelina es la SEQ ID NO: 22.

20

La función del elemento que acompaña al inhibidor de la invención es dirigir al inhibidor a núcleos hipotalámicos específicamente, de modo que el inhibidor sólo actúe sobre la expresión del gen p53 cuando alcanza dichos núcleos.

25

El hipotálamo es una glándula endocrina que forma parte del diencefalo, y se sitúa por debajo del tálamo. El hipotálamo está constituido por diferentes núcleos neuronales que entre otras funciones regulan el hambre, el apetito y la saciedad por medio de hormonas y péptidos. El péptido relacionado con agoutí (AgPR), la pro-opiomelanocortina (POMC), el transcrito regulado por cocaína/anfetaminas (CART), el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1 o *glucagon like peptide*) y el neuropéptido Y (NPY) son neuropéptidos que se

30 localizan principalmente en el núcleo arcuato (o núcleo infundibular) del hipotálamo. El núcleo arcuato del hipotálamo es un núcleo de neuronas que se

encuentra en la parte mediobasal del hipotálamo, donde están los receptores de la ghrelina, como por ejemplo el receptor de ghrelina GHS-R1A. El propósito de unir anticuerpos contra cualquiera de los neuropéptidos, o bien anticuerpos contra el receptor de ghrelina, o bien ghrelina, al inhibidor de la invención, es hacer que el inhibidor se dirija específicamente al hipotálamo, preferiblemente al núcleo arcuato del hipotálamo, actuando sobre la expresión del gen p53 tan sólo en esta región del hipotálamo, y no en otras áreas cerebrales, evitando efectos secundarios no deseables. De esta forma, se consigue inhibir la expresión del gen p53 tan sólo en la ruta hipotalámica donde p53 participa en la regulación de la ingesta, logrando un efecto inhibitorio específico.

Existen casas comerciales que ofrecen anticuerpos contra el péptido relacionado con agoutí (AgPR) (Millipore: *AB3402P Anti-Agouti Related Protein*; Abcam: *AB32882 AGPR Antibody*), así como contra pro-opiomelanocortina (POMC) (Abcam: *POMC Antibody AB32893*; Santa Cruz: *POMC (FL-267) SC-20148*), contra CART (Santa Cruz: *CART Antibody (N-20) SC-18068*), contra GLP1 (Abcam: *GLP1 Antibody AB22625*), contra neuropéptido Y (Abcam: *Neuropeptide Y Antibody AB30914*), y contra el receptor de ghrelina (GHS-R1A) (Abcam: *Ghrelin Receptor Antibody AB85104*).

Por tanto, la composición farmacéutica de la invención comprende un inhibidor de la expresión del gen codificante de la proteína p53 y, o bien ghrelina, o bien anticuerpos que van dirigidos contra proteínas o neuropéptidos localizados únicamente en núcleos hipotalámicos, de modo que dicho inhibidor cruza la barrera hematoencefálica y alcanza a sus dianas hipotalámicas, actuando únicamente sobre éstas. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el inhibidor va unido a anticuerpos contra proteínas o neuropéptidos localizados únicamente en núcleos hipotalámicos. Una forma de unir los anticuerpos al inhibidor sería a través de la inclusión del inhibidor en vehículos tales como una nanopartícula, un liposoma, un vector o una micela, por ejemplo, a los que se pueden unir los anticuerpos en su superficie para dirigir

dichos vehículos a las dianas hipotalámicas. En otra realización preferida de la invención, el inhibidor va unido a ghrelina, o a un agonista del receptor de ghrelina, como por ejemplo BIM-28125 o BIM-28131 (descritos en Strassburg *et al.*, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008, 295: 78-84). Una forma de unir la ghrelina o un agonista del receptor de ghrelina al inhibidor de la invención es a través de síntesis química. Una vez alcanzada la diana hipotalámica, el ácido nucleico comprendido en el inhibidor hibrida con su secuencia complementaria en el ARN mensajero del gen codificante de la proteína p53 hipotalámica, inhibiendo la expresión de este gen únicamente a nivel del hipotálamo.

En una realización preferida, el ácido nucleico es un ARN de interferencia.

Se entiende por ARN de interferencia (ARN de silenciamiento, ARNi o *RNAi*, por sus siglas en inglés), a una molécula de ARN, de cadena simple o doble, que interfiere con un ARN mensajero específico conduciendo así a su degradación y/o disminución de su traducción en proteína. La secuencia del ARN de interferencia (de la única cadena, si es de cadena simple, o de una de ellas, si es de cadena doble) es complementaria a una región de la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero específico o “secuencia diana”, pero no en sentido 5'-3' (sentido), sino en sentido 3'-5' (antisentido), ejerciendo un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional, interfiriendo con la expresión o traducción de dicho ARN mensajero y por tanto impidiendo la producción de un péptido o proteína, provocando su deficiencia. En la presente descripción, se entiende por “cadena antisentido” a la cadena de la molécula de ARN de interferencia que es complementaria en sentido 3'-5' a la secuencia del ARN mensajero en cuya expresión interfiere. Es decir, a la única cadena de la molécula de ARN de interferencia si ésta es de cadena simple, y a una de las cadenas si ésta es de cadena doble.

Se entiende por molécula de ARN de cadena simple a una molécula de ARN formada por una sola cadena de nucleótidos. Se entiende por molécula de

ARN de cadena doble a una molécula de ARN formada por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí por complementariedad de bases.

5 El término ARN de interferencia fue inicialmente acuñado por Fire y colaboradores (Fire *et al.*, *Nature*, 1998, 19; 391(6669): 806-11), para describir la observación de que moléculas de ARN de cadena doble eran capaces de bloquear la expresión de distintos genes de forma más efectiva que cada cadena individual por separado, cuando cualquiera de ellas era introducida en el gusano *Caenorhabditis elegans*. En la actualidad, se sabe que estos ARN
10 son capaces de dirigir el silenciamiento post-transcripcional y específico de distintos genes y en distintos organismos, incluyendo a los vertebrados. El mecanismo a través del cual actúan estos ARN de interferencia implica la activación de una maquinaria ancestral que media la degradación o supresión específica del o los ARN mensajero/s que contiene/n la secuencia
15 complementaria al ARN de interferencia introducido o producido, produciéndose principalmente una degradación del ARN mensajero citoplasmático y una disminución de la traducción del mensaje, aunque algunos de los mecanismos bioquímicos que subyacen a esta degradación se desconocen.

