

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 618**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2010 E 10710061 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014 EP 2397152**

54 Título: **Uso de la cardiotrofina-1 para el tratamiento de enfermedades metabólicas**

30 Prioridad:

12.02.2009 ES 200900396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.09.2014

73 Titular/es:

**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. (50.0%)
Avenida Pío XII, 22. Oficina 2
31008 Pamplona, Navarra, ES y
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PRIETO VALTUEÑA, JESÚS MARÍA;
BUSTOS DE ABAJO, MATILDE y
MORENO ALIAGA, MARÍA JESUS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 493 618 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

Uso de la cardiotrofina-1 para el tratamiento de enfermedades metabólicas

Campo técnico de la invención

5 La invención está relacionada con el uso de la cardiotrofina-1 (CT-1) para el tratamiento de la obesidad y alteraciones asociadas: hiperglucemias, resistencia a la insulina, desarrollo de diabetes tipo 2 y dislipemias y dado su papel anorexígeno, estimulante de la oxidación de grasas, hipoglucemiante, agente sensibilizador de la acción de la insulina a nivel de músculo esquelético e inhibidor del transporte intestinal de glucosa por los enterocitos.

Antecedentes de la invención

10 La obesidad constituye un serio problema de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en muchos países desarrollados (Bellanger y Bray, 2005, J La State Med Soc; 157: S42-49; prueba 49). El aumento de la ingesta, los hábitos alimentarios poco saludables y el estilo de vida sedentario en nuestras sociedades desarrolladas han contribuido sin duda a la gran expansión de la obesidad (Stein y Colditz et al., 2004, J. Clin. Endocrinol. Metab. 89: 2522-5). Numerosos estudios han demostrado que el alarmante incremento de la prevalencia de obesidad y sus alteraciones metabólicas están asociadas a la resistencia insulínica, dislipemias y finalmente fallo de las células beta del páncreas conduciendo inexorablemente a diabetes tipo 2 con todas las consecuencias que esta enfermedad puede conllevar (Rana et al., 2007, Diabetes Obes. Metab., 9: 218-232).

15 Los tratamientos actualmente utilizados para la obesidad son: i) Xenical (Orlistat) es un inhibidor de la lipasa gastrointestinal que produce una pérdida de peso moderada pero tiene el principal problema de los efectos adversos gastrointestinales incluyendo cáncer de colon. ii) Sibutramina es un inhibidor de la captación de monoaminas que produce una mayor pérdida de peso que el tratamiento anterior, pero va asociado a un aumento de la presión sanguínea y a un aumento del gasto cardíaco. iii) Finalmente, uso de Rimonabant, que está aprobado en Europa (aunque no por la FDA) y es un antagonista de receptores endocannabinoides pero tiene el problema de alteraciones del comportamiento emocional como depresión, por lo que ha sido retirado del mercado.

20 En cuanto a los tratamientos actuales para la resistencia a la insulina, generalmente se utilizan las tiazolidinedionas (TZD) en combinación con otras terapias. El problema de estas drogas radica en la ganancia de peso, sobre todo cuando se administran conjuntamente con insulina. De todo esto se deduce que un agente capaz de sensibilizar o aumentar la acción de la insulina además de reducir el peso corporal puede tener gran interés en estas patologías. Además tratamientos con acciones periféricas como la inhibición de la glucosa a nivel intestinal podrían ser de gran interés en la obesidad y diabetes mellitas.

25 El descubrimiento de la leptina a finales de 1994 abrió nuevas perspectivas en el estudio de los factores secretados por el adipocito en la regulación del balance energético. Esta proteína es producida y secretada principalmente por el adipocito en proporción a la masa grasa. Esta proteína fue identificada como moduladora a nivel del sistema nervioso central en la regulación del apetito, además de acciones periféricas incrementando la oxidación de la grasa y la captación de glucosa por los músculos. Sin embargo, pronto se observó que la obesidad iba relacionada con elevados niveles de leptina y que la leptina endógena no era efectiva, por lo que la mayoría de los obesos en humanos y roedores eran resistentes a la leptina, por tanto este arma terapéutica quedaría limitada a individuos con alteraciones que resultaran en deficiencia de leptina (un bajo porcentaje de personas obesas).

30 Dado que la leptina presenta similitud estructural con las citocinas de la familia gp-130 y que el receptor de la leptina (LRb) presenta similitud estructural con el receptor de citocinas gp130 conocido como gp-130Rbeta, se ha estudiado la capacidad de otro miembro de la familia de citocinas gp130, en concreto CNTF, como posible agente terapéutico para el tratamiento de la obesidad con el fin de superar el problema de la resistencia a la leptina observada en individuos obesos.

35 Se conoce que la citocina CNTF tiene un posible potencial terapéutico en ratones que sufren de obesidad, insulino-resistencia y un hígado graso, ya que ella mejora todos estos parámetros (Sleeman et al., 2003, Proc Natl Acad. Sci. EE.UU., 100: 14297-14302). Se ha descrito el papel anorexígeno de CNTF (Stephens TW et al., 1995), la capacidad de esta citocina para revertir la insulino-resistencia a través de la capacidad de activación de AMPK (Watt et al., 2006, Nat. Med., 12: 541-548) así como su capacidad para estimular la captación de glucosa por músculos (Steinberg et al., 2009, Diabetes, Epub 9 de enero de 2009), lo que ha llevado a proponer a esta citocina como posible tratamiento para obesidad y enfermedades relacionadas (Ahima et al., 2006, Nat. Med., 12:511-512). No obstante, el uso de esta citocina como agente terapéutico se ve limitado por la baja expresión del receptor CNTFR α en tejido adiposo y muscular, por el gran número en SNC y por la producción de anticuerpos anti-CNTF. Los ensayos clínicos con esta citocina en pacientes de aproximadamente 114 kg de peso durante 84 días a dosis de 1-2 microgramos/kg condujeron a la pérdida de 3-4 kgs. Mientras estos resultados parecieron ser prometedores, en pacientes con altas dosis de CNTF apareció náusea y ellos desarrollaron ganancia de peso con el tiempo debido al desarrollo de anticuerpos anti-CNTF (Ettinger M.P. et al., JAMA, 2003, 289: 1826-32).

40 Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de agentes útiles para el tratamiento de la obesidad que no presenten las desventajas de los ligandos basados en gp130 conocidos hasta la fecha.

Compendio de la invención

5 En un primer aspecto, la invención está relacionada con un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1 (CT-1) para el tratamiento de una enfermedad metabólica así como con el uso de un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1 (CT-1) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad metabólica de acuerdo con las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención se relaciona con métodos cosméticos que comprenden administrar al paciente una cantidad farmacológicamente activa de un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1 de acuerdo con las reivindicaciones.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende, juntos o separados, un compuesto que induce la actividad cardiotrofina y un compuesto anti-diabético. En sucesivos aspectos, la invención se relaciona con una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad metabólica, en la que la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial así como con el uso de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad metabólica en donde la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con métodos cosméticos para el tratamiento de la obesidad que comprenden administrar a un paciente una cantidad farmacológicamente activa de una composición de acuerdo con la invención.

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1: Cardiotrofina-1 reduce el peso corporal en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas. (S: Suero, vehículo de la administración de rCT-1). Los resultados se expresan como media \pm ES. n=8 animales por grupo. **p < 0,01; ***p < 0,001.

Figura 2: La reducción de peso corporal en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas mediada por CT-1 se debe, al menos en parte, a un efecto anorexígeno. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=8 animales por grupo. *p < 0,05.

25 Figura 3: Cardiotrofina-1 reduce el peso corporal en ratones con dieta normal (NCD). (S: Suero, vehículo de la administración de rCT-1). Los resultados se expresan como media \pm ES. n=5 animales por grupo. **p < 0,01; ***p < 0,001.

30 Figura 4: La reducción de peso corporal mediada por CT-1 se debe a factores distintos al efecto anorexígeno (los resultados se expresan como media \pm ES. n=6 animales por grupo.*p < 0,05). El grupo alimentado en paralelo (PF) es un grupo de ratones alimentados con la misma ingesta diaria que los ratones tratados con CT-1.

Figura 5: La administración intravenosa aguda de una sola dosis de rCT-1 (10 μ g) a ratones C57BL/6 (3 meses de edad) reduce los niveles basales de glucemia. Niveles de Glucemia, Insulina y prueba de bandas de western donde se ve activación de AKT (P-AKT) en músculo son tomados a 1 hora tras la administración de rCT-1. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=5 animales por grupo.*p < 0,05.

35 Figura 6: La administración aguda de una sola dosis de rCT-1 (10 μ g) impide la elevación de glucosa en sangre tras una dieta rica en azúcares. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=5 animales por grupo.*p < 0,05.

40 Figura 7: CT-1 tiene efectos hipoglucemiantes directos en ratones con destrucción pancreática (con estreptozotocina). La administración de CT-1 por sí sola disminuyó los niveles de glucemia y el efecto se potenció cuando se administraba conjuntamente con insulina. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=5 animales por grupo.*p < 0,05 **p < 0,01 frente a grupo de solución salina. En abscisas se indica el tiempo, en minutos, transcurrido desde la administración de los distintos tratamientos.

Figura 8: Los efectos hipoglucemiantes de CT-1 se deben, al menos en parte, a un aumento del consumo de glucosa por músculos. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=5 animales por grupo.*p < 0,05 **p < 0,01 frente a grupo de solución salina.

45 Figura 9: Niveles de glucosa e insulina tras el tratamiento crónico con rCT-1 durante 6 días en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=7 animales por grupo.*p < 0,05.

Figura 10: Niveles de Glucosa e Insulina tras el Tratamiento crónico con rCT-1 o tras Restricción Calórica (PF) durante 1 semana. El grupo PF (alimentado en paralelo) son ratones con ingesta diaria igual que los tratados con CT-1. Los resultados se expresan como media \pm ES. n=6 animales por grupo.

50 Figura 11: Cardiotrofina-1 inhibe transporte de glucosa en intestino (tratamiento *in vitro*). Los resultados se expresan como media \pm ES de 12 determinaciones en 6 ratones diferentes. **p < 0,01.

