



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 358**

51 Int. Cl.:

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/455 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02721337 .0**

96 Fecha de presentación : **08.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1365762**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Método para incrementar los niveles de leptina usando compuestos de ácido nicotínico.**

30 Prioridad: **08.03.2001 US 274349 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es:
**University of Kentucky Research Foundation
207 Administration Building
Lexington, Kentucky 40506-0032, US
University of Arizona**

72 Inventor/es: **Jacobson, Elaine;
Jacobson, Myron, K. y
Kim, Hyuntae**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 315 358 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para incrementar los niveles de leptina usando compuestos de ácido nicotínico.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con el uso de derivados de niacina en la regulación de rutas moduladas de leptina. Específicamente, derivados de niacina, es decir, ésteres nicotinados, en particular el éster lauril nicotinado, estimula la producción de leptina, con ramificaciones como se discute infra.

10 **Antecedentes y técnica anterior**

La leptina, una proteína de 167 aminoácidos codificada por el gen *ob*, fue identificada en el curso de una investigación para la identificación de defectos moleculares en una cepa propensa a la obesidad, es decir, el ratón "ob/ob". Se ha encontrado que la leptina es producida en mayor parte en el tejido adiposo blanco, con cantidades muy pequeñas encontradas en el tejido adiposo marrón. Ejemplar de la literatura de patentes relacionada a esta molécula están Patentes U.S. Nos. 6,132,724; 6,124,448; 6,124,439; 6,068,976; 6,048,837 y 5,795,909.

Los primeros reportes sobre leptina sugerían que era una molécula señalizadora, derivada de adipocitos, que limitaba el consumo de alimento y aumentaba el gasto de energía, es decir, un "adiposat". La evidencia que respalda esto incluía observación de disminuciones en peso corporal, y control metabólico mejorado en roedores que evidenciaban obesidad inducida por genética o por dieta que fueron inyectados con leptina. En el caso de ratones ob/ob, que tienen mutaciones en el gen *ob*, que conduce a la síntesis de moléculas defectuosas de leptina que son degradadas intracelularmente, el efecto de la leptina es especialmente pronunciado. Los ratones ob/ob son obesos, diabéticos y estériles, y exhiben actividad, metabolismo y temperatura corporal reducidos. Adicionalmente, ratones ob/ob deficientes de leptina sufren de una curación de heridas seriamente retrasada. Ha sido mostrado que la leptina administrada sistémica o tópicamente mejora la re-epitelización de heridas en este modelo. Ver Frank, *et al.*, J. Clin. Invest. 106: 501-509 (2000). Como tal, el ratón ob/ob ha sido usado como sistema modelo para probar drogas por su habilidad para revertir la curación deficiente de heridas.

Adicionalmente al efecto en ratones con deficiencia de leptina, discutido *supra*, la leptina promovió marcadamente la reepitelización en ratones de tipo salvaje. Adicionalmente, el STAT 3 y el receptor activado de proliferador de peroxisoma (de ahora en adelante "PPAR"), que son los reguladores corriente abajo en la ruta de la leptina, están involucrados en la homeostasis de la piel. Ver Komuvres, *et al.*, J Invest. Dermatol 115:361-267 (2000). Se ha mostrado que el STAT 3 juega un papel importante en la remodelación de la piel, incluyendo la ciclización de los folículos pilosos y curación de heridas. También se sabe que activadores PPAR α normalizan la proliferación celular, incluyendo diferenciación epidermal, y aceleran el desarrollo de la barrera de permeabilidad epidermal. Ver Hanley, *et al.*, J. Clin. Inv. 100:705-712 (1997). Recientemente, ha sido demostrado que activadores PPAR α inhiben el desarrollo de tumor de piel de murina. Esto es consistente con el papel en la fisiología de la piel que tienen los PPAR α . Ver Thuillier, *et al.*, Mol. Carcinogenesis 29:134-142 (2000).