20

En la presente descripción, el término “ARN de interferencia” incluye a los ARN interferentes pequeños (*siRNA* o *small interfering RNA*), los ARN antisentido, los micro ARNs y los ARN en horquilla (*small hairpin RNA* o *shRNA*). Por tanto, en la presente descripción, la molécula de ARN de interferencia puede ser
25 tanto de cadena simple como de cadena doble, e incluye tanto a moléculas naturales o recombinantes aisladas, como a moléculas sintetizadas químicamente. Una molécula natural de ARN de interferencia es el ARN de interferencia nativo que se encuentra de forma natural dentro de las propias células. Además, las moléculas de ARN de interferencia pueden contener
30 alteraciones con respecto a la secuencia del ARN de interferencia nativo, mediante la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos, modificaciones del esqueleto fosfodiéster, modificaciones del azúcar, modificaciones del grupo fosfato, y cualquier combinación de las

mismas, con el fin de incrementar su estabilidad *in vivo*, por ejemplo para resistir la acción de las nucleasas. Algunas modificaciones del esqueleto fosfodiéster que incrementan la estabilidad de los oligonucleótidos incluyen las que dan lugar a oligonucleótidos fosforotioatos (PS) o a oligonucleótidos metil fosfonatos (MP), en los cuales uno de los átomos de oxígeno que no forman enlaces, son sustituidos por un grupo sulfuro o metilo, respectivamente. Algunas de las modificaciones más comunes para moléculas de ARN de interferencia de cadena simple se describen en Dean y Bennett (Dean y Bennett , *Oncogene*, 2003, 22, 9087–9096).

10

En una realización preferida de la presente invención, el ARN de interferencia es de cadena simple.

15

Por tanto, preferiblemente, el ARN de interferencia es una molécula de ARN de cadena simple cuya secuencia es complementaria a una región de la secuencia de nucleótidos de un ARN mensajero específico en cuya expresión interfiere.

20

Conocida la secuencia de un ARN mensajero determinado, existen distintas aproximaciones conocidas en el estado de la técnica para diseñar moléculas de ARN de interferencia capaces de inhibir la traducción de dicho ARN mensajero a proteína. Así, en una aproximación simple, se puede seleccionar aleatoriamente una región concreta dentro de la secuencia de un ARN mensajero específico y diseñar una molécula de ARN de cadena simple cuya secuencia sea complementaria a aquella pero en sentido 3'-5' (antisentido). Asimismo, existen diversos algoritmos y procedimientos informáticos en el estado de la técnica que permiten una selección más racional de las regiones de la secuencia del ARN mensajero que serán más óptimas para el diseño de las moléculas de ARN de interferencia, y que tienen en cuenta diversos parámetros tales como la secuencia y la estabilidad interna de la molécula de ARN de interferencia resultante.

30

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del ARN de interferencia tiene al menos un 70% de identidad con las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del ARN de interferencia es cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

Las secuencias SEQ ID NO: 10, 11 y 12 corresponden a moléculas de ARN de interferencia de cadena simple específicas para las regiones de la secuencia del ARN mensajero 1 de p53 (SEQ ID NO:1) entre los nucleótidos 544-563, 902-920 y 958-977 respectivamente. Las secuencias SEQ ID NO: 10, 11 y 12 corresponden a la secuencia complementaria antisentido de la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero 1 de p53 entre las posiciones 544-563, 902-920 y 958-977 respectivamente, comprendiendo además un dinucleótido TT adicional en el extremo 3'.

Preferiblemente, la secuencia del ARN de interferencia tiene una longitud de entre 12 y 30 nucleótidos. Más preferiblemente, es de entre 18 y 22 nucleótidos. Aún más preferiblemente, es de 21 nucleótidos.

En una realización preferida, la secuencia del ARN de interferencia comprende además un dinucleótido TT en el extremo 3'.

El dinucleótido TT en el extremo 3' se refiere a la existencia de dos timinas consecutivas en el extremo 3' de la secuencia de la cadena antisentido de la molécula de ARN de interferencia. La unión de 2 ó 3 nucleótidos, preferiblemente desoxiribonucleótidos, en el extremo 3' de la cadena antisentido, constituye una práctica habitual en el diseño de las moléculas de ARN de interferencia, ya que la presencia de dichos nucleótidos aumenta la especificidad en el reconocimiento de la secuencia diana en el ARN mensajero en cuya expresión interfiere.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor específico de la expresión del gen codificante de la proteína p53, donde dicho inhibidor

comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a 7, para la preparación de un medicamento para reducir la ingesta de alimentos.

- 5 La reducción de la ingesta de alimentos se produce debido a las alteraciones que la composición farmacéutica provoca en algunos de los mecanismos reguladores de la ingesta en el hipotálamo.

- 10 La reducción de la ingesta de alimentos es útil en el tratamiento de trastornos de la conducta alimentaria donde es necesario regular o controlar la ingesta de alimentos, y que pueden conllevar conductas impulsivas de ingesta, como por ejemplo la bulimia nerviosa, la depresión atípica, el abuso de drogas psicoactivas, o el enanismo psicosocial.

- 15 En una realización preferida, el inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a la secuencia SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el ácido nucleico es un ARN de interferencia. Preferiblemente, el ARN de interferencia es de cadena simple. Preferiblemente, la secuencia del ARN de interferencia tiene al menos un 70% de identidad con las secuencias SEQ ID
20 NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. Aún más preferiblemente, la secuencia del ARN de interferencia es cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

- 25 En otra realización preferida, la secuencia del ARN de interferencia tiene una longitud de entre 12 y 30 nucleótidos. Más preferiblemente, es de entre 18 y 22 nucleótidos. Aún más preferiblemente, es de 21 nucleótidos. En una realización preferida, la secuencia del ARN de interferencia comprende además un dinucleótido TT en el extremo 3'.

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento para reducir el peso corporal en un sujeto. Preferiblemente, el sujeto sufre de obesidad, o de un trastorno metabólico asociado a la obesidad.

El término “reducir el peso corporal” se refiere a toda estrategia que pretenda evitar un aumento de peso, reducir una posible ganancia de peso o reducir el peso corporal. Dicha reducción de peso corporal se puede llevar a cabo, por ejemplo, sobre un sujeto con sobrepeso. El sobrepeso se puede determinar atendiendo a los Índices de Masa Corporal (IMC, *Body Mass Index* o *BMI*) que se emplean de manera rutinaria para estimar si un paciente presenta un peso normal, sobrepeso u obesidad, de acuerdo a distintos parámetros tales como la altura.

10

El término “obesidad” se refiere a un incremento de la cantidad de grasa que determina un aumento del peso corporal hasta un punto donde está asociado con ciertas condiciones perjudiciales para la salud.

Se acepta que una reducción de peso de al menos un 5% del peso corporal inicial es suficiente para obtener mejorías clínicamente significativas de los trastornos asociados a la obesidad, tales como la resistencia a insulina, la diabetes tipo 2, la osteoartritis, la apnea del sueño, ciertos tipos de cánceres, la hipertensión arterial y la existencia de niveles circulantes elevados de lípidos.