Figura 12: Cardiotrofina-1 tiene un mayor efecto inhibitor del transporte de glucosa en intestino (tratamiento *in vitro*)

que CNTF. Los resultados se expresan como media \pm ES de 24-35 determinaciones en 6 ratones diferentes. ***p < 0,001.

Figura 13: Cardiotrofina-1 inhibe transporte de glucosa en intestino (tratamiento agudo *in vivo*). Los resultados se expresan como media \pm ES de 30 determinaciones. n= 5 ratones por grupo experimental. **p < 0,01.

- 5 Figura 14: Cardiotrofina-1 inhibe transporte de glucosa en intestino (tratamiento crónico *in vivo*). Los resultados se expresan como media \pm ES de 30 determinaciones. n= 5 ratones por grupo experimental. ***p < 0,001.

Figura 15: Cardiotrofina-1 inhibe transporte de glucosa en intestino (estudios en células Caco-2). Los resultados se expresan como media \pm ES de 42-44 determinaciones por grupo.

- 10 Figura 16: Cardiotrofina-1 inhibe liberación de leptina en adipocitos (no CNTF) (experimentos *in vitro* en cultivos primarios de adipocitos). Los resultados se expresan como media \pm ES de 6 experimentos independientes **p < 0,01; ***p < 0,001 frente a control; ^bp < 0,01; ^cp < 0,001 frente a Insulina

Figura 17: Efectos diferenciales de CT-1 y CNTF en lipólisis. Liberación de glicerol (medida de lipólisis) en adipocitos primarios de rata producida por CT-1 o CNTF en presencia o ausencia de insulina durante 24 horas. n = 4-8; *P < 0,05 frente a células control (100%); #P < 0,05 frente a células tratadas solo con insulina.

- 15 Figura 18: Efectos diferenciales de CT-1 y CNTF en la inducción de genes típicos de tejido adiposo pardo sobre células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Células fueron tratadas con CT-1 o CNTF (20 ng/ml) durante 24 horas (n = 5; *P < 0,05 frente a células control). La expresión de genes fue medida por PCR cuantitativa.

Figura 19: Niveles séricos de IL-6 tras el tratamiento crónico con rCT-1 durante 6 días.

- 20 Figura 20: Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado (H&E 100X) en 3 grupos de ratones (C57BL/6, 4 meses de edad) tratados con suero, CT-1 o tratados con la misma dieta que los animales tratados con CT-1 (alimentados en paralelo). En ningún de los casos se observaron infiltrados inflamatorios.

Figura 21: rCT-1 provoca una disminución de la concentración de ácidos grasos libres (AGL) en suero y de triglicéridos (TG) tras una ingesta rica en grasas.

Figura 22: Efecto de rCT-1 en la eliminación de AGL de suero tras una inyección intralipídica.

- 25 Figura 23: Efecto de la administración aguda de rCT-1 sobre la beta oxidación en mitocondrias aisladas de músculo esquelético. Los datos corresponden a la media \pm s.e. (n= 5, *P < 0,05).

Figura 24: Efecto de rCT-1 sobre los niveles de expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos medidos por PCR cuantitativa.

- 30 Figura 25: Efecto potenciador de rCT-1 en la captación de glucosa (2-deoxiglucosa) por insulina en células L6E9 (mioblastos diferenciados a miotubos). El tratamiento agudo (1 hora) y crónico (24 horas) con CT-1 aumenta significativamente la captación de glucosa inducida por la insulina. *P < 0,05 frente a células control; #P < 0,05 frente a células tratadas con insulina.

- 35 Figura 26: Efecto potenciador de rCT-1 en la señalización de insulina en células L6E9 (mioblastos diferenciados a miotubos). (A) El tratamiento agudo con rCT-1 (15 minutos) y (B) tratamiento crónico con rCT-1 (10 horas y 24 horas) potencia la fosforilación de AKT inducida por insulina.

Figura 27: Efecto potenciador de rCT-1 (tratamiento agudo) en la señalización de insulina en músculo "in vivo". Ratones C57BL/6 de 4 meses de edad fueron inyectados con rCT-1 (10 μ g/ratón) 30 minutos antes de la inyección de insulina en vena cava. A los 5 minutos el músculo gastrocnemio fue extraído y homogeneizado. Observamos que CT-1 potencia la fosforilación de AKT inducida por insulina en músculo. Análisis densitométrico (n=5; *P < 0,05).

- 40 Figura 28: Efecto potenciador de rCT-1 (tratamiento crónico) en la señalización de insulina en músculo "in vivo". Ratones C57BL/6 de 4 meses de edad fueron inyectados con rCT-1 (0,2 mg/kg/día) durante 6 días. Como controles se utilizaron ratones alimentados con la misma cantidad de comida que el grupo anterior e inyectados durante 6 días con suero salino (grupo alimentado en paralelo). Después de 16 horas de ayuno, a los animales se les inyectó insulina en vena cava y a los 5 minutos músculo gastrocnemio fue extraído y homogeneizado. Observamos que CT-1 potencia la fosforilación de AKT inducida por insulina en músculo. Análisis densitométrico (n=5; *P < 0,05).
- 45

Descripción detallada de la invención

Usos médicos y cosméticos de CT-1

- Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, CT-1 es capaz de provocar una reducción de peso en ratones alimentados con dieta normal así como en ratones alimentados con dieta rica en grasas. Dicho efecto depende, al menos en parte, del efecto anorexígeno de CT-1 (Figura 2) así como de la
- 50

capacidad de CT-1 de disminuir la elevación de lípidos en plasma tras una dieta rica en grasas (figuras 20 y 21), de disminuir la glucemia tras una dieta rica en azúcares (figuras 5-6), de provocar un aumento del consumo de glucosa por el músculo (figura 8) y de disminuir la captación de glucosa por parte del intestino (figuras 11-14). Adicionalmente, los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que CT-1 es capaz de inhibir la secreción de leptina basal y estimulada por insulina en adipocitos, así como de inducir la liberación de glicerol e inhibir la actividad anti-lipolítica que posee la insulina (figura 16 y 17). Sin embargo estos efectos no se observan cuando se usa CNTF. Aunque sin vinculación a ninguna teoría en particular, se piensa que este efecto diferencial podría conferir una ventaja al uso de CT-1, puesto que se sumaría a la acción que está molécula presenta en músculo (estimulación de la captación de glucosa con la consiguiente hipoglucemia) provocando una disminución de la glucosa disponible por el adipocito para convertirla en triglicéridos.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1 (CT-1) para el tratamiento de una enfermedad metabólica. Adicionalmente, la invención se relaciona con el uso de un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1 para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad metabólica así como con un método de tratamiento de una enfermedad metabólica que comprende la administración a un sujeto de un compuesto que induce la actividad CT-1.

El término "compuesto que induce la actividad cardiotrofina-1", según se utiliza aquí, se entiende como cualquier compuesto cuya administración provoque un aumento en la actividad cardiotrofina-1 (CT-1) independientemente de que dicho aumento sea causado por un aumento de la actividad específica de la CT-1 pre-existente o por un aumento en la síntesis de CT-1 o de análogos de esta que compartan sustancialmente la misma función que cardiotrofina. Así, en una forma preferida de realización, el agente que induce actividad CT-1 es la misma CT-1. Por "CT-1" se entiende la proteína definida por la secuencia descrita en la base de datos UniProtKB por el número de acceso CTF1_HUMAN o Q16619 en la versión 62 con fecha de 16-diciembre-2008, correspondiente a la isoforma 1 de la cardiotrofina humana o por el número de acceso Q5U5Y7 en su versión 1 con fecha de 20.01.2009, correspondiente a la isoforma 2 de la cardiotrofina humana, así como a los ortólogos en otras especies, tales como ratón (secuencias definidas en la base de datos UniProtKB con los números de acceso NP_031821 o Q60753 en la versión 50 con fecha de 16.12.2008 y NP_942155 o P83714 en la versión 42 con fecha de 16.12.2008), rata (secuencias definidas en la base de datos UniProtKB con los números de acceso NP_058825 o Q63086 en la versión 50 con fecha de 4-11-2008 y NP_001129272 o Q6R2R3 en la versión 30 con fecha de 20-1-2009) y de chimpancé (secuencia definida en la base de datos UniProtKB con el número de acceso NP_001009112 o Q6R2R2 en la versión 30 con fecha de 4-11-2008).

En otra forma de realización, el agente que induce actividad CT-1 es una variante funcionalmente equivalente de CT-1. La expresión "variante funcionalmente equivalente de CT-1", según se usa aquí, se entiende como toda molécula que comparte con CT-1 una o más de las funciones descritas en la presente invención asociadas a CT-1, tanto *in vitro* como *in vivo* y que presenta un mínimo de identidad en la secuencia aminoacídica del 90%. Así, variantes de CT-1 adecuadas para su uso en la presente invención derivan de las secuencias anteriormente definidas mediante inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos e incluyen alelos naturales, variantes resultantes de procesamiento alternativo y formas secretadas y truncadas que aparecen de forma natural. Las variantes de CT-1 muestran una identidad de secuencia con CT-1 de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad se determina usando métodos muy bien conocidos para los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)] empleando preferiblemente los parámetros por defecto. Por otro lado, las variantes de CT-1 contempladas muestran al menos una de las funciones de CT-1 tales como, sin limitación:

- La capacidad de reducir el peso corporal en ratones tanto cuando han sido alimentados con una dieta normal como cuando se ha inducido obesidad mediante una dieta rica en grasas. Métodos para determinar la capacidad de un compuesto de provocar una disminución del peso corporal han sido descritos extensivamente en el estado de la técnica e incluyen métodos tales como el descrito en el ejemplo 1 de la presente invención. En el caso de la determinación de la pérdida de peso en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, se puede utilizar cualquier dieta rica en grasas conocida en el estado de la técnica tal y como las dietas denominadas D12450B o LFD que aporta un 10% de kilocalorías en forma de grasa, la dieta D12451 o (HFD) que aporta un 45% de kilocalorías en forma de grasas o la dieta D12492 (VHFD) que aporta un 60% de kilocalorías en forma de grasa.

- la capacidad de inducir un efecto anorexígeno, que se puede determinar usando el método descrito en el ejemplo 1 de la presente invención o utilizando el método descrito en WO2007093363.

