

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 249**

21 Número de solicitud: 201930530

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.06.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.12.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**MORANTE ORIA, Javier y
DOMÍNGUEZ CASTELLANO, María**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MODULACIÓN DEL RECEPTOR EGFR EN LA REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL**

57 Resumen:

Modulación del receptor EGFR en la regulación del peso corporal.

La presente invención se refiere al uso de un agente modulador del receptor de EGFR para regular el peso corporal de un sujeto, pudiendo incrementar o disminuir a voluntad la grasa corporal y el tamaño de dicho sujeto, lo que es de utilidad en el campo ganadería.

ES 2 799 249 A1

DESCRIPCIÓN

Modulación del receptor EGFR en la regulación del peso corporal

5 La presente invención se refiere al uso de un agente modulador de EGFR para regular el peso corporal de un sujeto, pudiendo incrementar o disminuir, a voluntad, la grasa corporal y el tamaño del sujeto, lo que es de utilidad en el campo de la ganadería. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la medicina y la veterinaria.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La pubertad es el momento en el cual un organismo obtiene la capacidad para llevar a cabo la reproducción o maduración sexual. La mayoría de los organismos multicelulares son incapaces de reproducirse tras su nacimiento (o tras la germinación, en el caso de las plantas), y dependiendo de la especie, puede tomar cuestión de días, 15 semanas o años hasta que su organismo llegue a un estadio apto para iniciar la pubertad.

El inicio de la maduración no sigue una edad cronológica determinada, sino que está 20 relacionado con el estado energético del cuerpo y el crecimiento. La aparición de la pubertad se ha relacionado estrechamente con la obtención de un cierto peso corporal o porcentaje de grasa corporal, más que con la edad cronológica.

Tanto en animales como en humanos, la desnutrición y la baja grasa corporal, o una 25 proporción alterada de masa magra con respecto a grasa corporal, retrasan el inicio de la pubertad o maduración. La pérdida de peso de entre el 10% y el 15% del peso normal en función de la altura, o en casos que la pérdida de peso sea debida a anorexia nerviosa, provocan retraso de la pubertad.

30 Por otro lado, en casos de sobrepeso y obesidad, el desarrollo de la pubertad se ve acelerado, demostrando que efectivamente, el peso y la grasa corporal es un indicador que regula el paso de la etapa de crecimiento a la etapa de maduración reproductiva o de pubertad, y donde dicha etapa comenzará cuando el animal posea suficientes reservas de energía para satisfacer las necesidades de dicha maduración.

35

Los estudios en insectos también han descrito que las larvas deben alcanzar una

cierta cantidad de masa corporal (peso crítico, CW "*Critical Weight*"), específica de la especie e influenciada de manera adaptativa por la nutrición, para que sea posible la metamorfosis. Una vez que las larvas de insectos superan el CW, se inicia la liberación de la hormona protoracicotrópica (PTTH) seguido por la secreción en la glándula protorácica (PG) de la hormona esteroidea ecdisona. La ecdisona desencadena el cese del crecimiento, el inicio de un desplazamiento deambulante y la pupación.

Por otro lado, la tendencia global de la sociedad es el aumento de la población, estimando que en 2050 la población mundial este alrededor de los 10.000 millones de habitantes. Esto impulsa el desarrollo de nuevas técnicas y mejoras de la obtención de alimentos, fundamentalmente de alimentos proteicos como carnes y lácteos, alimentos esenciales en la dieta humana.

Actualmente no hay muchas herramientas nutricionales para la mejora de la producción de carne tanto en ganadería como en granjas. En el ganado vacuno, por ejemplo, es habitual la práctica de la castración en la etapa de crecimiento. Otras técnicas para potenciar el crecimiento del ganado (ovino, porcino, bovino, etc.) incluyen la administración de aditivos/suplementos alimentarios para promover el engorde, tales como el empleo de macroalgas rojas marinas (AU2016415998A1), forraje formado por una mezcla de plantas alcalino-salinas (CN108935295), un extracto de maíz con un alto contenido de ácido felúrico (WO2013024368A1); la administración de agentes anabólicos, tales como zeranol, estradiol, estradiol benzoato, trenbolona, etc. (WO0025743A2); etc.

No obstante, es necesario desarrollar nuevas alternativas para aumentar la rentabilidad de las ganaderías y granjas y aumentar la producción de carne, factores primordiales para afrontar las necesidades alimentarias de la población mundial. Debido al papel fundamental del peso y grasa corporal en la madurez reproductiva o pubertad en animales, anteriormente descrito, es necesario encontrar alternativas de regulación del peso corporal para retrasar la entrada en la pubertad y evitar el cese de la etapa de crecimiento o engorde para entrar en la etapa reproductiva animal.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El presente documento describe como la proteína Spitz, un miembro de la familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) codificada por el gen *spi*/CG10334 (FlyBase ID: FBgn0005672; FB2019_02, *released* Apr 10, 2019), análoga de TGF- α (factor de crecimiento transformante alpha, en inglés “*Transforming Growth Factor Alpha*”) y
5 ligando del receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor* o ErbB-1), modula y/o regula la coordinación del estado energético y actúa como temporizador biológico para determinar la terminación de la etapa de crecimiento y comenzar la etapa de pubertad o maduración.

10 Mediante cribados de líneas transgénicas en *Drosophila melanogaster* de los genes que codifican proteínas con un péptido señal descrito, los inventores observaron que la silenciamiento del gen *spi* en la glándula protorácica inhibía completamente la metamorfosis, es decir, el inicio de la etapa de maduración, y las larvas se mantenían en la etapa juvenil con un crecimiento sostenido y una ingesta permanente hasta su
15 muerte a los 21-23 días aproximadamente. Por el contrario, la sobreexpresión de la forma activada del gen *spi* en la glándula protorácica, provocaba que las larvas dejaran de crecer, abandonaran la comida e iniciaran prematuramente la metamorfosis.

20 A la luz de estos resultados, los inventores proponen la implicación de la vía EGFR en la modulación o regulación del peso corporal del sujeto, de la ingesta de comida o el apetito y del inicio de la madurez o pubertad en un sujeto. La activación de la vía EGFR comprende la activación del receptor EGFR a través de Spitz o un análogo de Spitz, ligandos de dicho receptor EGFR, desencadenando la disminución del apetito y
25 la ingesta de alimentos y, por tanto, la disminución del peso corporal. Por el contrario, la inhibición de la vía EGFR implica el aumento del apetito y del peso corporal.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un agente modulador del receptor EGFR para usarlo en el tratamiento de la regulación del peso
30 corporal en un sujeto, de aquí en adelante “uso de la invención”.

El receptor EGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico es un receptor de la superficie celular que es activado por ligandos EGF (factor de crecimiento epidérmico). El receptor EGFR es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia
35 relacionada con los receptores tirosina quinasa: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2),

Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4). Tras la activación del EGFR, este sufre una transición de una forma monomérica inactiva a una forma homodimérica activa. La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa produciendo la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina en el dominio C-terminal del EGFR. Esta auto-fosforilación provoca la activación en cascada y la señalización por otras proteínas iniciando cascadas de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular.

10 Mediante agentes moduladores del receptor EGFR, es decir, mediante la modulación de la vía EGFR, los inventores han regulado el estado energético, el apetito y el peso corporal en un sujeto.

El término “modulación” hace referencia a la capacidad del agente modulador para afectar a la actividad biológica y/o la función bioquímica del receptor EGFR, es decir, para cambiar las propiedades funcionales de dicho receptor o de unión con sus ligandos o para bloquear dichos ligandos.