Posteriores investigaciones sobre la leptina han revelado que la molécula altera la transcripción de varios genes específicos adiposos involucrados en lipogénesis, lipólisis y metabolismo energético. También parece provocar apoptosis en tejido adiposo blanco. La mayoría de los efectos metabólicos de la molécula parecen resultar de interacciones específicas con receptores localizados en el sistema nervioso central, y en tejidos periféricos. El receptor ha sido identificado y es un receptor Clase I de citoquina que pertenece a una familia que incluye el receptor IL-2, receptor interferón y receptor de la hormona de crecimiento. En poco tiempo, el receptor de leptina transmite la señal de leptina a las tres moléculas STAT, STAT 3, 5, y 6, a las que nos referimos colectivamente como las "grasa-STATS."

La visión aceptada de la leptina es que su rol primario es prevenir la obesidad a través de la regulación de ingestión de alimento y termogénesis vía acción en los centros hipotalámicos. Evidencia reciente sugiere, sin embargo, que la leptina puede tener un papel adicional, es decir, puede exhibir actividad anti-esteatósica, en que la sobre-acumulación de ácidos grasos en tejido no-adiposo puede ser prevenida por regulación de β -oxidación mediada por leptina. La leptina incrementa las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y estimula una forma de lipólisis que no se había observado previamente, donde el glicerol es liberado sin liberación proporcional de ácidos grasos libres.

Varias isoformas de receptores de leptina son expresadas en todo el cuerpo sugiriendo que la leptina tiene funciones fisiológicas adicionales en el tejido extra-neural. Se han realizado estudios para evaluar la capacidad de respuesta tisular a la leptina, a través de la determinación de qué efectos, si los hay, tiene ésta en el metabolismo glucídico y lipídico, así como también la expresión de algunas enzimas. Si se observa algún efecto directo de la leptina en un tejido determinado, esto implica inducción rápida de mecanismos de transducción de señal, que fluyen de la unión hormona/receptor. Esencialmente el mecanismo de acción puede ser resumido como sigue: la leptina activa el STAT 3 en tejido adiposo, la unión de leptina con su receptor lleva a la oligomerización del receptor, y activación JAK, llevando sucesivamente a la fosforilación de STAT; STATS fosforilizados se dimerizan y se translocan dentro de núcleos, donde activan genes objetivo. En breve:

- (i) La leptina activa STAT 3, e incrementa la actividad PPAR α ;

- (ii) PPAR α /PPRE induce expresión apo A-I en células del hígado;
- (iii) STAT3/PPAR α es esencial para homeostasis de la piel;
- (iv) Activadores PPAR α inhiben el desarrollo de tumor de piel en ratones.

Véase, por ejemplo Bendinelli *et al.*, Mol. Cell Endocrin 168:11-20 (2000); Unger, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:2327-2332 (1992); Peters, *et al.*, J. Biol.Chem. 272:27307-27312 (1997); Hanley, *et al.*, J. Clin. Invest. 100:705-712 (1997); Sano, *et al.*, EMBOJ 18:4657-4666 (1999); Thuillier, *et al.*, Mol. Carcin 29:134-142 (2000).

Además de jugar un papel en la regulación de energía, la leptina también regula funciones endocrinas e inmunes. Los niveles de leptina incrementan agudamente durante infección e inflamación, y puede representar un componente protector de la respuesta del huésped a la inflamación. La deficiencia de leptina aumenta la sensibilidad a estímulos infecciosos e inflamatorios y es asociada con la desregulación de producción de citoquina. Ver Faggioni, *et al.*, FASEB J. 15:2565-2571 (2001).

Adicionalmente, se puede generar la hipótesis de que la ruta descrita *supra* también puede conducir a homeostasis y remodelación de la piel, lo cual sucesivamente conduce al desarrollo de la barrera epidérmica, curación de heridas, y crecimiento de cabello, al igual que la inhibición del desarrollo de tumor de piel causada por funciones inmunes incrementadas. Esto se resume en la figura 1.

La niacina es esencial para la formación de las coenzimas dinucleótido de nicotinamida (NAD), y fosfato de NAD (NADP), donde la fracción de nicotinamida actúa como un receptor de electrones o un donante de hidrogeno en muchas reacciones biológicas de reducción. Para elaborar, la NAD funciona como un portador de electrones para la respiración intracelular, y como una coenzima en la oxidación de moléculas de combustible. La NADP actúa como un donante de hidrógeno en biosíntesis reductiva, incluyendo la síntesis de ácidos grasos y esteroides. Como es el caso con NAD, también actúa como una coenzima.