- la capacidad de disminuir el cociente respiratorio, que se define como la relación entre los valores de V_{O_2} y V_{CO_2} . Este parámetro puede ser determinado usando cualquier método conocido en el estado de la técnica.

- la capacidad de impedir la elevación de la lipidemia (tanto en cuanto a triglicéridos como en cuanto a ácidos grasos libres) tras una dieta rica en grasas, para lo que se usan métodos estándar para determinar la concentración de ácidos grasos y de triglicéridos en plasma, preferiblemente mediante el uso de kits comerciales.

- la capacidad hipoglucemiante directa, o tras una dieta rica en azúcares o tras la destrucción pancreática, lo que puede ser determinado mediante el empleo de kits comerciales de detección de glucosa. La destrucción pancreática puede ser provocada por estreptozotocina tal y como se describe en el ejemplo 3 de la presente invención o mediante el uso de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, el cóctel formado por IL-1b, TNF-a e IFN- γ descrito por Choi et al. en *Transplant Immunol.*, 2004, 13: 43-53).

- la capacidad de provocar un aumento de la captación de glucosa por músculos, en la que dicha actividad se determina usando el método descrito en el ejemplo 3 de la presente solicitud basado en la capacidad de los músculos gastrocnemios de absorber un análogo marcado de glucosa o usando métodos no isotópicos tales como el descrito por Ueyama et al. (*Biol. Signals Recept* 2000; 9: 267-274).

- la capacidad de inhibir los efectos de la insulina sobre la captación de glucosa y la liberación de leptina por el tejido adiposo, para lo que se pueden emplear tanto cultivos primarios de adipocitos como líneas celulares fibroblásticas que se han tratado para promover su diferenciación en adipocitos. La liberación de glucosa por parte de los adipocitos puede llevarse a cabo mediante el uso de kits comerciales para la detección de glucosa. La determinación de leptina se puede llevar a cabo mediante inmunoensayos (ELISA, radioinmunoensayo, etc.) usando kits comerciales.

En otra forma de realización, el agente capaz de inducir la actividad CT-1 es un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiera a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares).

Polinucleótidos adecuados para su uso como agentes capaz de inducir la actividad CT-1 incluyen, sin limitación, los polinucleótidos cuyas secuencias corresponden a las descritas en la base de datos GenEMBL con números de acceso BC064416 en la versión 9 con fecha de 15-10-2008, correspondiente a la variante 1 del transcrito de cardiotrofina humana, BC036787 en la versión 9 con fecha de 12-8-2009, correspondiente a la variante 1 del transcrito de cardiotrofina humana, la secuencia descrita en la base de datos GenEMBL con número de acceso D78591, en su versión 4 del 12-1-2009, correspondiente al polinucleótido que codifica la cardiotrofina 1 de *Rattus norvegicus* (rata), la secuencia descrita en la base de datos GenEMBL con número de acceso AY518205, en su versión 3 del 12-1-2009, correspondiente al polinucleótido que codifica la cardiotrofina 2 de *Rattus norvegicus* (rata), la secuencia descrita en la base de datos GenEMBL con número de acceso U18366, en su versión 4 del 12-1-2009, correspondiente al polinucleótido que codifica la cardiotrofina 1 de *Mus musculus* (ratón), la secuencia descrita en la base de datos GenEMBL con número de acceso AB125661, en su versión 2 del 12-1-2009, correspondiente al polinucleótido que codifica la cardiotrofina 2 de *Mus musculus* (ratón).

Alternativamente, los agentes capaces de inducir la actividad CT-1 incluyen variantes funcionalmente equivalentes de los polinucleótidos definidos anteriormente por medio de sus secuencias específicas. Por "polinucleótido funcionalmente equivalente" se entiende, en el contexto de la presente invención, todos aquellos polinucleótidos capaces de codificar un polipéptido con actividad CT-1, según se ha definido anteriormente y que resultan de los polinucleótidos definidos anteriormente por medio de la inserción, delección o sustitución de uno o varios nucleótidos con respecto a las secuencias definidas anteriormente. Preferiblemente, los polinucleótidos variantes de la presente invención son polinucleótidos cuya secuencia les permite hibridar en condiciones altamente restrictivas con los polinucleótidos definidos anteriormente. Condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas incluyen la incubación en 6 X SSC (1 X SSC: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40% a 42 °C durante 141 horas, seguido de uno o varios ciclos de lavado usando 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Alternativamente, condiciones altamente restrictivas incluyen aquellas que comprenden hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55° C en 6 X SSC y un lavado final a una temperatura de 68° C en 1-3 X SSC. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50° C hasta unos 65° C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguida de lavado a aproximadamente 50° C hasta unos 55° C en 0,2X SSC, SDS 0,1% (sulfato de dodecil sodio).

Preferiblemente, cuando el agente que es capaz de inducir la actividad CT-1 es un polinucleótido, este se encuentra operativamente asociado a una región reguladora de la expresión. Las secuencias reguladoras de utilidad para la presente invención pueden ser secuencias de promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea expresión constante de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rous y similares. Numerosos otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en el estado de la técnica y se pueden emplear en la práctica de la invención. Si desea la expresión controlada de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se debe utilizar un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible está "silencioso". Mediante "silencioso" se quiere decir que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico; en presencia de un inductor, sin embargo, se produce la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Con frecuencia, se puede controlar el nivel de expresión

variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo variando la concentración del inductor de modo que un promotor inducible se estimule de forma más fuerte o más débil, se puede afectar la concentración del producto transcrito de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En el caso en el que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un gen, se puede controlar la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor de estrógeno o andrógeno, un promotor de metalotioneínas, o un promotor que responde a ecdisona. Muchos otros ejemplos son bien conocidos en el estado de la técnica y se pueden utilizar en la práctica de la invención. Además de los promotores constitutivos e inducibles (que suelen funcionar en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para alcanzar expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico específica en células o tejidos. Ejemplos bien conocidos de promotores específicos de tejido incluyen varios promotores específicos de músculo incluyendo: el promotor de la α -actina esquelética, el promotor de la actina cardiaca, promotor de la troponina C esquelética, promotor de la troponina C cardiaca de contracción lenta y el promotor/potenciador de la creatina cinasa. Existen numerosos promotores específicos de músculo que son bien conocidos en el estado de la técnica y que se pueden emplear en la práctica de la invención (para una revisión en promotores específicos de músculo, ver Miller et al., (1993) *Bioessays* 15: 191-196).

En otra forma de realización, el agente capaz de inducir la actividad CT-1 es un vector que comprende un polinucleótido tal y como se ha definido anteriormente, es decir, que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Vectores adecuados para la inserción de dichos polinucleótidos son vectores derivados de vectores de expresión en procariontes tales como pUC18, pUC19, pBluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCRI, RP4, fagos y vectores "lanzadera" tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micrómetros, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

En otra forma de realización, el agente capaz de provocar un aumento de la actividad CT-1 es una célula capaz de secretar al medio cardirotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Células adecuadas para la expresión de cardirotrofina-1 o de la variante funcionalmente equivalente de la misma incluyen, sin limitación, cardiomiocitos, adipocitos, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos (células B y T), mastocitos, eosinófilos, células de la íntima vascular, cultivos primarios de células aisladas de distintos órganos, preferentemente de células aisladas de los islotes de Langerhans, hepatocitos, leucocitos, incluyendo leucocitos mononucleares, mesenquimales, de cordón umbilical o adultos (de piel, pulmón, riñón e hígado), osteoclastos, condrocitos y otras células del tejido conectivo. También son adecuadas células de líneas establecidas tales como células T de Jurkat, células NIH-3T3, CHO, Cos, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, mioblastos C2C12 y células W138.

El experto en la materia apreciará que las células capaces de secretar al medio cardirotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma pueden encontrarse formando micropartículas o microcápsulas de forma que las células presenten una mayor vida útil antes de ser utilizadas en pacientes. Materiales adecuados para la formación de las micropartículas que son un objeto de la invención incluyen cualquier material polimérico biocompatible que permita la secreción continua de los productos terapéuticos, que actúe como soporte de las células. Así, dicho material polimérico biocompatible puede ser, por ejemplo, polímeros termoplásticos o polímeros hidrogel. Los polímeros termoplásticos incluyen ácido acrílico, acrilamida, 2-aminoetil metacrilato, poli(tetrafluoroetileno-cohexafluorpropileno), éster etílico de ácido metacrílico-(7-cumaroxi), N-isopropil acrilamida, ácido poliacrílico, poliacrilamida, poliamidoamina, poli(amino)-p-xilileno, poli(éter cloroetilvinílico), policaprolactona, poli(caprolactona-co-trimetileno carbonato), poli(carbonato urea) uretano, poli(carbonato) uretano, polietileno, copolímero de polietileno y acrilamida, polietilenglicol, metacrilato de polietilenglicol, poli(etileno tereftalato), poli(acrilato de 4-hidroxibutilo), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(metacrilato de N-2-hidroxipropilo), poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido L láctico), poli(gamma-metil, L-glutamato), poli(metacrilato de metilo), poli(propileno fumarato), poli(óxido de propileno), polipirrol, poliestireno, poli(tetrafluoro etileno), poliuretano, alcohol polivinílico, polietileno de peso molecular ultraalto, 6-(p-vinilbenzamido)-ácido hexanoico y N-p-vinilbencil-D-maltonamida y copolímeros que contienen más de uno de dichos polímeros. Los polímeros del tipo hidrogel incluyen materiales naturales del tipo alginato, agarosa, colágeno, almidón, ácido hialurónico, seroalbúmina bovina, celulosa y sus derivados, pectina, condroitín sulfato, fibrina y fibroína, así como hidrogel sintéticos como sefarosa y sefadex.

Se conoce en el estado de la técnica que algunos de dichos polímeros son inestables y tienden a perder su carácter de gel, además de ser relativamente porosos lo significa que los anticuerpos pueden acceder a su interior y dañar las células. Por estos motivos, opcionalmente, la micropartícula de la invención puede estar rodeada de una membrana semipermeable que confiera estabilidad a las partículas, que forme una barrera impermeable a los anticuerpos. Membrana semipermeable significa una membrana que permite la entrada de todos aquellos solutos necesarios para la viabilidad celular y que permite la salida de las proteínas terapéuticas producidas por las células contenidas dentro de la micropartícula, pero que es sustancialmente impermeable a los anticuerpos, de forma que las células están protegidas de la respuesta inmune producida por el organismo que alberga la micropartícula.