20

Esta pérdida de peso en los pacientes obesos se asocia a: reducciones de las concentraciones de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos y aumentos de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes con hiperlipemia; aumentos de la sensibilidad a la insulina y disminuciones de las concentraciones de glucosa e insulina en plasma en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2; reducciones significativas de la presión arterial en los pacientes con hipertensión; aumento de la longevidad, de la autoestima y de las emociones positivas.

25

En una realización preferida, el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacológicamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable”

30

incluye a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico y biotecnológico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes, tensoactivos, nanopartículas, vectores, partículas de lípido-ácido nucleico, liposomas, micelas, virosomas y cualquier combinación de los mismos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los inhibidores de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación y el transporte del inhibidor, así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El vehículo puede ser un vector, que puede ser apropiado para la terapia génica. Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. El vehículo puede ser una nanopartícula de oro, de plata o de cualquier otro elemento químico adecuado para la elaboración de la misma. El uso de nanopartículas como vehículos para el transporte del inhibidor puede permitir la liberación gradual del inhibidor en su región diana. Ejemplos de nanopartículas adecuadas para el transporte de ARN de interferencia se describen en Lee *et al.*, *Small*, 2011, 7(3): 364-370.

Opcionalmente, dicho vehículo puede ir recubierto por anticuerpos dirigidos contra proteínas o neuropéptidos localizados únicamente en núcleos hipotalámicos, tales como el núcleo arcuato, de modo que el ácido nucleico cruzaría la barrera hematoencefálica y alcanzaría a sus dianas hipotalámicas específicamente.

El término “terapia génica”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la transferencia de un material genético de interés (ADN o ARN) a un huésped para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida. El material genético de interés codifica un producto (un polipéptido o proteína, un péptido o un ARN funcional) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede consistir en un ARN de interferencia de valor terapéutico.

En una realización preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral. En otra realización preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral. Preferiblemente, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intravenosa. La administración oral es aquella que se realiza por la boca. La administración parenteral es aquella que se realiza a través de una inyección o infusión. Algunos ejemplos de administración parenteral son la inyección subcutánea, intravenosa, intraarticular o intramuscular.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la expresión del gen codificante de la proteína p53 es una cantidad suficiente para reducir la expresión de dicho gen o la traducción de su ARN mensajero correspondiente, que puede ser extrapolada a partir de los datos obtenidos en ensayos en animales. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un inhibidor para tratar una enfermedad o trastorno es una cantidad del inhibidor suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad eficaz de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir la sustancia y el propósito por el que se da la sustancia. La cantidad eficaz en cada caso individual la puede determinar

empíricamente el experto en la materia de acuerdo con los procedimientos establecidos en la técnica.

5 En una realización preferida, el medicamento además comprende un excipiente farmacológicamente aceptable. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del inhibidor, lo estabiliza o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo
10 almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción
15 en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que se hace referencia está permitido y evaluado de modo que es seguro, no
20 es tóxico y no causa efectos adversos a los organismos a los que se administra.

En una realización preferida, el medicamento además comprende otra sustancia activa. En una realización preferida, el medicamento se administra
25 como terapia combinada. Una terapia combinada se refiere a que el medicamento se administra junto con otro medicamento.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
30 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.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Efecto de la administración aguda de Ghrelina (5 µg) intracerebroventricular (i.c.v.) sobre la ingesta acumulada (g) a 2 (A) y 6 (B) horas, en ratones p53 *wild type* (WT) y *knockout* (KO) machos. Ocho individuos por grupo, siendo: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

10

Figura 2. Efecto del tratamiento agudo con Ghrelina (5 µg) intracerebroventricular (i.c.v.), a las 6 horas, sobre los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos en hipotálamo de ratones macho p53 *wild type* (WT) y *knockout* (KO). El análisis de proteínas se realizó a través de *Western Blotting*, con 8 individuos por grupo, siendo: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Se indican los niveles de proteína hipotalámicos de pAMPKα, AMPKα1, AMPKα2, pACC, ACCα y FAS después de 6 horas tras la administración de ghrelina. **A:** gel resultante tras el análisis por *Western Blotting*. VH: ratones tratados con suero fisiológico (control); GHR: ratones tratados con ghrelina. **B:** Los valores obtenidos por *Western Blotting* fueron normalizados con los del control interno beta actina, y los resultados se expresan como unidades arbitrarias (% de cambio respecto al control). La media de los valores se obtuvo de 8 animales por grupo. Los valores se representan como la media ± error medio estándar, *p<0.05, **p<0.01. Las barras en blanco representan los animales tratados con suero fisiológico, y las barras en negro representan los animales tratados con ghrelina.

15

20

25

30

Figura 3. Efecto de la administración aguda de Ghrelina (5 µg) y del ARN de interferencia de p53 intracerebroventricular (i.c.v.) sobre la ingesta acumulada (g) a 2, 4 y 6 horas en ratones machos (8 animales por grupo, n=8, siendo: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). VH: suero fisiológico; GHR: ghrelina; sip53: ARN de interferencia para p53, correspondiente a la SEQ ID NO:11 (10 µg); NS: secuencia inactiva de ARN (*sense*).

Figura 4. Localización de la administración específica del ARN de interferencia y las secuencias inactivas de p53 en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo.

5 **Figura 5.** Efecto de la administración específica del ARN de interferencia de p53 en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo sobre la ingesta acumulada (g) a 12, 24, 36 y 48 horas en ratones normales. p53: ARN de interferencia para p53, correspondiente a la SEQ ID NO:11; NS: secuencia inactiva de ARN (*sense*), correspondiente a la SEQ ID NO:14.

10

Figura 6. Efecto de la administración específica del ARN de interferencia de p53 en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo sobre la masa corporal en ratones normales. p53: ARN de interferencia para p53, correspondiente a la SEQ ID NO:11; NS: secuencia inactiva de ARN (*sense*), correspondiente a la SEQ ID NO:14. Las flechas corresponden a las dos administraciones realizadas, al principio del experimento (tiempo 0, flecha a la izquierda) y después de 24 horas (flecha a la derecha).

15

EJEMPLOS

20

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del uso de inhibidores de p53 hipotalámico como agentes anorexigénicos o supresores del apetito.

25

EJEMPLO 1: Efectos de la ghrelina sobre la ingesta en ratones *p53 wild type* (WT) y *knockout* (KO)

MATERIALES Y MÉTODOS

30

Modelos animales

En estos experimentos se utilizaron ratones *p53 knockout* (KO) y *wild type* (WT), que fueron alojados en habitaciones con condiciones estables de temperatura (22-24°C) bajo un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad y

alimentados con una dieta estándar. Los ratones homocigotos WT y KO fueron originados de apareamientos entre ratones heterocigotos. Los animales fueron tratados y sacrificados a las 10-12 semanas de edad, antes de cualquier signo de morbilidad debido al desarrollo de tumores. Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con los estándares aprobados por el Comité de Animales de la Universidad de Santiago de Compostela. Los ratones *p53 knockout* utilizados son los descritos en Jacks T. *et al.*, *Current Biology*, 1994, 4 :1-7.