La NAD es el sustrato para tres clases de enzimas que transfieren unidades de ADP-ribosa a proteínas involucradas en la reparación del ADN, diferenciación celular, y movilización celular de calcio.

Como es revelado en la Patente U.S. No. 5,612,382, derivados de niacina o ácido nicotínico pueden ser usados en composiciones para tratar enfermedades de la piel. El ácido nicotínico, en contraste con la nicotinamida, cuando se administra en dosis de 1.5-4 g/día mejora los perfiles sanguíneos de colesterol.

Acipimox, un análogo del ácido nicotínico y un agente hipolipodémico, disponible comercialmente, mostró aumentar los niveles de leptina en plasma en ratones transgénicos. Ver, por ejemplo, Worm, *et al.*, Eur. J. Endocrin 143:389-395 (2000).

Ha sido mostrado que los derivados de ácido nicotínico tienen eficacia en, *inter alia*, protección celular de la piel, reparación de ADN, etc. Ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 6,337,065, archivada Diciembre 1, 1999 a Jacobson, *et al.*. Esta aplicación describe varios derivados del ácido nicotínico, incluyendo un dodecil, o éster lauril de ácido nicotínico. Se muestra en la aplicación de patente PCT/US99/28446 que agentes pro-NAD tales como derivados de ácido nicotínico incluyendo ésteres tetradecil y octadecil de nicotinato pueden retrasar el proceso de deterioro que resulta del daño al ADN. Ahora se ha encontrado que tales ésteres de ácido nicotínico, como el lauril éster de ácido nicotínico, estimulan la producción de leptina hasta un punto no visto con la niacina. Como los ésteres de ácido nicotínico pueden ser formulados por ejemplo, como materiales apropiados para aplicación tópica, se provee un nuevo enfoque para la estimulación y producción de leptina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un mecanismo propuesto y ruta de efectos que se cree opera en la invención. Note que una línea llana significa que el estado del objetivo es inhibido. Por consiguiente, el efecto de la leptina en el desarrollo de tumor de piel es inhibición del tumor.

La Figura 2 resume datos relacionados con la producción de leptina en adipocitos *in vitro*.

La Figura 3 compara los resultados de experimentos diseñados para determinar los niveles de leptina en plasma en animales de prueba, después que se administró niacina en la forma de éster lauril de ácido nicotínico.

La Figura 4 presenta un resumen de datos generados por el trabajo del ejemplo 2, en el cual los niveles de leptina en suero fueron medidos. "NIA 114" es el éster lauril, mientras que "NIA 112" es el éster miristil.

La Figura 5 resume los resultados de experimentos diseñados para mostrar cambios en el tamaño de heridas después de la administración de ésteres de ácido nicotínico.

La Figura 6 expone resultados paralelos, en el cual fueron medidos los niveles de leptina en el suero de los ratones.

Descripción detallada de modalidades preferidas

Ejemplo 1

5 Ejemplo de referencia

El tejido adiposo es reconocido como la mayor fuente de producción de leptina en animales. Como tal, se diseñaron experimentos para determinar el efecto de la niacina en la producción de leptina en los adipositos.

10 Se obtuvieron adipositos humanos de acuerdo a los métodos estándar. En breve, se recolectaron preadipositos de tejido adiposo subcutáneo, seguido de tratamiento con collagenasa. Los preadipositos fueron cultivados sobre placa y se les permitió diferenciarse por 3 semanas, para formar adipositos.

15 Los adipositos fueron entonces incubados, en 0.6 ml de medio DMEM/F-10, al cual se le agrego albumina de suero bovino al 2%. Adicionalmente, los cultivos recibieron o no 0.1 mM de niacina.

Después de 24 horas, el medio de cultivo fue analizado para leptina, usando un equipo ELISA disponible comercialmente.

20 Los resultados, que son presentados en la figura 2, muestran que en los cultivos a los cuales se les adicionó niacina, la producción de leptina aumentó un 62%.