Materiales adecuados para formar la membrana semipermeable son materiales insolubles en fluidos biológicos, preferentemente poliamino ácidos, como por ejemplo poli-L-lisina, poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-asparagina, poli-L-aspártico, poli bencil-L-aspartato, poli-S-bencil-L-cisteína, poli-gamma-bencil-L-glutamato, poli-S-CBZ-L-cisteína, poli-ε-CBZ-D-lisina, poli-δ-CBZ-DL-ornitina, poli-O-CBZ-L-serina, poli-O-CBZ-D-tirosina, poli(γ-etil-L-glutamato), poli-D-glutámico, poliglicina, poli-γ-N-hexil L-glutamato, poli-L-histidina, poli(α,β-[N-(2-hidroxi-etil)-DL-aspartamida]), poli-L-hidroxiprolina, poli(α,β-[N-(3-hidroxipropil)-DL-aspartamida]), poli-L-isoleucina, poli-L-leucina, poli-D-lisina, poli-L-fenilalanina, poli-L-prolina, poli-L-serina, poli-L-treonina, poli-DL-triptófano, poli-D-tirosina o una combinación de los mismos.

El término "enfermedad metabólica", según se usa aquí, se entiende como todo tipo de trastornos que conducen a errores y desequilibrios en el metabolismo así como a que procesos metabólicos ocurran de una forma sub-óptima. La expresión se refiere también a trastornos que pueden ser tratados mediante la modulación del metabolismo aunque la enfermedad en sí puede no haber sido causada por una alteración metabólica. En una forma de realización preferida, la enfermedad metabólica se selecciona del grupo de obesidad, hiperglucemias, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y dislipemias.

El término "obesidad", según se usa en la presente invención, se refiere a la definición de obesidad proporcionada por la OMS basada en el índice de masa corporal (IMC), que consiste en la relación entre el peso de una persona (en kg) y el cuadrado de su altura en metros. Según este criterio, un IMC inferior a 18,5 kg/m² se considera como peso insuficiente o delgadez, un IMC de 18,5-24,9 kg/m² se considera normopeso, un IMC de 25,0-29,9 kg/m² se considera como sobrepeso en grado 1, un IMC de 30,0-39,0 kg/m² se considera obesidad o sobrepeso en grado 2 y un IMC mayor o igual a 40,0 kg/m² se considera como obesidad mórbida. Alternativamente, existen métodos alternativos para definir el grado de obesidad de un individuo, tales como el diámetro de la cintura medida en el punto medio entre el límite inferior de las costillas y el límite superior de la pelvis (en cm), el grosor de los pliegues de la piel y bioimpedancia, basada en el principio de que una masa magra transmite la electricidad mejor que una masa grasa.

El término "hiperglucemia", según se usa en la presente invención, se refiere a un estado donde aparecen niveles anormalmente elevados de glucosa en sangre en relación con los niveles basales en ayunas. En concreto, se entiende que tiene lugar hiperglucemia cuando los niveles en ayunas de glucosa en sangre son consistentemente superiores a 126 mg/dl, los niveles postprandiales de glucosa son superiores a 140 mg/dl y/o los niveles de glucosa en plasma venoso 2 horas tras la administración de una dosis de glucosa de 1,75 gramos por cada kilogramo de peso corporal son superiores a 200 mg/dl.

El término "resistencia a la insulina", según se usa en la presente invención, se refiere a un trastorno en el que las células no responden correctamente a la insulina. Como resultado, el cuerpo produce más insulina en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre. Los pacientes con resistencia a insulina muestran frecuentemente altos niveles de glucosa y altos niveles de insulina circulante. La resistencia a insulina se encuentra frecuentemente ligada a la obesidad, hipertensión e hiperlipidemia. Adicionalmente, la resistencia a insulina aparece de forma frecuente en pacientes con diabetes de tipo 2.

El término "diabetes tipo 2", según se usa en la presente invención, se refiere a una enfermedad caracterizada por una elevación inapropiada de los niveles de glucosa en sangre, que genera complicaciones crónicas porque afecta vasos y nervios grandes y pequeños. La alteración subyacente en esta enfermedad es la dificultad para la acción de la insulina (en forma de una pérdida de sensibilidad de los tejidos a esta hormona) que se denomina insulinoresistencia y una secreción inadecuada de insulina por las células encargadas de su producción en el páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos.

El término "dislipemia", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier condición patológica caracterizada por una alteración en el metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos (colesterol, triglicéridos y similares) y lipoproteínas (lipoproteínas de alta densidad) en la sangre. Dislipemias que pueden ser tratadas con los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia de tipo I, IIa, IIb, III, IV, V, hiperquilomicronemia, hiperlipidemia combinada, etc.

Las composiciones de la invención son útiles tanto para el tratamiento de la obesidad mórbida como para el tratamiento de sobrepeso de grado 1 o de grado 2, en cuyo caso los métodos de la invención tienen un propósito cosmético. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método cosmético para el tratamiento de la obesidad que comprende administrar a un paciente un compuesto que induce la actividad cardiotrofina 1. En esta forma de realización, los pacientes que tienen exceso de peso en forma de grasa y que pueden ser tratados mediante el método cosmético de la presente invención son identificados visualmente o porque presentan un IMC superior o igual a 25 kg/m², preferiblemente entre 25 y 30. Estos individuos se consideran obesos y necesitan un control del peso por motivos cosméticos.

Las distintas formas de realización del método cosmético de acuerdo a la invención en cuanto a los agentes capaces de inducir la actividad cardiotrofina-1 han sido descritos con anterioridad en el contexto de los métodos de

tratamiento de la obesidad y de otras enfermedades metabólicas.

Los compuestos de la invención pueden administrarse tanto de forma aguda como de forma crónica. La expresión “administración crónica”, según se usa en la presente invención, se refiere a un método de administración en el que el compuesto se administra al paciente de forma continua durante periodos extendidos de tiempo con el fin de mantener el efecto terapéutico durante dicho periodo. Las formas de administración crónica incluyen la administración de múltiples dosis del compuesto de forma diaria, dos veces al día, tres veces al día o con más o menos frecuencia. La administración crónica puede llevarse a cabo mediante varias inyecciones intravenosas administradas de forma periódica a lo largo de un solo día. Alternativamente, la administración crónica implica la administración en forma de bolo o mediante transfusión continua que puede llevarse a cabo diariamente, cada dos días, cada 3 a 15 días, cada 10 días o más. Típicamente, la administración crónica se mantiene durante al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 120 horas, al menos 144 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos un año, al menos 2 años o más.

La expresión “administración aguda”, según se usa en la presente invención, se refiere a un método de administración en el que el paciente se ve expuesto a una única dosis del compuesto o bien a varias dosis pero durante un reducido periodo de tiempo, como, por ejemplo, 1, 2, 4, 6, 8, 12 o 24 horas o 2, 3, o 4 días.

Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad terapéuticamente efectiva y/o la formulación del compuesto activo se llevará(n) a cabo dependiendo del tipo de administración. Por “cantidad terapéuticamente efectiva”, según se usa aquí, se entiende la cantidad de compuesto que permite aliviar total o parcialmente los síntomas asociados con una enfermedad metabólica o que impide la progresión o el empeoramiento de los síntomas o que previene la aparición de la enfermedad en un sujeto en riesgo de sufrir la enfermedad.

En el caso de que se desee una administración crónica del compuesto de la invención, este puede administrarse en una composición de liberación sostenida tales como las descritas en los documentos US5672659, US5595760, US5821221, US5916883 y WO9938536. Por el contrario, si se desea la administración aguda, se preferirá un tratamiento con una forma de liberación inmediata. Independientemente del tipo de administración, la cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de los compuestos suficientes para mantener el efecto terapéutico. Alguien con una experiencia normal en la técnica será capaz de optimizar las dosis locales terapéuticamente eficaces sin demasiada experimentación.

La administración de los compuestos de la invención requiere de su formulación en composiciones farmacéuticas, que constituyen otro aspecto de la invención. Las composiciones farmacéuticas útiles en la práctica del método de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. El término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o de estado o incluido en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente, para usar en animales y más particularmente en humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los aceites de origen petrolífero, animal o vegetal o los sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglomerantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como tipos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin.

La composición se puede formular conforme a procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular a seres humanos. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición vaya a administrarse por infiltración, puede dispensarse con un frasco de infiltración que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua para inyección o solución salina estéril, de tal forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La cantidad de compuesto inductor de la actividad CT-1 que será eficaz en el tratamiento de la enfermedad metabólica puede determinarse por técnicas clínicas estándar basadas en la presente descripción. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y la gravedad de la afección y debe decidirse conforme al juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de

dosificación adecuados para administración intravenosa son generalmente aproximadamente 50-5000 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente aproximadamente de 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de un par de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas modelo de ensayo *in vitro* o en animales.

Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} que se haya determinado en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en humanos. Las dosificaciones iniciales pueden estimarse también a partir de datos *in vivo*, p.ej., modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en el estado de la técnica. Alguien con una experiencia normal en el estado de la técnica podrá optimizar fácilmente la administración a humanos basada en los datos en animales.