El término “agente modulador de EGFR” se refiere a cualquier molécula y/o compuesto capaz de cambiar, modificar, inhibir, bloquear, activar, potenciar o aumentar la actividad del receptor EGFR o la interacción o unión a sus ligandos. La actividad del receptor EGFR puede modularse a diferentes niveles:

- (1) controlando la expresión del gen que codifica el receptor EGFR, es decir, controlando la transcripción del gen o la traducción del ARN mensajero del receptor EGFR,
- (2) controlando la expresión del gen que codifica los ligandos del receptor EGFR, es decir, controlando la transcripción del gen o la traducción del ARN mensajero de dichos ligandos, y/o
- (3) bloqueando/activando la unión o interacción entre el receptor EGFR y cualquiera de sus ligandos.

En la presente invención, mediante el uso de dichos agentes moduladores del receptor EGFR, se regula el peso corporal de un sujeto, donde la expresión “regulación del peso corporal” se refiere a modificar, controlar o graduar la masa grasa y/o la masa muscular de un sujeto, controlando la saciedad o el apetito y la ingesta de alimentos.

La regulación del peso corporal de un sujeto comprende (i) el aumento del peso corporal mediante el aumento del apetito y la ingesta de alimentos o, por el contrario, (ii) la disminución del peso corporal mediante la eliminación del apetito y el cese de la ingesta de alimentos. Así, los inventores han descubierto que si la vía EGFR es inhibida o bloqueada mediante antagonistas del receptor EGFR, el peso corporal del sujeto aumenta, mientras que, si la vía EGFR es activada mediante agonistas del receptor EGFR, el peso corporal del sujeto disminuye.

10 Por lo tanto, en una realización preferida el agente modulador del receptor EGFR es un agonista del receptor EGFR.

En la presente invención, el término “agonista del receptor EGFR” se refiere a una molécula, de cualquier naturaleza química o biológica, capaz de unirse y de interactuar con el receptor EGFR, situado en la membrana celular, y de potenciar, aumentar, facilitar, estimular, inducir o activar la vía EGFR, desencadenando la dimerización de receptores EGFR y la auto-fosforilación de las tirosinas, iniciando así una cascada de transducción de varias señales que genera una respuesta celular que conduce a la regulación del peso corporal.

20 En una realización más preferida, el agonista del receptor EGFR es Spitz o un análogo de Spitz.

Spitz es una proteína de *D. melanogaster*, la mosca de la fruta, que es el principal factor de crecimiento y activador del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Spitz se produce como proteína transmembrana en el retículo endoplasmático. Allí se asocia con un receptor de carga denominado *Star* y es conducido al aparato de Golgi donde es escindido por una proteasa llamada *Rhomboid*, que libera a Spitz para ser secretado a través de la membrana celular al exterior de la célula para poder unirse posteriormente a los receptores EGFR localizados en la superficie de otras células.

La proteína Spitz, o “Spitz”, es codificada por el gen spi/CG10334 (citado más arriba) que se encuentra en el cromosoma 2L de *Drosophila melanogaster*, con número de acceso FlyBase ID: FBgn0005672; FB2019_02, released Apr 10, 2019 [número de acceso

a GenBank NT_033779 Región: complement (19567900..19577315), versión NT_033779.5, SEQ ID NO: 11]. Como consecuencia del splicing, a partir de esta secuencia se generan 4 ARN mensajeros que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos: SEQ ID NO: 2 (número de acceso NCBI: NM_057561 VERSION NM_057561.6), SEQ ID NO: 3 (número de acceso NCBI: NM_134291 VERSION NM_134291.5), SEQ ID NO: 4 (número de acceso NCBI: NM_134292 VERSION NM_134292.3) y SEQ ID NO: 5 (número de acceso NCBI: NM_134293 VERSION NM_134293.3). A pesar de ser diferentes en su secuencia de nucleótidos, estos ARNm codifican la misma proteína.

10

En particular, la proteína Spitz comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (número de acceso NCBI: NP_001027281 VERSION NP_001027281.1) correspondiente a la isoforma G de la proteína Spitz:

MHSTMSVQHGLVALVLIGCLAHPWHVEACSSRTVPKPRSSISSMSGTALPPTQAPV
 15 TSSTTMRTTTTTTPRPNITFPTYKCPETFDAWYCLNDAHCFVAVKIADLPVYSCECAIGF
 MGQRCEYKEIDNTYLPKRPRPMLEKASIASGAMCALVFMLFVCLAFYLRFEQRAAKKA
 YELEQELQQEYDDDDGGQCECCRNRCPPDGQEPVILERKLPYHMRLEHALMSFAIRR
 SNKL

20 En el contexto de la presente invención, también están contempladas dentro del término "Spitz" aquellas proteínas que aun presentando pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, pueden desempeñar la misma función que Spitz. Por lo tanto, dentro de la presente invención también se engloban variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia SEQ ID
 25 NO: 1. Así, en una realización particular, Spitz comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. En otra realización más particular, Spitz comprende una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

Las variantes funcionalmente equivalentes pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia, siempre y cuando estas mutaciones no afecten a su funcionalidad. Por lo tanto, las sustituciones preferiblemente corresponden a sustituciones conservativas.

Ensayos para identificar variantes funcionalmente equivalentes a Spitz se pueden encontrar en el Ejemplo de la presente descripción.

5 En la presente invención, se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante
10 algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Como entiende el experto en la materia, todas las proteínas que comprenden una secuencia de
15 aminoácidos que presenta una identidad de, al menos, un 70% con una secuencia de referencia, y que presentan la misma función que la proteína Spitz, son variantes funcionalmente equivalentes de la proteína de la invención, y todas ellas pueden usarse en el tratamiento de la regulación del peso corporal en un sujeto.

20 En la presente invención también se contempla como agentes moduladores del receptor EGFR a los análogos de Spitz para regular el peso corporal de un sujeto.

El término “análogo de Spitz” utilizado en el presente documento se refiere a un compuesto, químico o biológico, preferiblemente un factor de crecimiento, que tiene
25 una estructura y/o función similar a la proteína Spitz, es decir, que tienen propiedades físicas, químicas, bioquímicas y/o farmacológicas similares o que tienen una estructura terciaria o conformación tridimensional similar. Tanto Spitz como los análogos de Spitz son agonistas del receptor EGFR, es decir, son capaces de activar la vía EGFR y regular el peso corporal.

30

En otra realización aún más preferida el análogo de Spitz se selecciona de la lista que consiste en: TFG- α (*Transforming Growth Factor-alpha*), AR (*Amphiregulin*), BTC (*Betacellulin*), HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*), EREG (*Epiregulin*), EPGN (*Epigen*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*), Gurken, Vein y Keren.

35

En otra realización aún más preferida de la invención, el análogo de Spitz es TGF- α .

El término "TGF- α " o "Factor de crecimiento epidérmico alfa" se refiere, en la presente invención, a un factor de crecimiento y transformación celular, asociado al receptor
5 EGFR, que activa la vía de señalización de proliferación, diferenciación y desarrollo celular en mamíferos. Es un polipéptido perteneciente a la familia de los factores de crecimiento epidérmicos. En humanos, TGF- α presenta la secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 6 (número de acceso NCBI: NP_003227 VERSION NP_003227.1, correspondiente a la isoforma 1 de la proteína TGF- α). No obstante, dentro de la
10 presente invención, se contemplan variantes funcionalmente equivalentes de la SEQ ID NO: 6, es decir, todas aquellas variantes de la TGF- α que, aunque presentan variaciones en la secuencia de aminoácidos, desempeñan la misma función. Así, en una realización preferida, el TGF- α de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 74, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,
15 97, 98 o 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 6. En otra realización más particular, el TGF- α comprende una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 6. El término "Identidad" o "identidad de secuencia" ha sido definido en párrafos anteriores de la presente descripción.