10 Solución anestésica

I.-KETAMINA: 42.5 % ketalar, parke-Davius, Morris Plańis N. J. (USA) 50mg/ml

II.-XILAZINA 20% Rompun, Bayer Leverkusen, Alemania. 2 mg/ml.

III.-solución salina fisiológica 37.5 %

15 Canulación intracerebroventricular (i.c.v.)

Esta operación debe realizarse aproximadamente unos 4 días antes del experimento. El objetivo de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral.

Se utilizaron cánulas de polietileno (PE-20, PE-50, *Clay Adams, Becton-Dickinson*, New Jersey USA) de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro interno); en uno de los extremos de la cánula se pone un tope y se corta en bisel a unos $\frac{3}{4}$ mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce al cerebro y la que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se selló hasta el día del experimento. Una vez anestesiados los animales se realizó un corte en la piel de la cabeza a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con la ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localizó el bregma, que separa los huesos frontales de los occipitales y que se utilizó como punto de referencia para realizar un orificio (1.2 mm mediolateral y 1 mm posterior) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente se añadió cianoacrilato para que la cánula quedara perfectamente fija y se selló toda la zona abierta.

Para comprobar que la cánula ha quedado en posición correcta se inyectó protamina 2 %, disuelto en agua con acetato sódico, lo cual claramente tiñe el ventrículo lateral, demostrando así que la cánula ha sido colocada correctamente.

5

Administración intracerebroventricular (i.c.v.) de ghrelina en ratones normales y deficientes para p53

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- 10 ratones *wild type* control (3 µl suero fisiológico)
- 10 • 10 ratones *wild type* tratados con ghrelina (5µg/3 µl) (*human ghrelin trifluoroacetate*; referencia: H4864; Bachem)
- 10 ratones p53 *knockout* control (3 µl suero fisiológico)
- 10 ratones p53 *knockout* tratados con ghrelina (5µg/3 µl)

15 La ghrelina se administró de manera intracerebroventricular a través de una cánula de polietileno. A los animales se les puso una cantidad de comida pesada y se midió la ingesta a 2 y 6 horas tras la administración de la ghrelina.

RESULTADOS

20 En primer lugar, comprobamos que la administración central (intracerebroventricular) de la ghrelina incrementa la ingesta en ratones *wild type* después de 2 y 6 horas (Figura 1). Sin embargo, en los ratones deficientes para p53, la ghrelina no produjo este incremento de la ingesta (Figura 1).

25 **EJEMPLO 2: Efectos de la ghrelina sobre el metabolismo de ácidos grasos en el hipotálamo de ratones p53 *wild type* (WT) y *knockout* (KO)**

MATERIALES Y MÉTODOS

30 Los protocolos de extracción, homogenización de proteínas y *Western Blotting* se llevaron a cabo tal y como se describe en: Theander-Carrillo C *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116:1983-93.

Se utilizaron 8 individuos por cada grupo experimental.

Homogenización y extracción de proteínas para *Western Blotting*

5 Las muestras permanecieron a -80°C , en el momento que se procesaron las muestras se mantuvieron en hielo. Se les añadió tampón de lisis en proporción al tejido que en este caso son 500 μl de tampón de lisis para hipotálamo de rata y 160 μl para hipotálamo de ratón.

Se utilizó el siguiente tampón de lisis:

10 Tris-HCl* pH: 7.5
EGTA 0.2 M* (pH 8)
EDTA 0.2 M* (pH 8)
Tritón-X 100*
*Sodium Orthovanadate** 0.1 M
*Sodium Fluoride**
15 *Sodium Pyrophosphate**
Sacarosa* 0.27 M
(*)Sigma Aldrich, St. Louis, USA

20 Se utilizó el inhibidor de proteasas "*Complete, proteasa inhibitor cocktail tablets*" (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), empleando una pastilla por cada 50 μl de tampón de lisis.

Se homogenizaron los hipotálamos en el homogenizador "*Tissue lyser II*" (Qiagen, Retsch, Germany), y se determinó la concentración de proteínas a través del método colorimétrico Bradfor (*Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories, 25 Germany) en el espectrofotómetro Sunrise (Tecan, Austria).

Se les añadió el tampón de carga a las muestras y se guardaron a -80°C hasta ser utilizadas.

El búffer de carga ("*Sample buffer*" 5 x o Tampón de carga) se preparó con los siguientes elementos:

30 Tris-HCl 250 mM pH: 6.8
10% (w/v) SDS (*sodium dodecyl sulfate*)
50% (v/v) Glicerol

28

0.0005 % (w/v) *Bromophenol Blue*

5% (v/v) β -mercaptoetanol

Al momento de utilizar las muestras se colocaron en hielo y luego se calentaron a 95°C durante 10 minutos.

5

Western Blotting, electroforesis y transferencia

Se separaron las proteínas por su peso a través de la utilización de geles Tris/glicina SDS-PAGE del 6% y del 10% de poliacrilamida. Estos geles constan de dos fases, "*Stacking gel*" y "*Running gel*" (preparados según *Molecular cloning, A laboratory manual*, Maniatis, 2ª edición), y se cargaron 40 μ g de proteínas en 16 μ l en el caso del hipotálamo.

10

La electroforesis se realizó a 130 V durante 50 minutos en caso de geles al 6% de poliacrilamida ó a 100 V durante 100 minutos en caso de geles al 10% de poliacrilamida.

15

Se utilizaron los siguientes tampones:

Tampón de electroforesis: 72 g de Glicina, 15 g de Tris-base, 5 g de SDS (*sodium dodecyl sulfate*).

Tampón de transferencia: 25 X: 36.5 g de Glicina, 72.5 g de Tris-base, 4.5 g de SDS.

20

A continuación, se hizo la transferencia de los geles a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno, 0.45 μ m, Millipore, Massachusetts, USA); las transferencias se realizaron a 0.18 A durante 100 minutos.

Las membranas de PVDF se activaron previamente en metanol 5 minutos, en agua 2 minutos y en tampón de transferencia 2 minutos.

25

Se bloquearon las membranas con BSA (*Bovine albumin*, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y con leche desnatada (*Nonfat-dried Milk Bovine*, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante una hora a temperatura ambiente, según especificaciones de cada anticuerpo.

30

Inmunodetección

29

Se lavaron las membranas en TBS-TWEEN (100 ml-TBS 10 x, 1 ml-TWEEN 20, 900 ml agua destilada) y luego se incubaron las membranas con el anticuerpo primario a las diluciones adecuadas, durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C.