Asimismo, la invención contempla el uso combinado del agente capaz de inducir la actividad CT-1 con uno o varios compuestos capaces de reducir la disponibilidad de nutrientes en el organismo, que tienen efecto anorexígeno o que presentan un efecto anti-obesidad. Así, los métodos de tratamiento de enfermedades metabólicas de acuerdo a la invención contemplan la administración conjunta, secuencial o separada de los compuestos con capacidad de inducir la actividad CT-1 con uno o varios compuestos seleccionados del grupo de amilina, agonistas análogos de amilina, calcitonina de salmón, coleocistocina o un agonista de la misma, leptina (proteína OB), exendina o un análogo de exendina, GLP1 o un agonista del mismo, polipéptidos (PYY) o agonistas de los mismos, agentes que afectan a neurotransmisores o a canales iónicos neuronales tales como antidepresivos, inhibidores de la captación de noradrenalina, agonistas del receptor de serotonina 2c, algunos antagonistas dopaminérgicos, antagonistas del receptor de cannabinoides 1, agentes que modulan la ruta de leptina/insulina en el SNC incluyendo análogos de leptina, promotores del transporte de leptina o promotores del receptor de leptina, CNTF, neuropéptido Y, antagonistas del péptido relacionado con agutí, pro-opiomelanocortina, cocaína, anfetamina, análogos de la hormona estimuladora de melanocitos alfa, agonistas del receptor de melanocortina-4, agentes que afectan la actividad/metabolismo de la insulina tales como inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1 beta, antagonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 7, bromocriptina, agonistas de la somatostatina, agentes que aumentan la tasa metabólica en reposo (agonistas de la proteína desacoplante, agonistas del receptor de hormonas tiroideas) así como otros agentes de distinto tipo tales como melanina, análogos de fitoestanol, aceites funcionales, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, inhibidores de la carboxipeptidasa, inhibidores de la lipasa intestinal y similares.

Composiciones de la invención

Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la administración conjunta de CT-1 y de insulina tiene efectos hipoglucemiantes en modelos de diabetes tipo 1 y sobre la captación de glucosa por músculos que son superiores a los que se observan mediante la administración de cada uno de los componentes por separado. Así, la figura 7 muestra como el tratamiento de ratones sometidos a la destrucción experimental de las células beta pancreáticas con estreptozotocina con una combinación de CT-1 e insulina resulta en un efecto hipoglucemiante superior al que se observa tras la administración de cada uno de los componentes por separado. Adicionalmente, la figura 8 muestra como la combinación de CT-1 e insulina provoca un aumento en la captación de glucosa por músculos superior a la observada con cualquiera de los compuestos administrados por separado.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición (en adelante, composición de la invención) que comprende, juntos o separados, un compuesto que induce la actividad cardiotrofina y un compuesto anti-diabético.

La expresión "compuesto que induce la actividad cardiotrofina" ha sido descrito con anterioridad en el contexto de los métodos de tratamiento de enfermedades metabólicas y comprende, como en el primer método de la invención, un compuesto seleccionado del grupo de

- (i) Cardiotrofina-1 (CT-1),
- (ii) una variante funcionalmente equivalente de CT-1,
- (iii) un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo,
- (iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii) y
- (v) una célula capaz de secretar al medio cardiotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

en el que los distintos compuestos han sido descritos en detalle anteriormente.

La expresión "compuesto anti-diabético", según se usa en la presente invención, se entiende como un agente que, independientemente de su mecanismo de acción, es capaz de compensar al menos parcialmente los síntomas de la

diabetes, incluyendo la hiperglucemia. En una forma preferida de realización, el compuesto anti-diabético es un compuesto que induce la actividad de insulina o un compuesto que induce la actividad hipoglucemiante de la insulina o un agente sensibilizador a la actividad de la insulina.

Los compuestos anti-diabéticos capaces de inducir la actividad de insulina incluyen, sin limitación,

- 5 (i) insulina,
- (ii) una variante funcionalmente equivalente de la insulina
- (iii) un polinucleótido que codifica insulina o una variante funcionalmente equivalente de la misma
- (iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii)
- (v) una célula capaz de secretar al medio insulina o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

10 El término "insulina", según se usa en la presente invención, se refiere a insulina de cualquier especie (primate, roedor o conejo), pero preferiblemente de origen humana y más preferiblemente insulina de secuencia nativa, que comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la insulina derivada de la naturaleza. Tales polipéptidos de insulina de secuencia nativa pueden aislarse a partir de la naturaleza o pueden producirse mediante medio recombinante y/o sintético. El término "insulina de secuencia nativa" abarca específicamente las
15 formas truncadas o secretadas y las variantes alélicas que se dan de forma natural. En una realización de la invención, la insulina humana de secuencia nativa es una insulina de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprende una cadena alfa o A, correspondiente a los aminoácidos 90 a 110 de la secuencia de la preproinsulina humana (número de acceso P01308 en la base de datos UniProtKB en la versión 126 con fecha de 20-1-2009) y una cadena beta o B, correspondiente a los aminoácidos 25 a 54 (número de acceso P01308 en la
20 base de datos NCBI en la versión 126 con fecha de 20-1-2009).

Por "variante funcionalmente equivalente de la insulina", según se usa en la presente invención, se entienden todos aquellos polipéptidos resultantes de la eliminación, inserción o modificación de al menos un amino ácido con respecto a la secuencia de la insulina y que mantiene sustancialmente las mismas propiedades que la insulina de la que procede. La actividad de la insulina puede determinarse mediante métodos ampliamente conocidos para un
25 experto en la materia tales como el pinzamiento normoglucémico o la medida de proteínas glucosiladas en suero (Bunn et al., Diabetes, 1981, 30: 613-617).

Variantes funcionalmente equivalentes de insulina incluyen, sin limitación, la des-pentapéptido (B26-B30)-Phe^{B25}- α -carboxamida]insulina, Asp^{B10} insulina (divulgada en el documento US4992417), Lys^{B28}-Pro^{B29} insulina Lys^{B28}-Pro^{B29} y la variante hexamérica de la misma (divulgada en los documentos US5474978 y US5514646), formulaciones de
30 insulina y protamina (documento US5650486), insulina Lys^{B28}-Pro^{B29} acilada (documento US5922675) y composiciones de insulina estabilizada tales como las descritas en los documentos US5952297, US6034054 y US6211144, análogos superactivos de insulina, insulinas monoméricas, insulinas hepatospecíficas, insulina lispro (Humalog®), insulina lispro formulada con insulina lispro protamina (comercializada como Humalog @50/50TM, Humalog® 75/25TM), insulina NPH o insulina isofana humana (comercializada como Humulin®), insulina regular,
35 insulina NPH combinada con insulina regular (documento US5547929), insulina cinc, insulina glargina, glulisina (APidra), insulina Aspart (Novomix), insulina detemir (levemir), biota, LP-100, novarapida, suspensión de insulina cinc (lenta y ultralenta), GLP-I (1-36) amida, GLP-I (73-7) (insulinotropina descrita en el documento US5614492), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH₂, AL-401 (Autoimmune), composiciones tales como las descritas en los documentos US4579730, US4849405, US4963526, US5642868, US5763396, US5824638, US5843866, US6153632,
40 US6191105 y WO 85/05029.

Adicionalmente, variantes funcionalmente equivalentes de insulina incluyen polipéptidos que muestran al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de: (a) los residuos 1 a 21 de la cadena A de la dieta rica en grasas en combinación con los residuos 1 a 30 de la cadena-B de
45 dieta rica en grasas o (b) otro fragmento específicamente derivado de dichas secuencias. Además, la estructura secundaria de la insulina mantenida por enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína A6-A11, A7-B7 y A20-B19 parece ser necesaria para la actividad, por lo que las variantes funcionalmente equivalentes preferiblemente preservan dicha estructura secundaria tanto como sea posible.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la insulina incluyen, por ejemplo, los polipéptidos en donde uno o más residuos aminoácidos se añaden, o se suprimen, en los extremos N- y/o C-terminales, así como dentro de uno o
50 más de los dominios internos, de las cadenas A y B de la insulina. De forma ordinaria, una variante polipeptídica de la insulina tendrá al menos aproximadamente una identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia formada por los residuos 1 a 21 de la cadena A de la dieta rica en grasas en combinación con los residuos 1 a 30 de la cadena B de la dieta rica en grasas o con otro fragmento específicamente derivado de dichas secuencias de aminoácidos de al menos un 80%, un 82%, un 83%, un 84%, un 85%, un 86%, un 87%, un 88%, un 89%, un 90%,
55 un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos variantes tendrán una longitud de secuencia de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de la cadena A y al menos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,

34, 35, 36, 27, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 residuos de la cadena B.

Polinucleótidos que codifican insulina incluyen tanto el polinucleótido que codifica insulina humana como los precursores de la misma (preproinsulina y proinsulina), así como los ortólogos de otras especies.

5 "Polinucleótido que codifica una variante funcionalmente equivalente de la insulina" indica (a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de insulina activa según se definió más arriba y que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica: (a) los residuos 1 a 21 de la cadena A de la dieta rica en grasas definida anteriormente en combinación con los residuos 1 a 30 de la cadena B del polipéptido de insulina humana definido anteriormente, o (b) uno de ácido nucleico que codifica otro fragmento específicamente derivado de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente que muestra al
10 menos un 80%, un 82%, un 83%, un 84%, un 85%, un 86%, un 87%, un 88%, un 89%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con dichas secuencias. Los polinucleótidos que codifican una variante de insulina contienen un ácido nucleico que codifica una cadena A de insulina de al menos aproximadamente 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 81, 87, 105 nucleótidos y/o un ácido nucleico que codifica una cadena B de insulina de al menos aproximadamente 75, 78, 81,
15 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132, 135 o 150 nucleótidos.

Dichos polinucleótidos pueden aparecer de forma aislada o encontrarse formando parte de un vector. Vectores adecuados para la expresión de los polinucleótidos que codifican insulina o la variante funcionalmente equivalente de la misma son esencialmente los mismos que se han descrito anteriormente en relación a la composición que comprende CT-1.