20 En otro contexto de la presente invención, también están contempladas dentro del término "TGF- α " aquellas proteínas que son isoformas de TGF- α , es decir, diferentes formas de la misma proteína generadas por genes relacionados, o por el mismo gen a través del proceso de *splicing* alternativo. Las isoformas de TGF- α se seleccionan de la lista que consiste en: isoforma 2 con número de acceso NCBI: NP_001093161
25 VERSION NP_001093161.1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, isoforma 3 con número de acceso NCBI: NP_001295087 VERSION NP_001295087.1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, e isoforma 4 con número de acceso NCBI: NP_001295088 VERSION NP_001295088.1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

30

En una realización preferida de la presente invención, mediante el uso de los agonistas del receptor EGFR, descritos anteriormente, se activa la vía EGFR desencadenando la regulación del peso corporal hacia la disminución del peso o crecimiento del sujeto, es decir, la disminución o reducción de la masa grasa o de la
35 masa muscular del sujeto, y la disminución del apetito y el cese de la ingesta de

alimentos.

Sin embargo, la regulación del peso corporal de un sujeto no sólo comprende la disminución del peso corporal mediante la activación de la vía EGFR, sino también el
5 aumento del peso corporal, el aumento del apetito y la ingesta de alimentos mediante la inhibición de la vía EGFR con el uso de antagonistas del receptor EGFR.

Así, en otra realización preferida de la presente invención el agente modulador del receptor EGFR es un antagonista del receptor EGFR.

10

En la presente invención, el término “antagonista”, “inhibidor” o “bloqueante”, usados indistintamente, se refieren a una molécula y/o compuesto, de cualquier naturaleza química o biológica, capaz de bloquear, inhibir, suspender, disminuir, impedir y/u obstaculizar la actividad biológica o bioquímica del receptor EGFR o la interacción con
15 su ligando, y por tanto, inhibir la vía EGFR, ocasionando un aumento o incremento del peso corporal del sujeto, al contrario de lo que ocurre cuando se activa la vía EGFR descrito anteriormente en la presente invención.

En otra realización más preferida, el antagonista del receptor EGFR se selecciona de
20 la lista que consiste en un anticuerpo, un aptámero, una ribozima, una secuencia de ácido nucleico antisentido, un ARNi y un inhibidor de un agonista de EGFR.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier agente de unión inmunológico tal como, pero sin limitarse a, IgG, IgM, IgA,
25 IgD e IgE o anticuerpo quimérico que permite el bloqueo del receptor EGFR o del ligando de dicho receptor, inhibiendo así la vía EGFR. El término “anticuerpo” también se utiliza para hacer referencia a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tenga una región de unión a un antígeno, e incluya fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena
30 única), y similares. Las técnicas para preparar y utilizar diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos se conocen bien en el estado de la técnica.

Un anticuerpo “quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma se modifica, se reemplaza o se intercambia de
35 manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se enlace a una región

constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o modificada, o una molécula totalmente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se modifica, se reemplaza o se intercambia con una región variable que tenga una especificidad del antígeno diferente o alterada.

El término “aptámero” se refiere, tal como se utiliza en la presente invención, a oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Generalmente son obtenidos mediante su selección desde genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, mediante el método SELEX (de sus siglas en inglés Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), que permitirá seleccionar aquel oligonucleótido de la genoteca utilizada que se une con más afinidad al receptor EGFR o a un ligando de dicho receptor, para inhibir la vía EGFR. Existe también un tipo de aptámeros basado en cadenas peptídicas, diseñados para interactuar con otras proteínas dentro de las células que permitiría interferir en la función biológica del receptor EGFR.

El término “ribozima” se refiere, tal como se utiliza en la presente invención, a moléculas de ARN catalítico con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico de cadena única, tal como el ARNm, para el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas pueden utilizarse para escindir de forma catalítica transcritos de ARNm para de este modo inhibir la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Las moléculas de ribozimas específicas para el receptor EGFR o para un ligando de dicho receptor, para inhibir la vía EGFR pueden ser diseñadas, producidas y administradas mediante métodos comúnmente conocidos en el estado de la técnica.

El término “ácido nucleico antisentido” se refiere a oligonucleótidos, es decir, pequeños fragmentos de ácidos nucleicos antisentido, es decir, complementarios para la secuencia específica del ARN mensajero del gen del receptor EGFR o de un ligando de dicho receptor, que evitan la producción del receptor EGFR o de su ligando. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a todo o a parte de un ácido nucleico sentido, por ejemplo, complementario a la cadena de codificación de una

molécula de ADNc de doble cadena o complementario a una secuencia de ARNm, y que interfiere con la traducción del ARNm diana. Un ácido nucleico antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. En particular, las moléculas de ARN antisentido son
5 habitualmente de 18-50 nucleótidos de longitud.

Un ácido nucleico antisentido para su uso descrito en la presente invención puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de ligamiento enzimático, utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica. En particular, puede sintetizarse
10 químicamente ARN antisentido, producido por transcripción in vitro a partir de moldes lineales (por ejemplo, productos de PCR) o circulares (por ejemplo, vectores virales o no virales), o producido por transcripción in vivo a partir de vectores virales o no virales.

15 El término "ARNi" o "ARN de interferencia" se refiere, en la presente invención, a pequeñas moléculas de ARN de unos 20-30 nucleótidos capaces de silenciar genes de manera específica, es decir, regular por disminución la expresión de la proteína establecida como diana, en esta invención, el receptor EGFR o de un ligando de dicho receptor.

20

El término "inhibidor de un agonista de EGFR" se refiere, en la presente invención, a una molécula y/o compuesto capaz de bloquear, inhibir, suspender, disminuir, impedir y/u obstaculizar la actividad biológica o bioquímica de los agonistas del receptor EGFR, impidiendo que se unan o interaccionen con el receptor EGFR y, por tanto,
25 impidiendo así la activación de la vía EGFR.

En una realización preferida, el antagonista del receptor EGFR es un inhibidor de un agonista de EGFR. El término "agonista de EGFR", así como ejemplos de agonistas de EGRF, han sido definidos/explicados anteriormente en la presente descripción.

30

En una realización más preferida, el inhibidor de un agonista de EGFR es un inhibidor de Spitz o un inhibidor de un análogo de Spitz. Los términos "Spitz" y "análogo de Spitz" ya han sido descritos anteriormente en la presente invención. En una realización preferida, Spitz comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un
35 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. Tanto la secuencia SEQ ID NO: 1

como el término “identidad” han sido explicados en párrafos anteriores.

En otra realización preferida, el antagonista del receptor EGFR es un ARNi.

5 En una realización más preferida, el ARNi se selecciona de la lista que consiste en una molécula de ARN pequeño de interferencia (ARNip), de ARN de doble cadena o bicatenario (ARNbc), de ARN de cadena única o monocatenario (ARNmc), de micro ARN (miARN), de ARN de horquilla corto (ARNhc), y cualquier combinación de las mismas.

10

En otra realización aún más preferida, el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 10 [número de acceso VDRC (*Vienna Drosophila Resource Center*) librería GD 3922]:

15 CGATGTTGGA GAAGGCGAGC ATTGCCAGTG GAGCCATGTG TGCCCTGGTA TTTATGCTGT
 TTGTCTGCCT GGCCTTCTAT TTGCGCTTCG AGCAGCGGGC TGCCAAGAAG GCCTACGAAC
 TGGAGCAGGA ACTGCAGCAG GAATACGACG ATGACGACGG CCAGTGCGAG TGCTGCCGCA
 ACCGGTGCTG TCCAGATGGC CAGGAGCCAG TCATTCTGGA GCGCAAGCTA CCCTACCACA
 TGCGGCTGGA GCACGCGCTA ATGTCCTTCG CCATTGACG C

20

Algunos ejemplos, sin limitar, de antagonistas o inhibidores del receptor EGFR conocidos en el estado de la técnica se seleccionan de la lista que, sin limitar, consiste en: *Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Cetuximab, Neratinib, Osimertinib, Panitumumab, Vandetanib, Necitumumab* y *Dacomitinib*.