- 5 Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios (Tabla 2) a una dilución de 1:10000 y se incubaron durante una hora o durante toda la noche:

Proteína	Casa comercial
ACC (<i>anti-acetyl CoA Carboxylase</i>) pACCA (<i>anti-phospho-acetyl CoA Carboxylase, ser 79</i>) AMPK α 1 (<i>AMP-activated protein kinase α1</i>) AMPK α 2 (<i>AMP-activated protein kinase α2</i>)	Upstate, Millipore, Temecula, CA, USA
pAMPK α -Thr ¹⁷² (<i>phospho-AMP-activated protein kinase</i>) acetyl –p53 (Lys379) Phospho-CREB (Ser13)	Cell Signaling, Danvers, USA.
SIRT1 (B-7) , FKHR (C-15)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
β -Actin	Sigma Aldrich

Tabla 2: anticuerpos primarios empleados en el *Western Blotting*.

- 10 Se realizaron tres lavados con solución TBS-TWEEN de 5 minutos cada uno y luego se incubaron con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron, con una dilución de 1:50000, y con una incubación de una hora:

Policlonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP

Polyclonal rabbit Anti-Mouse immunoglobulins/Mouse HRP (Dako, Dinamarca)

Luego se realizaron tres lavados con solución TBS-TWEEN de 5 minutos cada uno y se incubaron las membranas durante 1-2 minutos con el Sustrato de quimioluminiscencia o ECL (*Pierce ECL (Enhanced Chemiluminescent Substrate) Western Blotting Substrate*, Thermo, scientific, Rockford, USA) en un lugar oscuro y sin agitación.

Cuando el anticuerpo secundario se incubaba con el sustrato y el ECL, emite una reacción luminosa que permite la visualización, mediante autoradiografía, de la interacción de anticuerpos con la proteína de la muestra.

Luego, se colocaron las membranas en un casete de autoradiografías con películas fotográficas (Amersham, hiperfilm M RPN 6 K) y se revelaron las películas en diferentes tiempos de exposición según la señal, en la cámara oscura.

RESULTADOS

Tras comprobar que la falta de p53 bloquea el efecto orexigénico (inductor de ingesta) de la ghrelina, investigamos los mecanismos moleculares que podrían estar alterados a través de la determinación de los niveles de distintas enzimas que actúan en el metabolismo de ácidos grasos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de AMPK α 1 (AMP-activada proteína kinasa α 1), AMPK α 2 (AMP-activada proteína kinasa α 2), FAS (sintetasa de ácidos grasos) o ACC α (acetil Coenzima A carboxilasa) entre ratones *wild type* y *knockout* para p53. Sin embargo, nuestros datos indican que 6 horas tras la inyección central en ratones *wild type*, la ghrelina activa pAMPK en el hipotálamo (incrementa los niveles de AMPK fosforilada) (Figura 2 A y B). Sin embargo, en los ratones deficientes para p53, la ghrelina no activa AMPK (Figura 2 A y B), lo cual indica que p53 es un mediador esencial de las acciones de la ghrelina sobre AMPK.

EJEMPLO 3: Efectos del ARN de interferencia de p53 sobre la ingesta y la acción orexigénica de la ghrelina en ratones normales

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Administración i.c.v. de ARN de interferencia para p53 y ghrelina

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- 10 ratones control (3 μ l suero fisiológico + 3 μ l suero fisiológico)
- 10 ratones tratados con suero fisiológico (3 μ l) + ghrelina (5 μ g/3 μ l)
- 10 • 10 ratones tratados con ARN de interferencia para p53 (10 μ g/3 μ l) + suero fisiológico (3 μ l)
- 10 ratones tratados con ARN de interferencia para p53 (10 μ g/3 μ l) + ghrelina (5 μ g/3 μ l)
- 15 • 10 ratones tratados con la secuencia inactiva del ARN de p53 (10 μ g/3 μ l) + ghrelina (5 μ g/3 μ l)

Las secuencias para los ARN de interferencia para p53 (ARNi) y las secuencias de ARN inactivas de p53 (*sense*) correspondientes ensayadas fueron las siguientes:

ARNi (5' - 3')	SEQ ID NO:	Posición en la secuencia de p53 de ratón	Posición en la secuencia de p53 de humano
acagacuuggcuguccagTT	10	495-514	544-563
ggagcuauuacacauguacTT	11	853-872	902-920
gagucuuccagugugaugaTT	12	909-928	958-977
ARN inactivas de p53 (<i>sense</i>)			
cugggacagccaagucuguTT	13	495-514	544-563
guacauguguaauagcuccTT	14	853-872	902-920
ucaucacacuggaagacucTT	15	909-928	958-977

Tabla 3: secuencias de los ARN de interferencia y los ARN inactivos (*sense*) diseñados para p53.

La posición en la secuencia de p53 corresponde al número de nucleótido en la secuencia del ARNm (*transcript variant 1*) de p53. La secuencia de p53 de ratón corresponde a la de número de acceso en la NCBI (*National Center for*
5 *Biotechnology Information*): NM_001127233 (SEQ ID NO: 8) . La secuencia de p53 de humano corresponde a la de número de acceso en la NCBI: NM_000546 (SEQ ID NO:1).

10 Las moléculas de ARN de interferencia, así como las de ARN inactivas, fueron diseñadas por nLife Therapeutics S.L.

RESULTADOS

Una vez comprobado que la deficiencia global de p53 afecta a la señal orexigénica de la ghrelina, se diseñaron tres ARN de interferencia (ARNi) para
15 bloquear la expresión de p53 específicamente en el sistema nervioso central. Para ello, inyectamos el ARNi de manera intracerebroventricular, y observamos que por sí solo, el ARNi inhibe la ingesta de ratones normales (Figura 3). Además, el ARNi bloquea el efecto orexigénico inducido por la ghrelina (Figura 3). Para comprobar que esta disminución de la ingesta
20 provocada por el ARNi no está provocada por un efecto inespecífico, administramos de manera intracerebroventricular, una secuencia inactiva (*sense*) de p53, que es idéntica a la secuencia de ARNm de p53 en dirección 5'-3', la cual no debería ejercer efecto alguno. Como se demuestra en la figura 3, la administración de la secuencia *sense* no bloquea el efecto orexigénico de
25 la ghrelina. Por tanto, nuestros datos indican que el efecto anorexigénico del ARNi contra p53 en el hipotálamo es específico.

EJEMPLO 4: Efectos de la administración específica del ARN de interferencia de p53 en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo sobre la
30 **ingesta y la masa corporal en ratones normales**

MATERIALES Y MÉTODOS

Administración de ARN de interferencia para p53 de manera específica en el ARC.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- 10 ratones tratados con la secuencia inactiva del ARN de p53 (5 µg/1 µl)
- 5 • 10 ratones tratados con ARN de interferencia para p53 (5 µg/1 µl)

La secuencia para el ARN de interferencia para p53 (ARNi) fue la correspondiente a la SEQ ID NO: 11, mientras que la secuencia de ARN inactiva de p53 (*sense*) fue la correspondiente a SEQ ID NO: 14 (Tabla 3).