20 Alternativamente, los compuestos anti-diabéticos que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen compuestos que inducen la actividad antigluceante de la insulina o sensibilizadores de la actividad de la insulina e incluyen, sin limitación, secretagogos de insulina tales como las sulfonilureas (tolbutamida, clorpropamida, glipicida, glibenclamida, glicazida, glipentida, glimepirida, glibenclamida, glipizida, gliquidona, glisentida, glimeprida y similares) y las metiglinidas (repaglinida, nateglinida, mitiglinida y similares), agentes reductores de la producción hepática de glucosa (biguanidas y en particular, metformina y buformida), agentes que provocan la disminución de
25 carbohidratos tales como los inhibidores de las α -glucosidasas (acarbosa, miglitol o voglibosa), agentes que aumentan la utilización periférica de glucosa tales como las tiazolidindionas (rosiglitazona, pioglitazona y similares), GLP- o un mimético de GLP-1 (Byetta-Exanatido, Liraglutinido, CJC-1131 (ConjuChem, Exanatida-LAR (Amilina), BIM-51077, ZP-10, los compuestos descritos en el documento WO 00/07617 y similares), exendina, secretina, inhibidores de DPP-IV (sitagliptina, saxagliptina, denagliptina, vildagliptina, ALS-2-0426, ARI-2243, BI-A, BI-B, SYR-322, MP-513, DP-893, RO-0730699 y similares), inhibidores de SGLT-2 (dapagliflozina y sergliflozina, AVE2268, T-1095 y similares) y péptidos que provocan un aumento de la producción de glucosa (amlintida, pramlintida, exendina), compuestos que presentan actividad GLP-1 (péptido similar a glucagón 1), inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B, inhibidores de la dipeptidilpeptidasa, secretagogos de la insulina; inhibidores de la oxidación de ácidos grasos, antagonistas A2, inhibidores de la cinasa terminal c-jun, insulina; miméticos de insulina, inhibidores de la glucógeno fosforilasa, agonistas del receptor VPAC2, activadores de la glucocinasa, etc.).

Las composiciones de la invención pueden ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades metabólicas dados sus efectos hipoglucemiantes y su capacidad de aumentar la captación de glucosa por parte músculos (véase ejemplo 2). Dichas composiciones pueden ser utilizadas como preparaciones de los distintos componentes para su administración de forma simultánea, separada o secuencial. Por tanto, en otro aspecto, la invención está relacionada con una composición de la invención para el tratamiento de una enfermedad metabólica en la que la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial. En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad metabólica en la que la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial. En otro aspecto, la
40 invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad metabólica que comprende la administración simultánea, separada o secuencial de una composición de la invención.

Los agentes terapéuticos de las composiciones de la invención, en concreto, el agente inductor de la actividad CT-1 y el agente anti-diabético, pueden presentarse como una única formulación (por ejemplo, como un comprimido o cápsula que comprende una cantidad fija de cada uno de los componentes) o, por el contrario, pueden presentarse como formulaciones separadas para posteriormente combinarlos para su administración conjunta, secuencial o separada. Las composiciones de la invención también incluyen la formulación como un kit-de-partes en el que los componentes se formulan separadamente pero se empaquetan en un mismo contenedor. Los expertos en la materia apreciarán que las formulaciones del primer y segundo componentes de las composiciones de la invención pueden ser similares, es decir, formulados de manera semejante (en comprimidos o en píldoras), lo que permite su administración por la misma vía. En el caso en el que los distintos componentes de la invención se formulan separadamente, los dos componentes se pueden presentar en un blíster. Cada blíster contiene los fármacos que tienen que ser consumidos durante el día. Si los fármacos tienen que ser administrados varias veces al día, se pueden disponer los fármacos correspondientes a cada administración en distintas secciones del blíster, preferiblemente anotando en cada sección del blíster el momento del día en el que deben ser administrados.
50 Alternativamente, los componentes de la composición de la invención pueden ser formulados de forma distinta de manera que los distintos componentes se administren de forma distinta. Así, es posible que el primer componente se
55 60

formule como un comprimido o cápsula para su administración oral y que el segundo componente se formule para su administración intravenosa.

Las composiciones de la invención se administran mediante los métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, sin limitación, intravenosa, oral, nasal, parenteral, tópica, transdérmica, rectal y similares.

- 5 La relación entre los componentes que forman parte de las composiciones de la invención dependerá del agente inductor de la actividad CT-1 y del agente antidiabético usado en cada caso en particular, así como de la indicación deseada. Así, la invención contempla composiciones en las que la relación entre las cantidades de los dos componentes puede oscilar entre 50:1 y 1:50, en particular entre 20:1 y 1:20, entre 1:10 y 10:1, o entre 5:1 y 1:5.

- 10 Las enfermedades metabólicas que pueden ser tratadas con las composiciones de la invención incluyen, sin limitación, obesidad, resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipemia y diabetes tipo 2, tal y como ha sido descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención (usos terapéuticos y cosméticos de CT-1). En otra forma de realización, la invención se relaciona con un método cosmético para el tratamiento de la obesidad que comprende administrar a un paciente una composición de acuerdo a la invención, en donde los pacientes aspirantes a recibir un tratamiento anti-obesidad por motivos puramente cosméticos se identifican tal y como se ha descrito en el primer aspecto de la invención (usos terapéuticos y cosméticos de CT-1).

- 15 La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deber ser considerados como meramente ilustrativos y en ningún caso limitadores del ámbito de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Efecto de CT-1 sobre el peso corporal

Se obtuvieron ratones obesos mediante la ingesta de una dieta rica en grasas (HFD, 60% de grasa) durante 3 meses. La administración intravenosa durante 6 días consecutivos de rCT-1 (0,2 mg/kg/día) provocó una reducción en el peso corporal de ratones C57BL/6 (5 meses de edad) con dieta rica en grasas (HFD) (Fig. 1). La dosis utilizada en este experimento no produjo reacción febril (la temperatura rectal se midió durante todos los días de tratamiento).

- 25 La disminución del peso corporal observada en los ratones obesos, (alimentados con HFD al igual que lo descrito en la figura 1) y tratados con rCT-1 durante 6 días consecutivos a la dosis indicada anteriormente 0,2 mg/Kg/día, se debe al efecto anorexígeno de esta citocina (fig. 2). La figura muestra las kilocalorías ingeridas durante los 6 días de tratamiento del grupo tratado con rCT-1 y su correspondiente grupo control tratados con suero fisiológico de forma intravenosa (S).

- 30 Asimismo, la administración intravenosa de rCT-1 (0,2 mg/Kg/día) durante 6 días consecutivos reduce el peso corporal en ratones C57BL/6 (5 meses de edad) sin obesidad alimentados con dieta normal (NCD) (Fig. 3). La dosis utilizada en este experimento no produjo reacción febril (la temperatura rectal se midió durante todos los días de tratamiento).

- 35 Con el fin de determinar si la reducción de peso corporal observada durante el tratamiento con rCT-1 con la dosis y de la forma anteriormente comentada se debe a un efecto anorexígeno o implica otros efectos, se realizó un estudio empleando 3 grupos de ratones C57BL/6 de 4 meses de edad. El primer grupo (Grupo Salino) recibió por vía intravenosa suero fisiológico (el mismo volumen que el utilizado para la administración de rCT-1); el segundo grupo (grupo rCT-1) recibió por vía intravenosa rCT-1 a la dosis anteriormente comentada (0,2 mg/Kg/día) y el tercer grupo (Grupo Alimentado en paralelo) recibió la misma cantidad de comida diaria que la que ingerían los ratones tratados con rCT-1 y a los que se inyectó suero durante el mismo periodo experimental. Tal como se observa en la figura 4, los ratones tratados con rCT-1 perdieron más peso que el grupo alimentado en paralelo, a pesar de que la ingesta energética fue idéntica en ambos grupos, indicando que además del efecto anorexígeno observado anteriormente, rCT-1 tendría otros efectos metabólicos responsables de la pérdida de peso.

Ejemplo 2

45 Efectos hipoglucemiantes de CT-1

- Con el fin de determinar si la administración intravenosa aguda de una sola dosis de rCT-1 (10 µg) a ratones C57BL/6 (3 meses de edad) reduce los niveles basales de glucemia, se midieron los niveles de glucosa en sangre 1 hora después del tratamiento con rCT-1 y suero salino. Tal como se observa en la figura 5A, rCT-1 provocó una disminución significativa de los niveles de glucemia. El mecanismo por el que disminuyó la glucosa en sangre no puede ser atribuido a un aumento de los niveles de insulina en sangre (tal como se muestra en la figura 5B), puesto que no se observan diferencias apreciables en los niveles de insulina de los animales tratados con CT-1 o con suero salino. Los resultados se expresan como media ± ES. n=5 animales por grupo.*p < 0,05. El tratamiento con rCT-1 induce fosforilación de AKT en músculo, lo que puede contribuir a explicar la acción hipoglucemiante de esta citocina (la figura 5C muestra un western representativo).

La administración aguda de una sola dosis de rCT-1 (10 µg) impide la elevación de glucosa en sangre tras una dieta rica en azúcares. Este experimento para estudiar los efectos de rCT-1 sobre la glucemia post-pandrial fue realizado en ratones (C57BL/6, 3 meses de edad) a los que se administró por alimentación por sonda gástrica una dieta rica en azúcares (en un volumen al 1% del peso corporal) de acuerdo con lo publicado por Fruebis et al. (Fruebis et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 98: 2005-2010). Una vez realizada la alimentación por sonda, se procedió a la administración intravenosa de un mismo volumen de suero salino (solución salina) o rCT-1 (10 µg). A las horas indicadas en la gráfica se extrajo sangre y se procedió a la medición de glucemia observándose que en los animales tratados con rCT-1 no se producía ningún aumento de glucemia (Fig. 6).

A continuación, se determinó si administración aguda de una sola dosis de rCT-1 disminuye los niveles de glucemia en ratones (C57BL/6, 3 meses de edad) fue capaz de disminuir la hiperglucemia secundaria a la destrucción de células beta-pancreáticas realizada con tratamiento con estreptozotocina. Para ello, 64 horas tras la administración de una sola dosis de estreptozotocina (200 mg/kg), se midió glucemia basal y se procedió a realizar los distintos tratamientos en 3 grupos de ratones. El primer grupo (grupo salino) fue tratado con suero salino; el segundo grupo (grupo Insulina) fue tratado con insulina 0,75 U/Kg, el tercer grupo (grupo rCT-1) fue tratado con 10 µg de rCT-1 y el cuarto grupo (grupo Insulina + rCT-1) fue tratado con 0,75 U/Kg de insulina y 10 µg de rCT-1. Una vez administrados los distintos tratamientos, se procedió a medir la glucemia a los 15, 30, 60 y 120 min. Como se observa en la figura 7, rCT-1 disminuyó de forma significativa la glucemia a los 30 min de su administración y potenció los efectos de la insulina en todos los puntos de extracción de sangre analizados.