25

Mediante los antagonistas del receptor EGFR, anteriormente descritos a lo largo de la presente descripción, se inhibe la unión o interacción ligando-receptor, bloqueando e inhibiendo la vía EGFR en donde se ocasiona el aumento del peso corporal, el aumento del apetito y el aumento de la ingesta de alimentos.

30

Por tanto, en otra realización preferida, mediante el uso de antagonistas del receptor EGFR el peso corporal es regulado hacia el aumento del peso o el crecimiento del sujeto.

35 La presente invención va dirigida, como se ha explicado anteriormente, a regular el peso corporal de un sujeto, ya sea hacia el aumento o la disminución del peso

corporal.

En el contexto de la presente invención se entiende por “sujeto” o “individuo” a cualquier animal, de cualquier raza, sexo o edad. En una realización preferida, el
5 sujeto es un vertebrado.

El término “vertebrado” se refiere en la presente invención a los animales que tienen esqueleto óseo, huesos internos o cartilagosos. Se pueden agrupar en cinco grupos: mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios. Preferiblemente, en la presente invención
10 se regula el peso corporal de mamíferos o aves mediante el uso de un agente modulador del receptor EGFR. Los términos “agente modulador”, “receptor EGFR” han sido definidos en párrafos anteriores.

En otra realización particular, el vertebrado es un mamífero o un ave.
15

El término “mamífero” se refiere a animales vertebrados amniotas homeotermos (de “sangre caliente”), es decir capaces de regular la temperatura de su cuerpo para que se mantenga constante independientemente de la temperatura del medio en el que se encuentren. Poseen glándulas mamarias productoras de leche con las que alimentan a
20 sus crías y la mayoría de animales pertenecientes a los mamíferos son vivíparos (nacen del vientre materno). Pueden ser herbívoros, carnívoros u omnívoros.

El término “ave” se refiere a animales vertebrados amniotas homeotermos que caminan, saltan o se mantienen sobre las extremidades posteriores, mientras que las
25 extremidades anteriores han evolucionado hasta convertirse en alas que les permiten, en la mayoría de los casos, volar. Tienen el cuerpo cubierto de plumas y para reproducirse ponen huevos que incuban hasta su eclosión.

En otra realización todavía más preferida, tanto el mamífero como el ave son animales
30 de granja.

El término “animal de granja” se refiere a animales que han sido domesticados por el ser humano para ayudarse de la fuerza de dichos animales en el trabajo, o para alimentarse de su carne, leche o huevos.
35

En una realización aún más preferida, el animal de granja mamífero es seleccionado de la lista que consiste en vaca, cerdo, oveja, conejo, cabra, caballo, llama, buey, asno, toro y liebre.

- 5 En una realización aún más preferida el animal de granja ave se selecciona de la lista que consiste en gallina, gallo, pollo, ganso, pavo, pato, oca, faisán, codorniz y perdiz.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso no terapéutico de un agente modulador del receptor EGFR para regular el peso corporal de un sujeto o para
10 promover el crecimiento de un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento para promover el crecimiento de un sujeto que comprende la administración de un agente modulador del receptor EGFR a dicho sujeto.

15

Los términos “agente modulador”, “receptor EGFR” “regulación”, “sujeto”, etc., han sido definidos en párrafos anteriores y son aplicables a los presentes aspectos inventivos. Asimismo, todas las realizaciones particulares descritas para el uso de la invención también son aplicables a los dos aspectos inventivos anteriores.

20

Como entiende el experto en la materia, el agente modulador del receptor EGFR puede estar comprendido dentro de una composición para su administración a un sujeto.

- 25 Dicha composición, además del agente modulador del receptor EGFR, puede comprender otros compuestos útiles en la regulación del peso corporal del sujeto como son, sin limitarse a, hormonas, vitaminas, suplementos ricos en fibras, etc.

Asimismo, la composición puede administrarse al sujeto por cualquiera de las rutas de
30 administración conocidas por en el estado de la técnica. Ejemplos de dichas rutas de administración incluyen, sin limitarse a, ruta parenteral, oral, nasal, tópica e intraperitoneal entre otras.

Opcionalmente, la composición también puede comprender un vehículo o un
35 excipiente farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "soporte farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "solvente farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, 5 recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales soportes y vehículos en sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los vehículos aceptables, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para el sujeto a las dosis y concentraciones empleadas, e 10 incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencilico; alquil para benos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos 15 de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 aminoácidos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales 20 como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

El agente modulador del receptor EGFR puede estar en la composición de la invención 25 en una cantidad terapéuticamente efectiva. El término "una cantidad terapéuticamente efectiva", en el contexto de la presente invención, se refiere a la cantidad del agente modulador que se requiere para incrementar el peso corporal en un sujeto. La cantidad de agente modulador a administrar dependerá del sujeto a ser tratado (si es un mamífero o un ave), así como su peso del sujeto, su edad, y la alimentación que 30 recibe. En función de estos parámetros, es práctica de rutina para el experto en la materia calcular la cantidad terapéuticamente efectiva para que el agente modulador de la invención ejerza su efecto.

35

Método de la invención

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para regular el peso corporal de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un agente modulador del receptor EGFR, de aquí en adelante denominado "método de la invención", en donde

5 (i) si el agente modulador es un agonista del receptor EGFR, preferiblemente el agonista es Spitz o un análogo de Spitz, entonces el peso corporal del sujeto disminuye,

(ii) si el agente modulador es un antagonista del receptor EGFR entonces el peso corporal del sujeto aumenta.

10

Los términos "agente modulador", "agonista", "antagonista", "Spitz", "análogo de Spitz", "regulación", "sujeto", etc., han sido definidos en párrafos anteriores y son aplicables a los presentes aspectos inventivos. Asimismo, todas las realizaciones particulares descritas para el uso de la invención también son aplicables al método de la invención.

15

Otro aspecto de la invención, hace referencia a una composición que comprende el modulador del receptor EGFR, de acuerdo con el método de la presente invención, y al menos uno o más adyuvantes para la regulación del peso corporal de un sujeto.

20 Los adyuvantes, que pueden ser utilizados en dichas composiciones por los expertos en el estado de la técnica, son sustancias utilizadas en las composiciones para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en la misma hasta un determinado volumen o peso para facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o proporcionar a la composición consistencia y forma.