10 **RESULTADOS**

Una vez comprobado que el ARN de interferencia (ARNi) para bloquear la expresión de p53 específicamente en el sistema nervioso central disminuía el efecto orexigénico de la ghrelina, investigamos el efecto de este ARNi tras su administración específica en el ARC, ya que el ARC es un núcleo esencial en la regulación de la ingesta y de la masa corporal. Para ello, inyectamos el ARNi mediante estereotaxia bilateral. Es decir, dado que el ARC tiene dos áreas (situada cada área en cada hemisferio del cerebro) (Figura 4), se realizaron dos inyecciones del ARNi, una en cada área del ARC al principio del experimento (tiempo 0) y después de 24 horas. Los resultados indican que por sí solo, el ARNi inyectado en el ARC inhibe la ingesta (Figura 5) y disminuye la masa corporal (Figura 6) de ratones normales.

Como control de este grupo, administramos de la misma manera una secuencia inactiva (*sense*) de p53, que es idéntica a la secuencia de ARNm de p53 en dirección 5'-3', la cual no debería ejercer efecto alguno. Como se demuestra en la figura 5, los ratones a los que se les administró la secuencia *sense* (NS en la figura 5) en el ARC comieron más que los ratones tratados con el ARNi.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - 5 i. al menos un inhibidor específico de la expresión del gen codificante de la proteína p53, donde dicho inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 7, y
 - 10 ii. al menos un elemento seleccionado de la lista que comprende: ghrelina, anticuerpo contra péptido relacionado con agoutí (AgRP), anticuerpo contra pro-opiomelanocortina (POMC), anticuerpo contra transcrito regulado por cocaína/anfetaminas (CART), anticuerpo contra péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), anticuerpo contra neuropéptido Y (NPY), anticuerpo contra
15 receptor de ghrelina (GHS-R1A) .
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde el inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1.
20
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, donde el ácido nucleico es un ARN de interferencia.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, donde el ARN de
25 interferencia es de cadena simple.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la secuencia del ARN de interferencia difiere en 1, 2 ó 3 nucleótidos con respecto a las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:
30 11, o SEQ ID NO: 12.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, donde la secuencia del ARN de interferencia es cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.
- 5 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 ó 4, donde la secuencia del ARN de interferencia tiene una longitud de entre 12 y 30 nucleótidos.
- 10 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde la secuencia del ARN de interferencia además comprende un dinucleótido TT en el extremo 3'.
- 15 9. Uso de un inhibidor específico de la expresión del gen codificante de la proteína p53, donde dicho inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 7, para la preparación de un medicamento para reducir la ingesta de alimentos.
- 20 10. Uso según la reivindicación 9, donde el inhibidor comprende un ácido nucleico de secuencia complementaria a la secuencia SEQ ID NO: 1.
11. Uso según la reivindicación 10, donde el ácido nucleico es un ARN de interferencia.
- 25 12. Uso según la reivindicación 11, donde el ARN de interferencia es de cadena simple.
- 30 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la secuencia del ARN de interferencia difiere en 1, 2 ó 3 nucleótidos con respecto a las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

14. Uso según la reivindicación 13, donde la secuencia del ARN de interferencia es cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.
- 5 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, donde la secuencia del ARN de interferencia tiene una longitud de entre 12 y 30 nucleótidos.
- 10 16. Uso según la reivindicación 15, donde la secuencia del ARN de interferencia además comprende un dinucleótido TT en el extremo 3'.
- 15 17. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para reducir el peso corporal en un sujeto.
18. Uso según la reivindicación 17, donde el sujeto sufre de obesidad o de un trastorno metabólico asociado a la obesidad.
- 20 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18, donde el medicamento además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.
- 30 21. Uso según la reivindicación 20, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intravenosa.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21, donde el medicamento además comprende un excipiente farmacológicamente aceptable.

1/4

FIGURAS

Figura 1

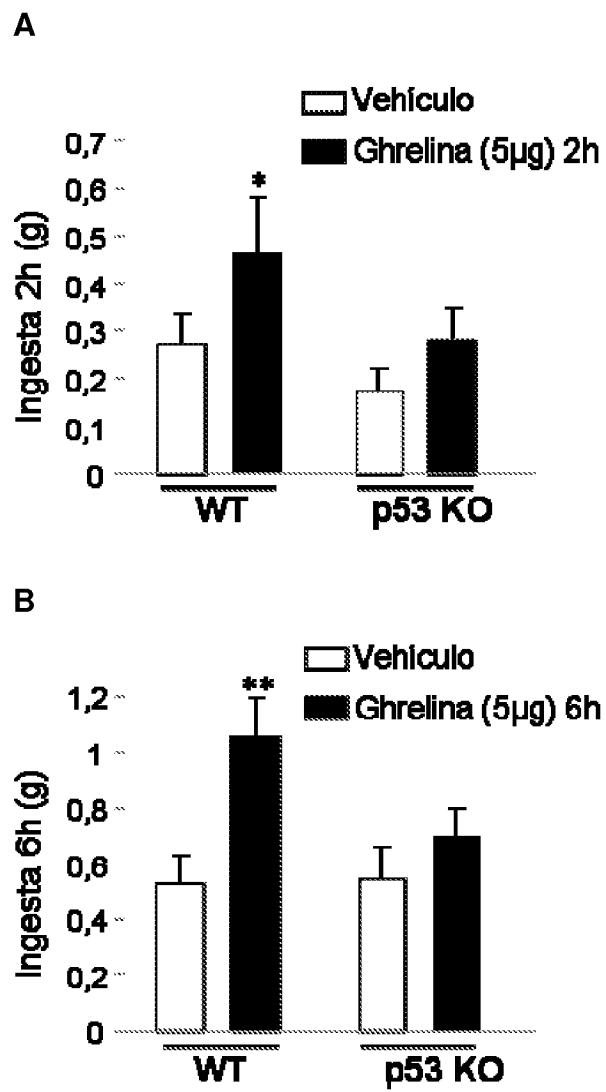
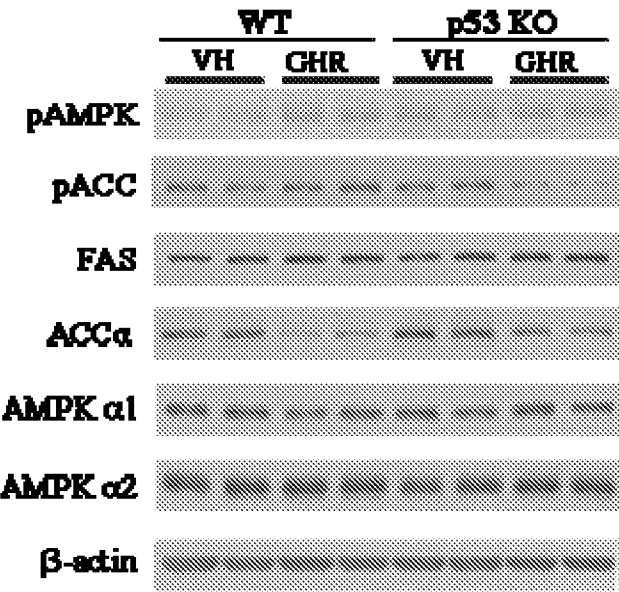