Ejemplo 2

25 Ratones hembra doblemente transgénicos apoB/CETP, obtenidos de un proveedor comercial, fueron divididos en 3 grupos, y se albergó a 6 animales por jaula. Un grupo sirvió como control, y recibió una dieta estándar, sin niacina añadida. Se afeitaron los lomos, y se aplicó loción la cual era idéntica a la loción aplicada al tercer grupo, como se describe infra, sin éster lauril nicotinato. Un segundo grupo recibió niacina, en la forma de su sal de sodio, disuelta en el agua de bebida a una concentración de 0.75% (0.63% de ácido libre). El consumo de niacina de los animales fue
30 estimado basado en el consumo de agua y fue aproximadamente 1400 mg/kg de peso corporal, basado en un consumo estimado de 23 ml de agua por 100 g de peso corporal, y un peso corporal promedio de 25 g. Esto es equivalente a aproximadamente 8.4 g/día para un humano de 70 kg. Ver Freireich, *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 50:219-144 (1966) incorporado por referencia. Para el tercer grupo, se afeitaron los lomos, y se aplicó el éster lauril nicotinato a las áreas afeitadas, vía 200 mg de loción, conteniendo 10% (p/p) del éster lauril nicotinato. La cantidad del éster aplicado es
35 aproximadamente 80-800 mg/kg, asumiendo de nuevo un peso promedio de 25 g. Usando Freireich, *supra*, esto es equivalente a una dosis desde aproximadamente 0.48 hasta aproximadamente 4.8 g/día/70 kg humanos. La loción fue aplicada diariamente por 13 semanas.

Los niveles de leptina en plasma fueron determinados usando un radioinmunoensayo de murina leptina disponible
40 comercialmente. El RIA fue realizado en muestras de sangre en ayunas (16 h) obtenidas del plexus retroorbital. Las muestras de sangre fueron recolectadas y centrifugadas a 2000xg por 15 minutos para asegurar plasma. Los resultados, resumidos en la figura 3, muestran que la niacina oral sí aumentó la cantidad de leptina circulante, sin embargo, el éster lauril nicotinato lo superó en términos de la cantidad de leptina circulante.

45 Ejemplo 3

Los experimentos descritos en el ejemplo 2 fueron continuados, en el experimento descrito en este ejemplo. Específicamente, ratones macho BALB/C fueron afeitados, desde las escapulas hasta las bases de la cola. Los animales sometidos recibieron entonces aplicación tópica de la loción de éster lauril nicotinato, descrita en el ejemplo 2, *supra*,
50 ó loción de éster miristil nicotinato, en variadas concentraciones. Los controles sólo recibieron el vehículo. La loción fue aplicada a una dosis de 4 ml/kg/ratón.

Se midieron los niveles de leptina en suero, como fue descrito, *supra*. Los resultados indican que los niveles de leptina en suero aumentaron un 45% en los animales sometidos que recibieron la loción de 10% de éster lauril nicotinato, mientras que el incremento para los animales sometidos que recibieron éster miristil nicotinato fue 57%
55 (para la formulación de 2%), y 77% (para la formulación de 5%). La Figura 4 presenta estos resultados.

Ejemplo 4

60 La relación de leptina con curación de heridas fue discutida *supra*. Esta correlación fue investigada en estos experimentos.

A los ratones se infligieron heridas de máximo espesor de aproximadamente 6 mm de diámetro, bajo anestesia (fenobarbital sódico). Después recibieron una aplicación tópica de loción éster nicotinato al 20%, todos los días, por
65 14 días. La dosificación fue de 100 µl por cada aplicación, con dos aplicaciones cada día. Como control, se usó la loción sin el éster. Se midió el diámetro de las heridas cada día.

ES 2 315 358 T3

Los resultados son presentados en la figura 5, la cual muestra que los ratones que recibieron las formulaciones que contenían éster nicotinato mostraron una reducción del grosor de la herida, a diferencia de los controles. El éster lauril fue el más efectivo con una reducción de 43%.

Cuando se midieron los niveles de leptina en suero, se encontró que los ratones que recibieron la aplicación de éster nicotinato tuvieron un aumento de 44% comparado a los controles. Estos resultados son representados en la figura 6.