25 Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender uno o más adyuvantes y/o excipientes. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de proporcionarle consistencia o proveerla de sabores que la hagan más

30 agradable. Por tanto, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes enlazados entre sí, tal como por ejemplo en el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de dar color, la función de proteger la composición, tal como por ejemplo, aislarla del aire y/o la humedad, la función de rellenar un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de presentación,

35 una función disgregante para facilitar la disolución de los componentes y su absorción

en el intestino, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

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

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. (A) Representación esquemática del período embrionario y de los 3 estadios larvarios de *Drosophila melanogaster* durante los ensayos llevados a cabo en la presente invención: (1) animal control, (2) animal con silenciamiento del gen *spi*, (3) animal con sobreexpresión del gen *spi*. El inicio de la metamorfosis se desencadena por un pulso alto de la hormona ecdisona (E) (producida por la glándula protorácica) en ausencia de la hormona juvenil (JH) (producida por el cuerpo allatum). Se detectan varios títulos pequeños de β -ecdysone activa en la hemolinfa entre el logro del peso crítico de ~ 0,76 mg a aproximadamente 80-84 horas a 25°C en animales control *phm-Gal4* y el inicio del comportamiento errante (sin alimentación). L1, larva de primer estadio, L2, larva de segundo estadio y L3, larva de tercer estadio. ICG: intervalo del cese de crecimiento. **(B)** En comparación con las larvas control (*mir-8>*), el silenciamiento del gen *spi* por ARNi (*mir-8>UAS-spi-IR*) mantuvieron a los animales en la etapa de alimentación hasta su muerte (~ 21–25 días; se muestran las larvas representativas a los 12 días *after egg laying* (AEL)). **(C)** En comparación con las larvas control (*phm>*), el silenciamiento del gen *spi* por ARNi específicamente en la glándula protorácica (*phm> spi-IR*) mantuvieron a los animales en la etapa de alimentación hasta su muerte (~ 21–25 días; se muestran las larvas representativas a los 12 días AEL). Por el contrario, las larvas con sobreexpresión del gen *spi* (*phm>UAS-sSpi*) cesan el crecimiento antes de alcanzar el peso crítico y mueren prematuramente en el segundo estadio larvario (L2). En comparación con las larvas con sobreexpresión de sSpi, la sobreexpresión de la forma activa de la proteína Spitz sin el sitio de palmitoylación (sSpiCS) (*phm>UAS-sSpiCS*) mantuvo a los animales en la etapa de alimentación hasta su muerte (~ 21–25 días; se muestran las larvas representativas a los 12 días AEL). **(D)** Muestra el sobrepeso (mg) de larvas con

silenciamiento genético de *spi* en la glándula protorácica utilizando *phm-Gal4* (*phm>UAS-spi-IR*) en comparación a larvas control (*phm>*). **(E)** Ensayo de ingesta de comida coloreada en larvas con silenciamiento de *spi* en la glándula protorácica utilizando *phm-Gal4* (*phm>UAS-spi-IR*). P: pupa, L3F: larva en fase alimenticia, L3W: larva errante.

FIG. 2. **(A)** Imagen de súper resolución de la glándula protorácica control sobreexpresando secGFP bajo el control del promotor específico *phm>* en larvas control a las 112 horas AEL. **(B y C)** Acumulación de secGFP en la glándula protorácica de una larva con silenciamiento genético de *spi* en la glándula protorácica (*phm>UAS-secGFP>UAS-spi-IR*) a las 112 horas y a las 256 horas AEL. **(D)** Lípidos neutros mostrados con Rojo Nilo en el cerebro de una larva control (*phm-Gal4*) a las 112 horas AEL. **(E y F)** Acumulación de lípidos neutros en cerebros de larvarios con silenciamiento genético de *spi* en la glándula protorácica (*phm>UAS-spi-IR*) a las 112 horas y a las 256 horas AEL.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de Spitz o un análogo de Spitz como agente modulador del receptor EGFR y la regulación del peso corporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las estirpes de moscas (*Drosophila melanogaster*) usadas en este estudio fueron: *mir-8^{NP5247}-Gal4* (DGRC, #104917), *phm²²-Gal4* (cedidas por K. Rewitz), *ppl-Gal4*, *NP2222-Gal4* (DGRC, #112830), *tubulin-Gal4*, *UAS-secGFP* (cedidas por M. Gonzalez-Gaitan), *UAS-mSpi* (cedidas por J. Treisman), *UAS-mSpiCS* (BDSC, #63133), *UAS-sSpiCS* (BDSC, #63134), *UAS-sSpi* (cedidas por J. Treisman) y *UAS-spi-IR* (*v3922*, *GD1779*).

Las moscas se criaron en *ab libitum* de comida (papilla "Ibérica") y agua a 25°C en un ciclo de luz/oscuridad de 14:10 horas. El alimento estándar se hizo mezclando 15L de agua, 0,75Kg de harina de trigo, 1Kg de azúcar moreno, 0,5Kg de levadura, 0,17Kg de agar, 130mL de una solución de Nipagin (metilparaben) al 5% en etanol y 130mL de

ácido propiónico.

Para identificar los genes involucrados en la señalización y regulación del peso corporal, que vinculan el peso corporal con el tiempo de inicio de la maduración, se silenciaron sistemáticamente la expresión de genes mediante líneas transgénicas ARNi (ARN de interferencia); cada una expresando un único transgén que codifica para una horquilla de doble cadena de ARN complementaria al gen endógeno. De esta forma el silenciamiento de dicho gen, específico del tejido, dio lugar animales mutantes que no podían desencadenar la metamorfosis a pesar de alcanzar el peso corporal necesario para que la larva inicie el proceso de pupación y cese el crecimiento (peso crítico o “*critical weight*” en inglés, CW).

Los inventores realizaron un cribado primario con la línea promotora *mir-8-Gal4* para dirigir la expresión del transgén de ARNi simultáneamente en los tres órganos principales en la detección de nutrientes: el cuerpo graso (equivalente al tejido adiposo/hígado en mamíferos), la glándula protorácica (PG) (el órgano endocrino que produce la hormona esteroidea ecdisona) y la glia cortical. En este primer cribado eliminaron 139 genes, de un total de 248 líneas transgénicas diferentes y específica para cada gen, que codifican para proteínas con un péptido señal predicho, tal como proteínas secretadas y unidas a la membrana. Para ello, los inventores cruzaron cinco vírgenes de *mir-8-Gal4* con cinco machos de la línea *UAS-RNAi* transgénica correspondiente de la colección VDRC (*Vienna Drosophila Resource Center*) y permitieron poner huevos en viales con papilla ibérica durante 24 horas. Los fenotipos de la descendencia F1 fueron calificados en los días 11–13 por retraso en el desarrollo o detención.

Dado que *mir-8-Gal4* se expresa en varios tejidos (el cuerpo graso, la glándula protorácica y la glia cortical), los inventores realizaron un segundo cribaje con líneas promotoras específicas de tejido de cuerpo graso *ppl-Gal4*, de la glándula protorácica *pkm-Gal4* y de la glia cortical *NP2222-Gal4*.

De esta forma, identificaron el gen *spi* cuya eliminación mediante silenciamiento génico por ARNi, resultó en animales incapaces de realizar la metamorfosis a pesar de superar el peso crítico.

35

La secuencia de nucleótidos del ARNi de interferencia para el silenciamiento del gen *spi* comprende la SEQ ID NO: 10, descrita anteriormente en la presente descripción.

5 Para el análisis de la eficiencia en el silenciamiento del gen *spi* con la línea *UAS-RNAi* los inventores utilizaron RT-PCR cuantitativa (qPCR) con cebadores específicos contra el gen *spi* [cebador izquierdo CGCGAATTCCGATGTTGGAGAAGGCGAGCA (SEQ ID NO: 12); cebador derecho CGCTCTAGAGCGTCGAATGGCGAAGGACA (SEQ ID NO: 13)]. Para ello seleccionaron cinco larvas enteras en las que silenciaron la función del gen *spi* utilizando un promotor con expresión en todos los tejidos (*tubulin-Gal4*>).

10

Posteriormente, se silenció el gen *spi* mediante la expresión del transgén de ARNi con el promotor *mir-8-Gal4* (*mir-8*>*UAS-spi-IR*) y *phm-Gal4* (*phm*>*UAS-spi-IR*), promotor específico de la glándula protorácica y se mantuvo a los mutantes en fase de alimentación. También sobreexpresaron tanto el gen *spi* con el promotor *phm-Gal4* 15 (*phm*>*UAS-sSpi*) y como la forma activa de la proteína sin el sitio de palmitoylación (*phm*> *UAS-sSpiCS*).