Con el fin de determinar si el efecto hipoglucemiante resultante del tratamiento agudo con rCT-1 se debe a un incremento de la captación de glucosa por músculos, se procedió a determinar la captación muscular de 18FDG (18 FluoroDeoxiGlucosa) mediante contador gamma en distintos grupos de ratones. Para la realización de este experimento, los ratones (C57BL/6, 3 meses de edad) se dividieron en 4 grupos como sigue: grupo Salino (tratado con suero salino); grupo Insulina (tratado con insulina 0,75 U/Kg), grupo rCT-1 (tratado con 10 µg de rCT-1) y grupo Insulina + rCT-1 (tratado con 0,75 U/Kg de insulina + 10 µg de rCT-1). A los 15 minutos tras la administración de los distintos tratamientos se procedió a la administración de 18FDG y posteriormente a los 10 minutos de la inyección se extrajeron los músculos gastrocnemios y se cuantificó la radioactividad emitida mediante contador gamma. Los resultados (Fig. 8) muestran que rCT-1 puede incrementar el consumo de glucosa por músculos y potenciar (aunque de manera no significativa con respecto a los observados con insulina).

A continuación se determinaron los efectos hipoglucemiantes e hipoinsulinémicos del tratamiento crónico con rCT-1 en ratones C57BL/6 (5 meses de edad) con obesidad inducida por la ingesta de una dieta rica en grasas (HFD, 60% de grasa) durante 3 meses. Al final del tratamiento dietético, los ratones fueron tratados durante 6 días consecutivos (tratamiento crónico) con rCT-1 (0,2 mg/Kg/día) administrado de forma endovenosa. Tal como demuestran la figura 9, los niveles de glucemia (panel superior) y de insulinemia (panel inferior) disminuyeron de forma significativa por tras tratamiento con rCT-1.

A continuación se compararon los efectos hipoglucemiantes e hipoinsulinémicos del tratamiento crónico con rCT-1 con su correspondiente grupo alimentado en paralelo (PF). El grupo rCT-1 recibió por vía intravenosa rCT-1 a la dosis anteriormente comentada (0,2 mg/Kg/día) durante 6 días; el grupo Alimentado en paralelo recibió la misma cantidad de comida diaria que la que ingerían los ratones tratados con rCT-1 y se le inyectó suero durante el mismo periodo experimental. Tal como demuestra la figura 10 se observó una mayor caída de la glucemia (panel superior) en animales sometidos a tratamiento crónico con rCT-1 que en los sometidos a una restricción calórica similar, sugiriendo que los efectos hipoglucemiantes no son debidos únicamente al efecto anorexígeno inducido por rCT-1, sino que parecen deberse a propiedades hipoglucemiantes de la proteína *per se*.

A continuación se determinó si el tratamiento *in vitro* con rCT-1 (0-100 ng/ml) es capaz de inhibir el transporte de azúcares en anillos intestinales. Para ello, se determinó el transporte intestinal de glucosa mediante la medida de la captación de α -metilglucósido (1 mM) por anillos de yeyuno evertidos durante 15 minutos de incubación en ausencia o presencia de r-CT-1 a 37° C. El α -metilglucósido es un análogo de la glucosa que solo atraviesa la membrana apical del enterocito mediante el co-transportador sodio-azúcar SGLT1, por lo que los cambios en su transporte deben atribuirse a cambios en la actividad de dicho transportador. La figura 11 demuestra que CT-1 es capaz de inhibir la absorción de glucosa en el intestino aunque el efecto observado no es dosodependiente.

A continuación, se compararon las acciones de CT-1 y CNTF sobre la captación de α -metilglucósido (1 mM) en anillos intestinales. Siguiendo el método experimental descrito en la figura 11, se observó que la acción inhibitoria de CT-1 sobre el transporte intestinal de glucosa es mayor que la de CNTF (que no llegó a alcanzar efectos significativos en las condiciones experimentales ensayadas).

A continuación, se determinó si los efectos *in vitro* de CT-1 sobre la captación intestinal de glucosa podían ser reproducidos *in vivo*. Para ello, se administró rCT-1 (10 µg) de forma intravenosa y aguda de a ratones C57BL/6 (2 meses de edad). Se observó que la administración de CT-1 provocó una inhibición del transporte intestinal de α -metilglucósido (1 mM) (Fig. 13). El aislamiento de los anillos intestinales y el transporte de α -metilglucósido (1 mM) por los mismos se realizaron a las 3 horas de la administración de CT-1. Los resultados obtenidos indican la capacidad de CT-1 de inhibir el transporte intestinal de glucosa cuando se administra de forma sistémica en el

animal y refuerzan los experimentos anteriores realizados *in vitro* que mostraban la capacidad de rCT-1 de inhibir el transporte de glucosa intestinal.

5 Posteriormente se determinó si la administración intravenosa de rCT-1 (0,2 mg/Kg/día) durante 6 días consecutivos (tratamiento crónico) a ratones C57BL/6 (5 meses de edad) era capaz de inhibir la captación de intestinal de α -metilglucósido (1 mM) en anillos intestinales en comparación con los procedentes de ratones tratados con suero salino. Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa como rCT-1 es capaz de inhibir el transporte de glucosa en intestino (tratamiento crónico *in vivo*).

10 A continuación, se determinó el efecto de rCT-1 sobre la captación de α -metilglucósido (0,1 mM) por células de la línea celular humana CACO-2. Los resultados (figura 15) demuestran que el tratamiento con rCT-1 provoca una inhibición concentración-dependiente de la captación de α -metilglucósido (0,1 mM) en la línea celular humana CACO-2, que se comporta funcionalmente como enterocitos humanos. El tratamiento con CT-1 se realizó desde el borde apical durante 1 h (Fig. 15A) y 24 h (Fig. 15B), observándose diferencias significativas con la dosis de 20 ng/ml en los dos tiempos de pre-incubación estudiados. Los resultados se expresan como media \pm ES de 42-44 determinaciones por grupo.

15 Ejemplo 3

Efectos diferenciales de CT-1 con CNTF

20 La figura 16 muestra los resultados de un experimento realizado en cultivos primarios de adipocitos de rata para determinar la capacidad de rCT-1 y CNTF de modular la secreción de leptina por parte de adipocitos. La figura 16A muestra como el tratamiento con rCT-1 (72 h) inhibe tanto la secreción basal de leptina como la estimulada por insulina (1,6 nM). Sin embargo, estos efectos no se observan con concentraciones similares de CNTF (figura 16B).

25 La figura 17 muestra los resultados de los experimentos realizados en cultivos primarios de adipocitos de rata para determinar la capacidad de CT-1 y CNTF de modular la lipólisis en ausencia o presencia de insulina. La figura demuestra que CT-1 es capaz de inducir la liberación de glicerol (medición de lipólisis) y además inhibe la actividad anti-lipolítica que posee la insulina, sin embargo CNTF no es capaz. Estos datos indican que CT-1 es capaz de movilizar grasa que además de la beta-oxidación incrementada en músculo mostrada anteriormente, indica la capacidad de esta citocina para disminuir los depósitos grasos.

30 De forma adicional y muy importante, CT-1 es capaz de inducir genes típicos de tejido adiposo pardo en adipocitos (deiodinasa iodotironina tipo II, Dio-2 y proteína desacopladora -1, UCP-1), mientras que CNTF no lo hace (figura 18). Varios estudios han mostrado que las terapias encaminadas a inducir genes típicos de tejido adiposo pardo en tejido adiposo blanco serían efectivas para aminorar las alteraciones relacionadas con la obesidad (Farmer S. Genes Dev. 2008; 22: 1269-7).

Ejemplo 4

La administración crónica de CT-1 no produce inflamación

35 Con el fin de determinar la capacidad de CT-1 de producir inflamación tras su administración crónica, se determinaron los niveles séricos de IL-6 en los ratones C57BL/6 (5 meses de edad) con obesidad inducida por la ingesta de una dieta rica en grasas (HFD, 60% de grasas) durante 3 meses. Al final del tratamiento dietético, los ratones fueron tratados durante 6 días consecutivos (tratamiento crónico) con rCT-1 (0,2 mg/Kg/día) administrado de forma endovenosa. Los resultados (figura 19) indican que el tratamiento crónico a las dosis usadas no causó signos inflamatorios (dato confirmado histológicamente en órganos como el hígado y músculo).

40 Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos de hígado con el fin de detectar mediante microscopía la aparición de síntomas de inflamación. Los resultados (figura 20) muestran imágenes representativas de cortes histológicos de hígado (H&E 100X) en 3 grupos de ratones (C57BL/6, 4 meses de edad): grupo Control: que recibió por vía intravenosa suero fisiológico (el mismo volumen que el utilizado para la administración de rCT-1); grupo rCT-1: que recibió por vía intravenosa rCT-1 a la dosis anteriormente comentada (0,2 mg/kg/día) durante 6 días consecutivos; grupo Alimentado en paralelo: que recibió la misma cantidad de comida diaria que la que ingerían los ratones tratados con rCT-1 y a los que se inyectó suero durante el mismo periodo experimental. Tal como se observa en la figura, en ninguno de los tres grupos observamos presencia de infiltrado inflamatorio, ni ninguna alteración morfológica significativa.

Ejemplo 5

50 Efecto de CT-1 sobre el metabolismo lipídico

Con el fin de determinar el posible papel de CT-1 sobre el metabolismo lipídico, se determinaron los niveles de distintos lípidos en suero en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas durante 3 meses tras la administración crónica con rCT-1 durante 6 días. Los resultados se muestran en la Tabla 1

	Ratones Obesos con HFD	
	Vehículo	CT-1
	(n= 7)	(n=7)
Colesterol Total (mg/dl)	314,8 ± 22,30	186,6 ± 7,8***
Colesterol LDL (mg/dl)	193,4 ± 21,6	93,7 ± 4,7***
Colesterol Total/	3,22 ± 0,35	2,41 ± 0,06*
Proporción de colesterol HDL		
Triglicéridos (mg/dl)	99,9 ± 10,26	76,8 ± 7,63*
Ácidos grasos libres (mmol/l)	1,87 ± 0,11	0,80 ± 0,03
Glucosa (mg/dl)	212,4 ± 26,54	138,6 ± 17,27*
Insulina (ng/ml)	2,08 ± 0,76	1,01 ± 0,24*

Tabla 1: Tratamiento crónico con rCT-1 durante 6 días consecutivos en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas (HFD) durante 3 meses. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$

Adicionalmente, se determinaron los niveles en suero de ácidos grasos libres y triglicéridos en ratones salvajes tras una dieta rica en grasas. Para ello, se utilizaron dos grupos de animales (n=5) a los que se mantuvo en ayuno durante 3 horas antes del experimento. A continuación, se administró a ambos grupos de animales una comida rica en grasas mediante alimentación por sonda (1% de peso corporal) y se obtuvo una muestra de sangre para determinar los niveles basales. Inmediatamente tras la comida, se administró suero ▲) o rCT -1 (10 µg/ml) Δ) por vía intravenosa. Los resultados (figura 21) muestran como el tratamiento con rCT-1 conduce a una reducción significativa de los niveles de ácidos grasos libres (a las 2-5 horas, * $P < 0,05$) (panel superior) y de triglicéridos (a las 1-3 horas, * $P < 0,05$) (panel inferior).