Los ejemplos antes mencionados exponen varias características de la invención que incluyen, *inter alia*, ésteres de ácido nicotínico a ser usados en un método para la estimulación de la producción de leptina en un sujeto que necesite del mismo, administrándole a dicho sujeto una cantidad de éster de ácido nicotínico estimulante de leptina, donde la fracción de éster contiene de 8-22 átomos de carbono. Mas preferiblemente, este es un éster lauril de ácido nicotínico, aunque otros compuestos, tales como los descritos en la aplicación de patente citada *supra* también pueden ser usados. Son especialmente preferidos los ésteres de alquilo de ácido nicotínico, donde la fracción de éster contiene de 8-14 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos. Más preferiblemente, la fracción alquil contiene 12 átomos de carbono, más preferiblemente 14 átomos de carbono. Los sujetos sufren de una condición que puede ser aliviada por niveles aumentados de leptina, incluyendo aquellos expuestos en la figura 1, función inmune mejorada, epitelización de la piel, cicatrización de los folículos pilosos, inhibición de la formación de tumores, tales como la formación de tumor de piel, y así sucesivamente.

La forma en la que dicho éster de ácido nicotínico es administrado al sujeto puede variar. Se contemplan como administración tópica la oral, liberación con el tiempo, intravenosa, intradérmica, y otras formas de administración. Tal administración tópica puede ser mediante crema, loción, líquida, aerosol, baño corporal, enjuague bucal, pasta dental, intubación, u otras formas de administración tópica. Por ejemplo, en el caso de aplicación por liberación con el tiempo, pueden ser utilizados "parches" tales como el tipo usado en la liberación con el tiempo de nicotina, vendas, envolturas, y así sucesivamente.

Dicho éster de ácido nicotínico es administrado en una cantidad suficiente para estimular la producción de leptina. La dosis usada puede variar y variará; sin embargo, las formulaciones deben proporcionar, por ejemplo, dosis que oscilan desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 g/día/70 kg de peso corporal, más preferiblemente desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 7 g/día/70 kg de peso corporal, más preferiblemente desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 5 g/día/70 kg de peso corporal.

Como es indicado, *supra*, la estimulación de producción de leptina puede llevar, adicionalmente a los efectos asociados previamente con leptina, a la regresión de tumores de piel, homeostasis y remodelación de la piel, desarrollo de la barrera epidérmica, curación de heridas, y crecimiento del pelo.

Otras aplicaciones serán claras a los técnicos expertos y no es necesario elaborarlas aquí.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de ésteres de alquilo de ácido nicotínico para la preparación de un medicamento para incrementar los niveles de leptina en un sujeto que necesita del mismo para mejorar la cicatrización de heridas, crecimiento del pelo, desarrollo de la barrera epidérmica, homeóstasis y renovación de la piel, y la regresión de tumores de piel, donde la cantidad de alquil éster de ácido nicotínico es suficiente para aumentar los niveles de leptina en dicho sujeto, y donde la cadena alquil de dichos alquil ésteres de ácido nicotínico contiene desde 8 a 22 átomos de carbono.

10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha cadena alquilo contiene 8 a 14 átomos de carbono.

3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha cadena alquilo contiene 12 o 14 átomos de carbono.

15 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el medicamento comprende más de un éster de ácido nicotínico.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para administración tópica.

20 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para administración oral.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