Se elaboraron análisis comparativos del peso corporal con una balanza de precisión durante la fase larvaria a las 112 horas AEL en larvas control y mutantes, y a las 256 20 horas AEL en larvas mutantes, y de la duración en fase larvaria entre las larvas control y las mutantes (*mir-8*>*UAS-spi-IR*, *phm*> *UAS-spi-IR*, *phm*> *UAS-sSpi*, *phm*> *UAS-sSpiCS*).

Para medir el tiempo de desarrollo de la formación de la pupa, se cruzaron 20-30 25 hembras y 20-30 machos y, tras 24-48 horas, las moscas fueron transferidas a placas de agar con jugo de uva y pasta de levadura y se dejaron 4 horas para la deposición de huevos. Las moscas parentales se quitaron y los huevos fueron incubados 48 horas a 26,5 °C. Las larvas de segundo estadio fueron transferidas a 5mL de alimento estándar para *Drosophila*, descrito en párrafos anteriores (20 larvas por tubo) y se 30 mantuvieron a 26,5 °C. Un estudio de las pupas fue realizado con intervalos de 8 horas, considerando el tiempo "0" 4 horas tras la iniciación de la deposición de huevos.

Se realizaron mediciones de peso, en las que los inventores recolectaron larvas de cada genotipo en la etapa de desarrollo precisa (5 grupos de 5 larvas cada grupo) y se 35 pesaron con una balanza de precisión.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la t-bilateral para datos independientes que se calculó con *GraphPad Prism Software* (versión 6, para Mac).

5 Por otro lado, los inventores realizaron un ensayo de ingesta de comida coloreada para demostrar la alimentación activa en las larvas mutantes con silenciamiento del gen *spi* en la glándula protorácica utilizando *phm-Gal4 (phm> UAS-spi-IR)*. Como control se utilizaron larvas de segundo estadio que se encuentran en la fase de alimentación activa. Se incorporó azul de bromofenol (3', 3'', 5', 5''-
10 tetrabromofenolesulfonftaleína) y se disolvió en la papilla para moscas, anteriormente descrito. Los controles (larvas *phm>*) a las 48 horas de la puesta de los huevos, en inglés *after egg laying* ("AEL") y las larvas mutantes (*phm> UAS-spi-IR* a las 240 horas AEL) se transfirieron a una alimentación con azul de bromofenol y se incubaron durante 24 horas.

15

Por último, los inventores analizaron la acumulación de lípidos neutros en los cerebros larvarios, mediante incubación con anticuerpos secundarios, los cerebros de las larvas se enjuagaron varias veces con PBS y luego se incubaron durante 40 minutos en una dilución de 1:500 en PBS con 1 mg / ml de Rojo Nilo (Sigma).

20

RESULTADOS

El inicio de la maduración o pubertad no sigue una edad cronológica en los animales o humanos, sino que está relacionado con el estado energético y el peso corporal. Es
25 necesario que el animal o humano alcance un determinado peso corporal (Figura 1A (1)) durante la etapa de crecimiento para asegurar una suficiente reserva de energía para comenzar la maduración o pubertad posterior.

Mediante el primer cribado bajo la línea promotora *mir-8-Gal4*, los inventores
30 eliminaron 139 genes, de un total de 248 líneas transgénicas. De esta forma, identificaron genes cuya eliminación mediante silenciamiento génico, resultó en animales incapaces de realizar la metamorfosis a pesar de superar el peso crítico (Figura 1A(2)).

35 Dado que *mir-8-Gal4* se expresa en varios tejidos (el cuerpo graso, la glándula

protorácica y la glia cortical), los inventores realizaron un segundo cribaje con líneas promotoras específicas de tejido de cuerpo graso *ppl-Gal4*, de la glándula protorácica *phm-Gal4* y de la corteza glial *NP2222-Gal4*, donde se identificó el gen *spi* como modulador de la regulación del peso corporal

5

Cuando los inventores generaron larvas mutantes a las que se les silenció el gen *spi* junto con el promotor *mir-8-Gal4* (*mir-8>UAS-spi-IR*), obtuvieron larvas con un crecimiento mayor con respecto a la larva control (Figura 1B). El silenciamiento del gen *spi* resultó en larvas incapaces de realizar la metamorfosis a pesar de superar el peso crítico con respecto a las larvas control.

10

Posteriormente, se generaron larvas mutantes bajo el promotor específico de la glándula protorácica (*phm-Gal4*). Cuando se eliminó el gen *spi* (*phm>UAS-spi-IR*) la larva mutante generó un peso corporal mayor a la larva control, 2,5 mg a las 112 horas AEL y 3,2 mg a las 240 horas AEL (Figura 1D), y fue incapaz de realizar la metamorfosis (Figura 1C).

15

Cuando se sobreexpresó el gen *spi* (*phm>UAS-sSpi*) la larva entro en metamorfosis prematuramente sin haber alcanzado el peso crítico (Figura 1C). Sin embargo, cuando se sobreexpresó el gen *spi* donde la proteína activa se generaba sin el sitio de palmitoylación (*phm>UAS-sSpiCS*) en el que se mutó la cisteína a serina (C29), la larva mutante generó un peso corporal mayor a la larva control y fue incapaz de realizar la metamorfosis de igual forma que *phm>UAS-spi-IR* (Figura 1C).

20

El ensayo de ingesta de comida coloreada demostró la alimentación activa en las larvas mutantes *phm>UAS-spi-IR*. Como control se transfirieron larvas *phm>* a las 80 horas AEL y larvas mutantes *phm>spi-IR* a las 240 horas AEL. El análisis de la ingesta se realizó 24 horas después (Figura 1E).

25

En la Figura 1A se muestra un resumen de los resultados descritos en párrafos anteriores: los animales en los que se ha producido el silenciamiento del gen *spi* en la glándula protorácica (*phm>UAS-spi-IR*) se mantienen en etapa de crecimiento hasta su muerte sin entrar en la fase de pupación o pubertad (Figura 1A (2)). Por el contrario, las larvas con sobreexpresión del gen *spi* (*phm>UAS-sSpi*) cesan el crecimiento antes de alcanzar el peso crítico y mueren prematuramente (Figura 1A

35

(3)).

En la Figura 2 se muestran la acumulación de vesículas sobreexpresando secGFP bajo el control del promotor específico *phm* en la glándula protorácica mutante (*phm>UAS-secGFP>UAS-spi-IR*: Figura 2B y C) en comparación a la condición control (*phm>UAS-secGFP*: Figura 2A).

El silenciamiento del gen *spi* en la glándula protorácica (*phm>UAS-spi-IR*) generó un peso corporal mayor a la larva control (Figura 1D) y la consiguiente acumulación de grasa corporal (Figura 2E y 2F). Como ejemplo se muestra la acumulación de lípidos neutros mostrados con Rojo Nilo en el cerebro de una larva control a las 112 horas AEL (Figura 2D) y en cerebros mutantes con silenciamiento genético de *spi* en la glándula protorácica (*phm>UAS-spi-IR*) a las 112 horas (Figura 2E) y a las 256 horas AEL (Figura 2F).

15

En conclusión, los resultados de los inventores verifican que la transición entre la etapa de crecimiento y la etapa de madurez y maduración de los organismos está regulada por la vía EGFR mediada por la interacción del receptor EGFR y la proteína Spitz, análoga de TFG-alfa. Una vez alcanzado el peso umbral se desencadena la secreción de Spitz de la glándula protorácica, produciéndose posteriormente modificaciones lipídicas y activando la vía EGFR, controlando la conducta de alimentación y el peso corporal asociado al crecimiento e iniciar el progreso a la pubertad o maduración.