Figura 2

A



B

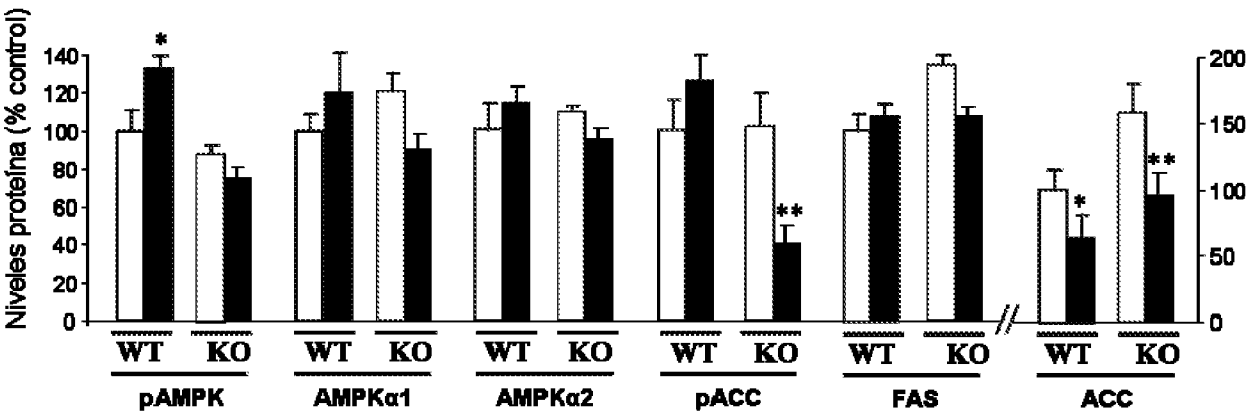


Figura 3

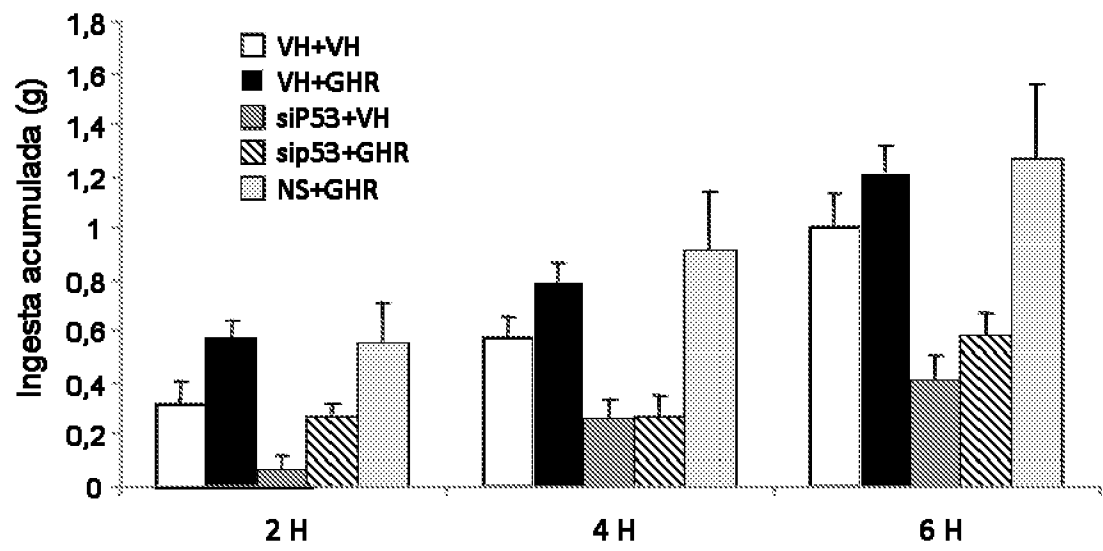


Figura 4

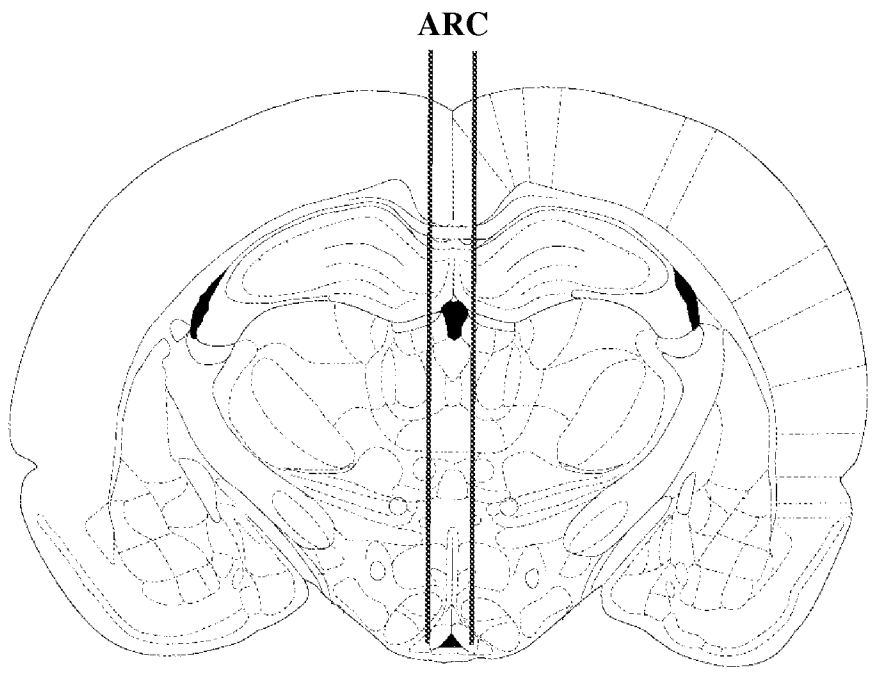
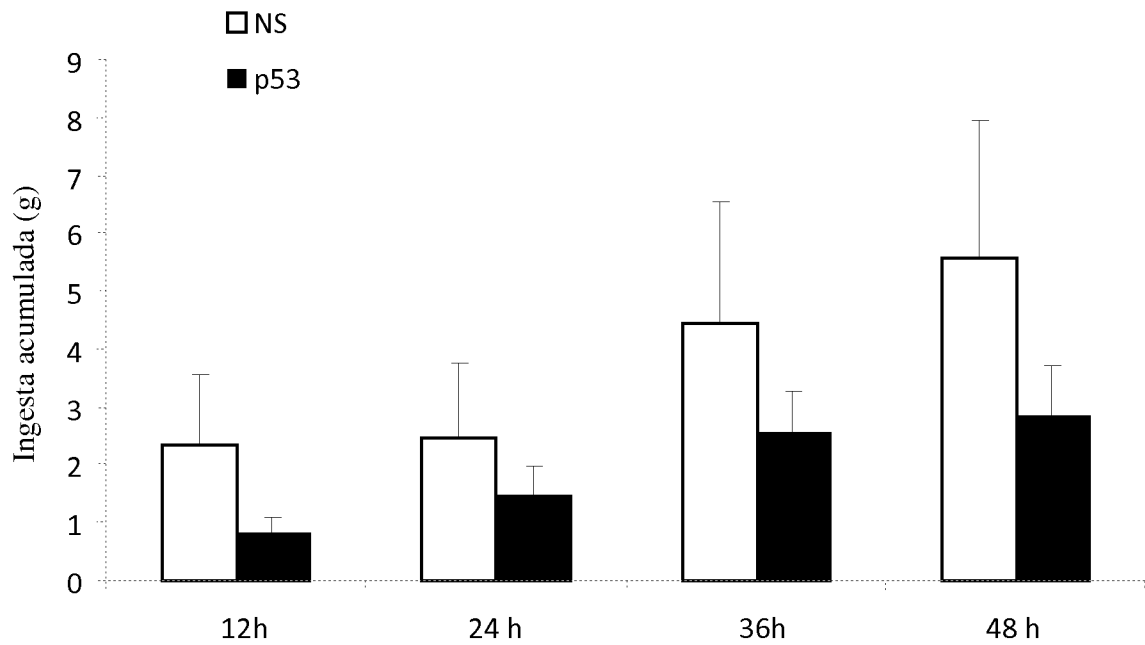
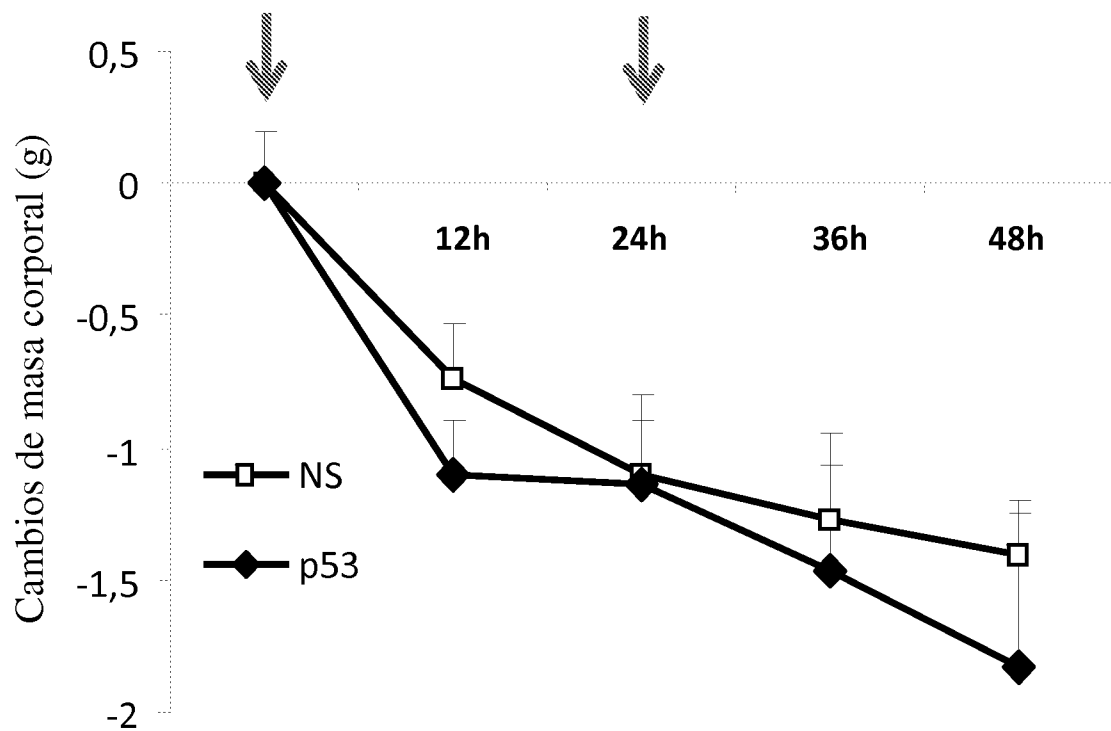


Figura 5**Figura 6**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBL-EBI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE, XPESP2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/092782 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 08.09.2006, the whole document.	1-22
A	WO 2008/075064 A1 (ASTRAZENECA AB) 26.06.2008, the whole document.	1-22
A	WO 2010/042868 A2 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 15.04.2010, the whole document.	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04/06/2012Date of mailing of the international search report
(07/06/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070111

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2006092782 A	08.09.2006	EP1858557 A EP20060711232 US2009131349 A	28.11.2007 23.02.2006 21.05.2009
----- WO2008075064 A	----- 26.06.2008	----- TW200833663 A CL38022007 A PE18362008 A AR064496 A US2009118332 A	----- 16.08.2008 22.08.2008 14.03.2009 08.04.2009 07.05.2009
----- WO2010042868 A	----- 15.04.2010	----- US2011262362 A	----- 27.10.2011
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070111

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7105 (2006.01)

A61K38/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P3/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/070111

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, EMBL-EBI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE, XPESP2

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2006/092782 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 08.09.2006, todo el documento.	1-22
A	WO 2008/075064 A1 (ASTRAZENECA AB) 26.06.2008, todo el documento.	1-22
A	WO 2010/042868 A2 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 15.04.2010, todo el documento.	1-22

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
04/06/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de junio de 2012 (07/06/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Coca

Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070111

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2006092782 A	08.09.2006	EP1858557 A EP20060711232 US2009131349 A	28.11.2007 23.02.2006 21.05.2009
----- WO2008075064 A	----- 26.06.2008	----- TW200833663 A CL38022007 A PE18362008 A AR064496 A US2009118332 A	----- 16.08.2008 22.08.2008 14.03.2009 08.04.2009 07.05.2009
----- WO2010042868 A	----- 15.04.2010	----- US2011262362 A	----- 27.10.2011
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/7105 (2006.01)

A61K38/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P3/04 (2006.01)