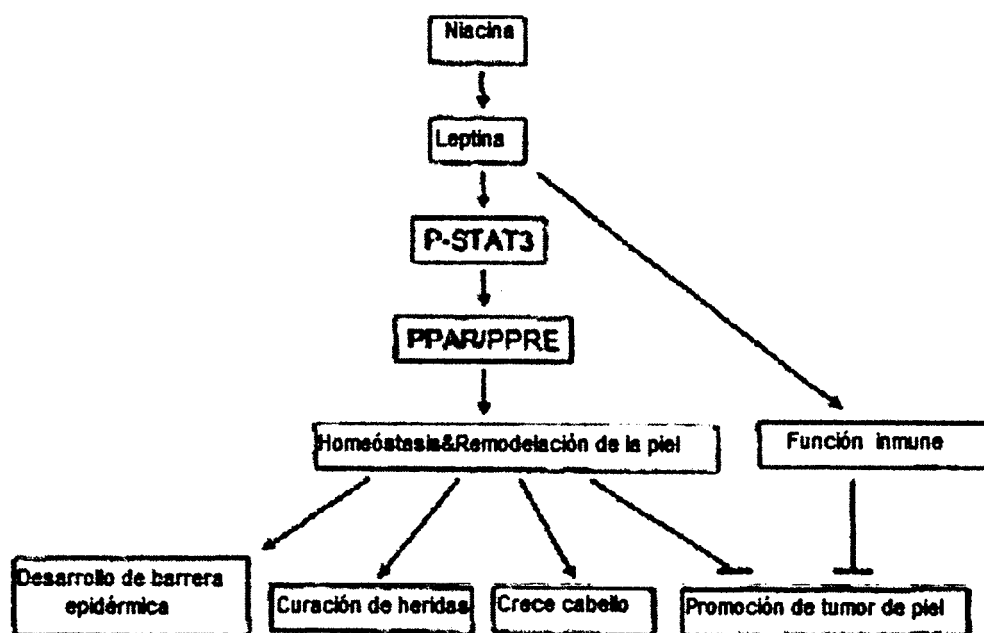


Figura 1

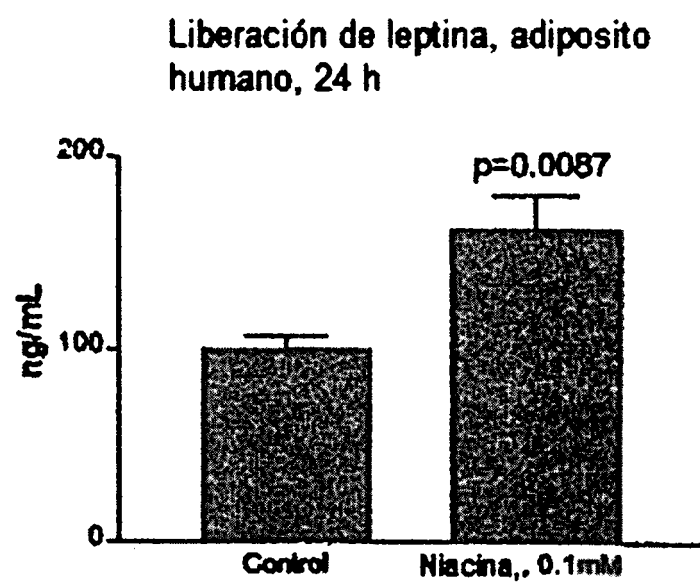


Figura 2

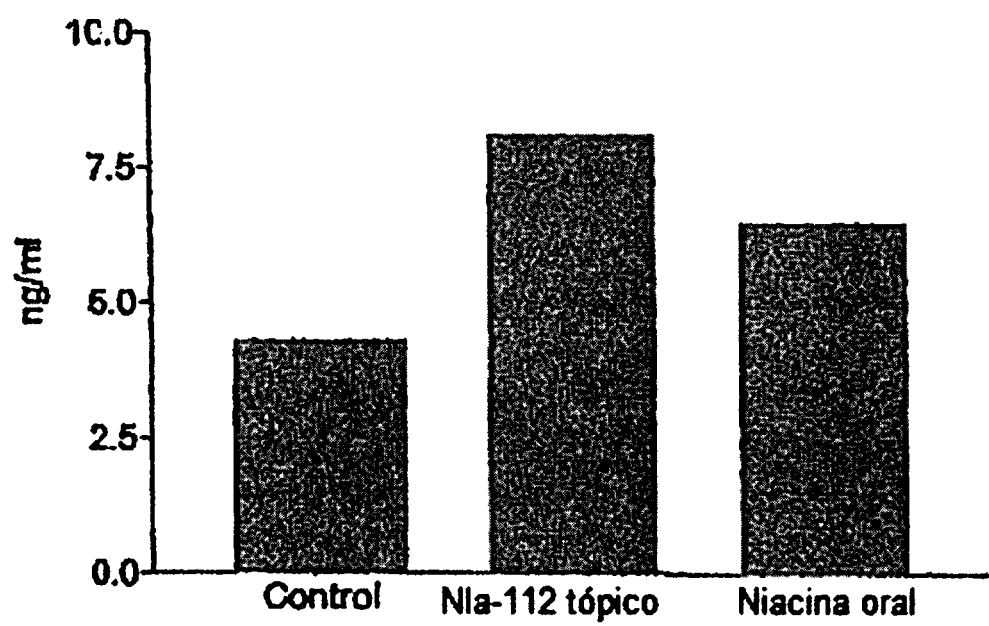


Figura 3