20

REIVINDICACIONES

1. Un agente modulador del receptor EGFR para usarlo en el tratamiento de la regulación del peso corporal en un sujeto.
5
2. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 1, en donde el agente modulador es un agonista del receptor EGFR.
3. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 2, en donde el agonista del receptor EGFR es Spitz o un análogo de Spitz.
10
4. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 3, en donde Spitz comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
15
5. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el análogo de Spitz se selecciona de la lista que consiste en: TGF- α (*Transforming Growth Factor-alpha*), AR (*Amphiregulin*), BTC (*Betacellulin*), HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*), EREG (*Epiregulin*), EPGN (*Epigen*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), Gurken, Vein y Keren.
20
6. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 5, en donde el análogo de Spitz es TFG- α .
7. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el peso corporal es regulado hacia la disminución del peso o el crecimiento del sujeto.
25
8. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 1, en donde el agente modulador es un antagonista del receptor EGFR.
30
9. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 8, en donde el antagonista del receptor EGFR se selecciona de la lista que consiste en: un anticuerpo, un aptámero, una ribozima, una secuencia de ácido nucleico antisentido, un ARNi y un inhibidor de un agonista de EGFR.
35

10. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 9, en donde el inhibidor de un agonista de EGFR es un inhibidor de Spitz o un inhibidor de un análogo de Spitz.

5

11. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 10, en donde Spitz comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

10 12. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 10 u 11, en donde el inhibidor de Spitz es un ARNi que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.

15 13. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 9, en donde el ARNi se selecciona de la lista que consiste en una molécula de ARN pequeño de interferencia (ARNip), de ARN de doble cadena o bicatenario (ARNbc), de ARN de cadena única o monocatenario (ARNmc), de micro ARN (miARN), de ARN de horquilla corto (ARNhc), y cualquier combinación de las mismas.

20 14. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 13, en donde el peso corporal es regulado hacia el aumento del peso o el crecimiento del sujeto.

25 15. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto es un vertebrado, preferiblemente un mamífero o un ave.

16. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 15, en donde el mamífero es un ser humano o un animal de granja.

30

17. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 16, en donde el animal de granja es seleccionado de la lista que consiste en vaca, cerdo, oveja, conejo, cabra, caballo, llama, buey, toro y liebre.

35 18. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 15, en

donde el ave es un animal de granja.

19. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según la reivindicación 18, en donde el animal de granja se selecciona de la lista que consiste en gallina, gallo, pollo,
5 ganso, pavo, pato, oca, faisán, codorniz y perdiz.

20. El agente modulador del receptor EGFR para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el agente modulador está comprendido dentro de una composición que, opcionalmente comprende, un vehículo o excipiente
10 farmacéuticamente aceptable.

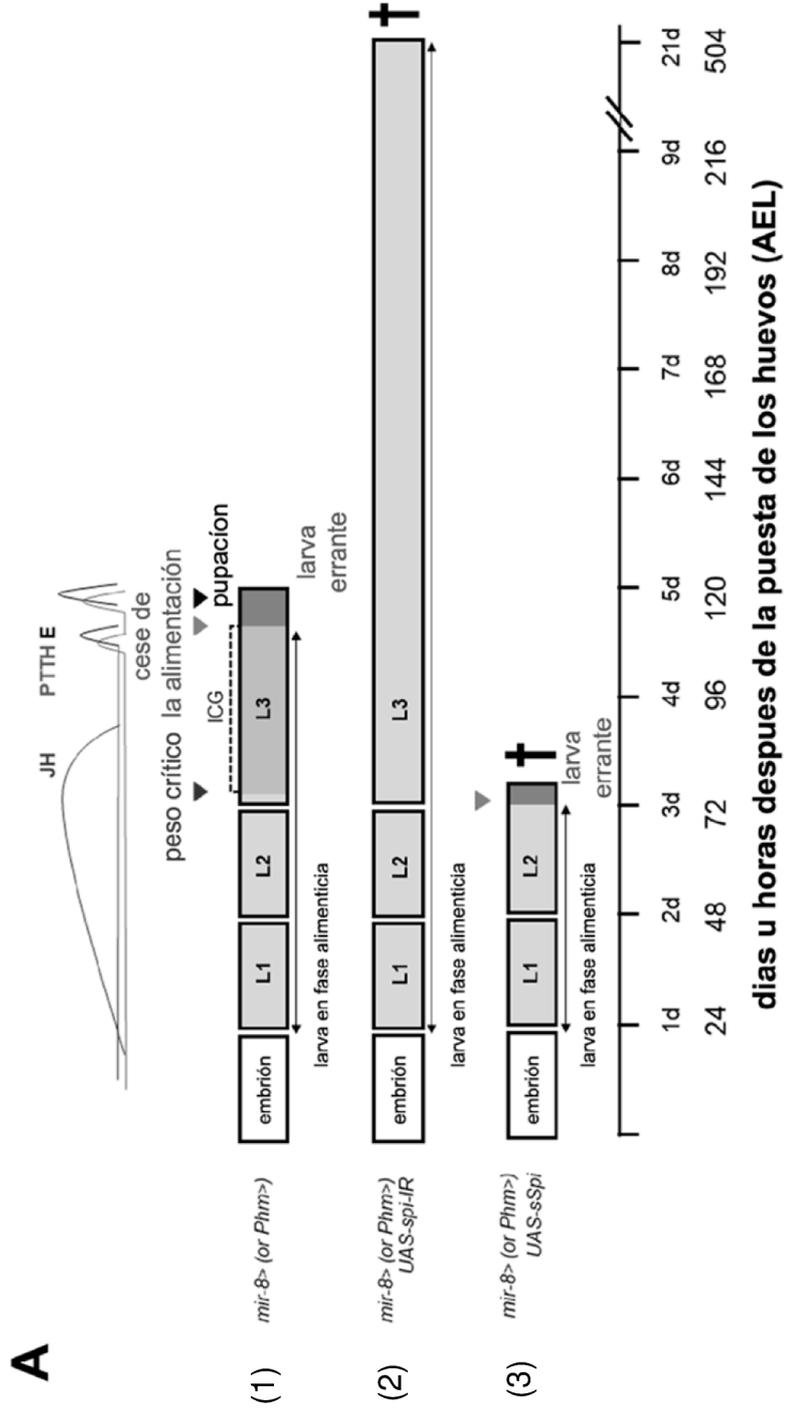


FIG 1

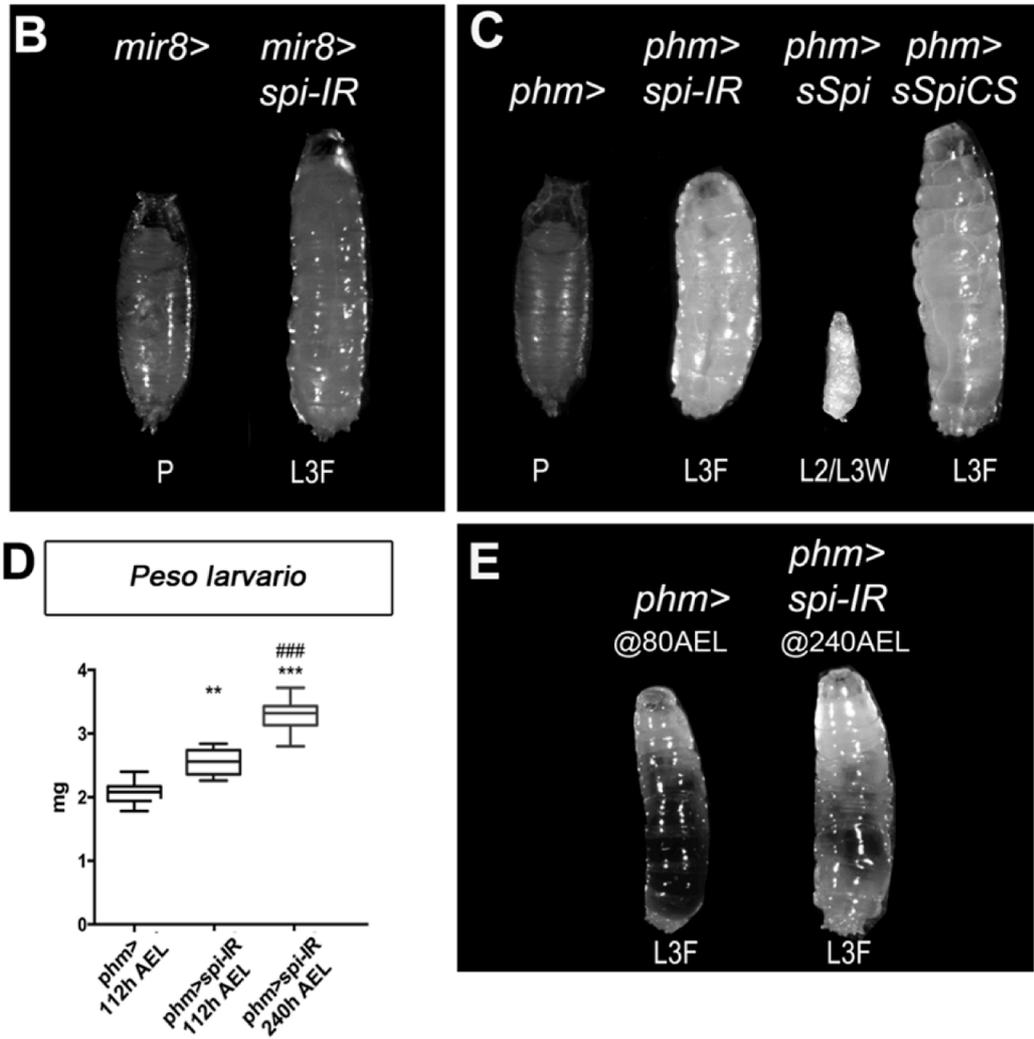


FIG 1 (continuación)

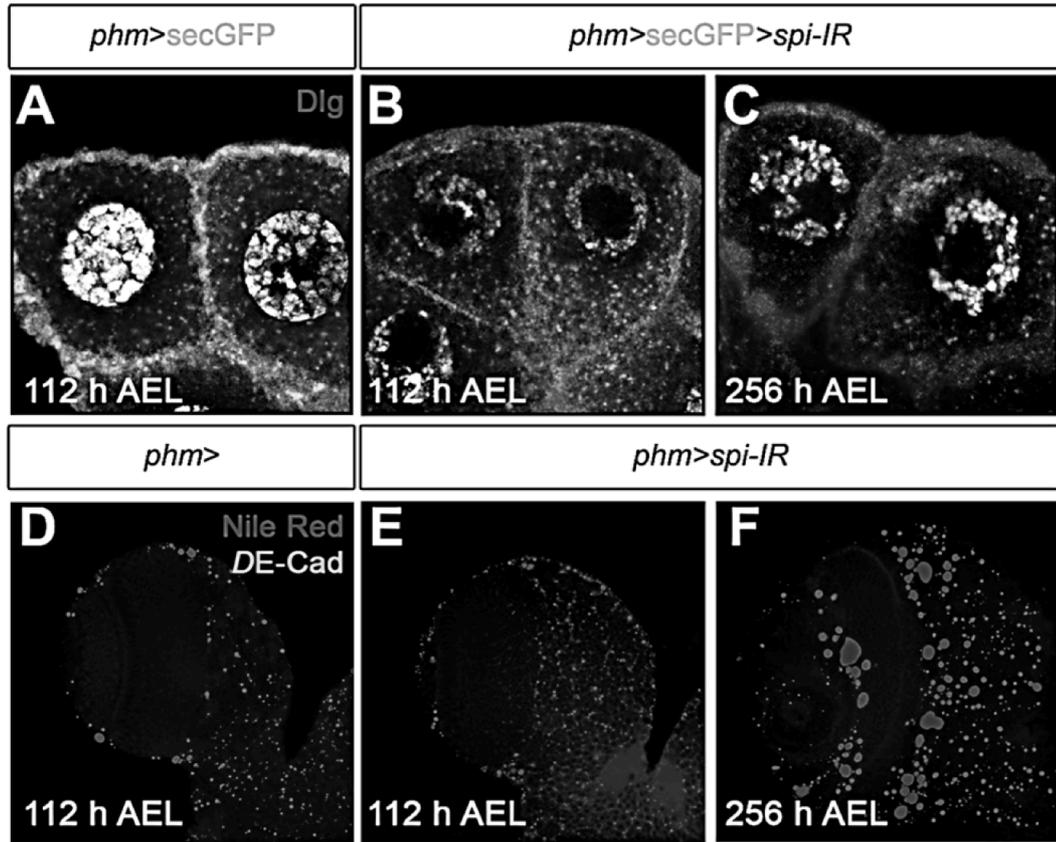


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201930530

22 Fecha de presentación de la solicitud: 11.06.2019

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SNODGRASS-BELT, P. et al. Central administration of transforming growth factor-alpha and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. <i>Brain Research</i> . Marzo 2005, Vol. 1038, Nº 2, páginas 171 - 182. ISSN 0006-8993 (impreso), <DOI: 10.1016/j.brainres.2005.01.030>. Especialmente: página 173, columna izquierda; página 178, columna derecha - página 179, columna izquierda; página 181, columna izquierda; apartado 3.2.	1-20
X	GILBERT, J. et al. Behavioral effects of systemic transforming growth factor-alpha in Syrian hamsters. <i>Behavioural Brain Research</i> . Marzo 2009, Vol. 198, Nº 2, páginas 440 - 448. ISSN 0166-4328, <DOI: 10.1016/j.bbr.2008.11.046>. Especialmente: página 441, columna izquierda; página 445, columna derecha; apartado 3.2.	1-20
X	LUETTEKE, N. C. et al. Regulation of fat and muscle development by transforming growth factor alpha in transgenic mice and in cultured cells. <i>Cell Growth and Differentiation</i> . Marzo 1993, Vol. 4, Nº 3, páginas 203 - 213. ISSN 1044-9523. Especialmente: página 204, columna izquierda; página 210, último párrafo.	1-20
Y	LEE, G. J. et al. MicroRNA miR-8 regulates multiple growth factor hormones produced from <i>Drosophila</i> fat cells. <i>Insect Molecular Biology</i> . Junio 2015, Vol. 24, Nº 3, páginas 311 - 318. ISSN 0962-1075 (impreso), ISSN 1365-2583 (electrónico), <DOI: 10.1111/imb.12156>. Especialmente: página 316, columna derecha - página 317, columna izquierda.	1-20
Y	MORANTE, J. et al. Conserved miR-8/miR-200 defines a glial niche that controls neuroepithelial expansion and neuroblast transition. <i>Developmental Cell</i> . Octubre 2013, Vol. 27, Nº 2, páginas 174 - 187. ISSN 1878-1551 (electrónico), <DOI:10.1016/j.devcel.2013.09.018>. Especialmente: página 175, columna izquierda; página 178, columna derecha - página 181, columna izquierda.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.05.2020

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/18 (2006.01)
C07K14/495 (2006.01)
A61P43/00 (2006.01)

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

A61K, C07K, A61P

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

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, EM_REL, NRNL1