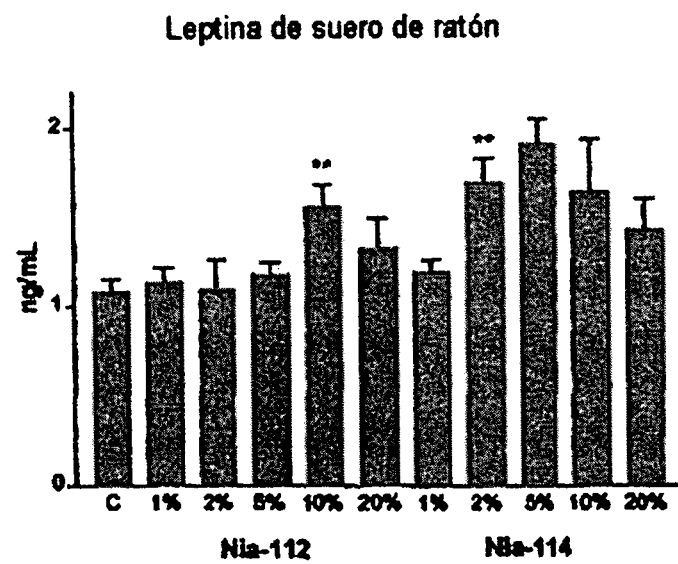


Figura 4

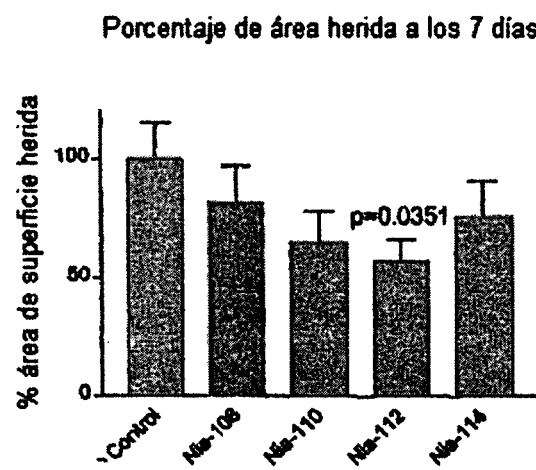


Figura 5

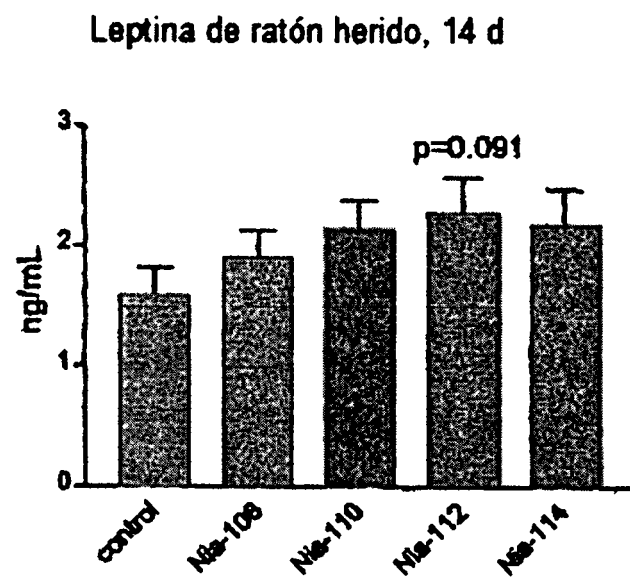


Figura 6