Posteriormente, se investigó si el tratamiento con rCT-1 acelera la eliminación de ácidos grasos libres en suero tras una inyección intralípida. Para ello, se administró rCT-1 de forma intravenosa a dos grupos de animales (n=5) 30 minutos tras la administración de intralípidos. Los animales controles recibieron solución salina. Se determinó la concentración de ácidos grasos libres en suero a los 5 minutos. Posteriormente, los valores de eliminación de los ácidos grasos libres tomados a distintos tiempos se normalizaron con respecto a los valores de AGL a los 5 minutos tras la inyección de intralípidos (100%). Según se demuestra en la figura 22, la cinética de abulia de los AGL difirió de forma significativa entre los ratones tratados con solución salina y con CT-1 ($P < 0,05$ mediante ANOVA de doble vía con análisis Bonferroni *post hoc*).

Con el fin de determinar los posibles efectos de rCT-1 sobre la beta oxidación, se determinó la oxidación de palmitato en músculo gastrocnemio aislado de ratones tratados con solución salina o de CT-1 (10 µg durante 1 h). Los resultados (figura 23) muestran que el tratamiento agudo con rCT-1 provoca un aumento de la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. Adicionalmente, se determinaron mediante RT-PCR los niveles de expresión en genes implicados en la oxidación de ácidos grasos en el músculo en respuesta al tratamiento agudo con rCT-1 (3 horas). Los resultados (figura 24) muestran que rCT-1 provoca un aumento en los niveles de ARNm de los genes PGC-1b, CPT-1, ACD, ACO y MCDA. El número de ciclos necesario para detectar cada uno de los transcritos se comparó con el número correspondiente a la ciclofilina como control interno y se expresa como unidades arbitrarias frente a valores en los animales tratados con solución salina tomados como 1,0 (n=5-6, * $P < 0,05$)

Ejemplo 6

Efecto potenciador de CT-1 sobre la acción de la insulina en músculo esquelético.

El músculo esquelético constituye el tejido más sensible a la acción de la insulina constituyendo en individuos sanos el 90% en la captación de glucosa estimulada por la insulina. Los autores de han demostrado que CT-1 potencia la señalización de la insulina en el músculo "*in vitro*" e "*in vivo*".

- 5 Los experimentos "*in vitro*" se llevaron a cabo midiendo la captación de 2-deoxiglucosa inducida por la insulina y la fosforilación de AKT inducida por la insulina en miotubos de rata (mioblastos L6E9 diferenciados a miotubos) tras el tratamiento agudo (1 hora) o el tratamiento crónico (24 horas) con rCT-1. Se observó que rCT-1 estimuló la captación de 2-deoxiglucosa inducida por la insulina (figura 25) y estimuló la fosforilación de AKT inducida por la insulina (figura 26). Estos datos demuestran que CT-1 potencia las acciones de la insulina en músculo. Estos datos difieren de los publicados para la citocina de la misma familia, IL-6 (Nieto-Vazquez, I. et al., Diabetes 2008; 57: 3211-3221).

- 10 Además, se observó "*in vivo*" que la administración intravenosa de rCT-1 (10 µg/ratón) 30 minutos antes de la estimulación con insulina (0,5 U/ratón inyectadas en la vena cava inferior) incrementó la fosforilación de AKT inducida por la insulina en músculo (figura 27). Además, el tratamiento crónico con rCT-1 durante 6 días consecutivos a dosis de 0,2 mg/kg/día intravenosamente potenció los efectos de la insulina en el tejido muscular comparándolos con animales con la misma ingesta que los tratados con CT-1 y que están inyectados con solución salina (grupo alimentado en paralelo) (figura 28). Todos estos datos demuestran el papel estimulador de CT-1 en presencia de insulina en el músculo esquelético.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que induce la actividad cardirotrofina 1 (CT-1) seleccionado del grupo que consiste en
- (i) Cardirotrofina-1 (CT-1),
- 5 (ii) una variante funcionalmente equivalente de CT-1 que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- (iii) un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- (iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii) y
- 10 (v) una célula capaz de secretar al medio cardirotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%
- para su uso en el tratamiento de una enfermedad metabólica, en donde la enfermedad metabólica está seleccionada del conjunto de obesidad, hiperglucemias, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2 y dislipidemia, en donde la identidad de secuencia se determina usando algoritmo de BLASTP.
2. Uso de un compuesto que induce la actividad cardirotrofina 1 (CT-1) seleccionado del grupo que consiste en
- 15 (i) Cardirotrofina-1 (CT-1),
- (ii) una variante funcionalmente equivalente de CT-1 que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- (iii) un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- 20 (iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii) y
- (v) una célula capaz de secretar al medio cardirotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%
- para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad metabólica, en donde la enfermedad metabólica está seleccionada del conjunto de obesidad, hiperglucemia, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2 y dislipidemia, en donde la identidad de secuencia se determina usando algoritmo de BLASTP.
- 25 3. Método cosmético para el tratamiento de sobrepeso de grado 1 (25,0-29,9 kg/m²), que comprende administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto que induce actividad cardirotrofina 1 seleccionada del grupo de
- (i) Cardirotrofina-1 (CT-1),
- 30 (ii) una variante funcionalmente equivalente de CT-1 que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- (iii) un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- (iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii) y
- 35 (v) una célula capaz de secretar al medio cardirotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%
- en donde la identidad de secuencia se determina usando algoritmo de BLASTP.
4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, un uso según la reivindicación 2 o un método según la reivindicación 3 en el que dicho compuesto se administra para tratamiento agudo o crónico.
- 40 5. Una composición que comprende, conjuntamente o por separado, un compuesto que induce la actividad cardirotrofina seleccionado del grupo que consiste de:
- (i) Cardirotrofina-1,
- (ii) una variante funcionalmente equivalente de CT-1 que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,
- 45 (iii) un polinucleótido que codifica CT-1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que muestra una

identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,

(iv) un vector que comprende un polinucleótido según (iii) y

(v) una célula capaz de secretar al medio cardiotrofina-1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad de secuencia con CT-1 humana de al menos el 90%,

5 y un compuesto antidiabético, en donde la identidad de secuencia se determina usando algoritmo de BLASTP.

6. Una composición según la reivindicación 5, en la que el compuesto anti-diabético se selecciona del grupo de un compuesto que induce la actividad de insulina y un compuesto que induce la actividad hipoglucemiante y/o sensibilizador a la actividad de insulina.

10 7. Una composición según la reivindicación 9, en la que el compuesto que induce la actividad de insulina se selecciona del grupo de:

(i) insulina,

(ii) un polinucleótido que codifica insulina y

(iii) un vector que comprende un polinucleótido según (ii)

15 8. Una composición según las reivindicaciones 5 o 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad metabólica, en donde la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial y en donde la enfermedad metabólica se selecciona del grupo de obesidad, resistencia a insulina, hiperglucemia, dislipidemia y diabetes tipo 2.

20 9. Uso de una composición según las reivindicaciones 5 o 7 para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad metabólica, en donde la composición se administra de forma simultánea, separada o secuencial.

10. Método cosmético para el tratamiento de sobrepeso de grado 1 ($25,0-29,9 \text{ kg/m}^2$), que comprende administrar al paciente una cantidad farmacológicamente activa de una composición según las reivindicaciones 5 a 7.

11. Método según la reivindicación 10, en el que el tratamiento es agudo o crónico.

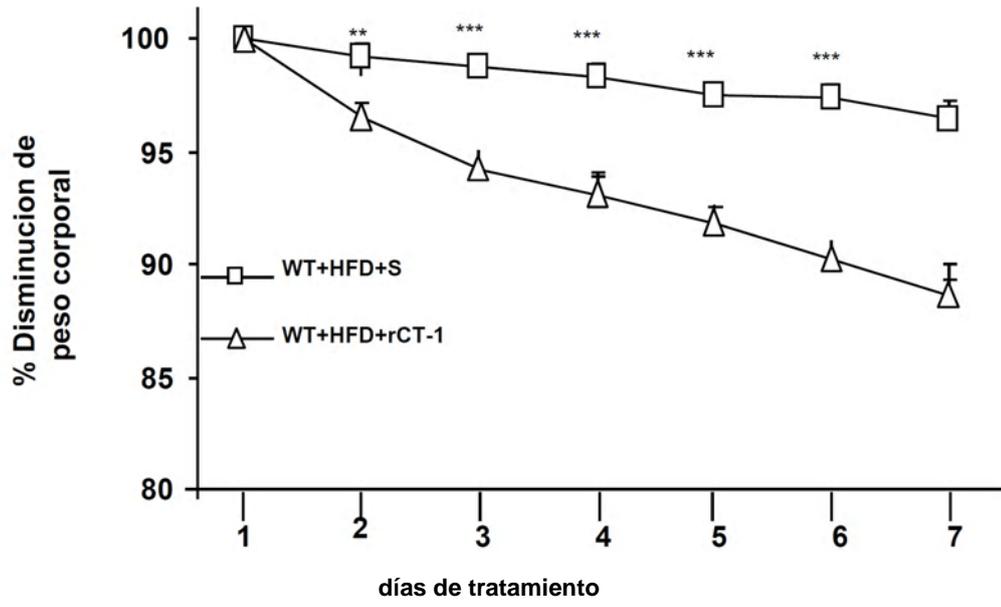


Figura 1

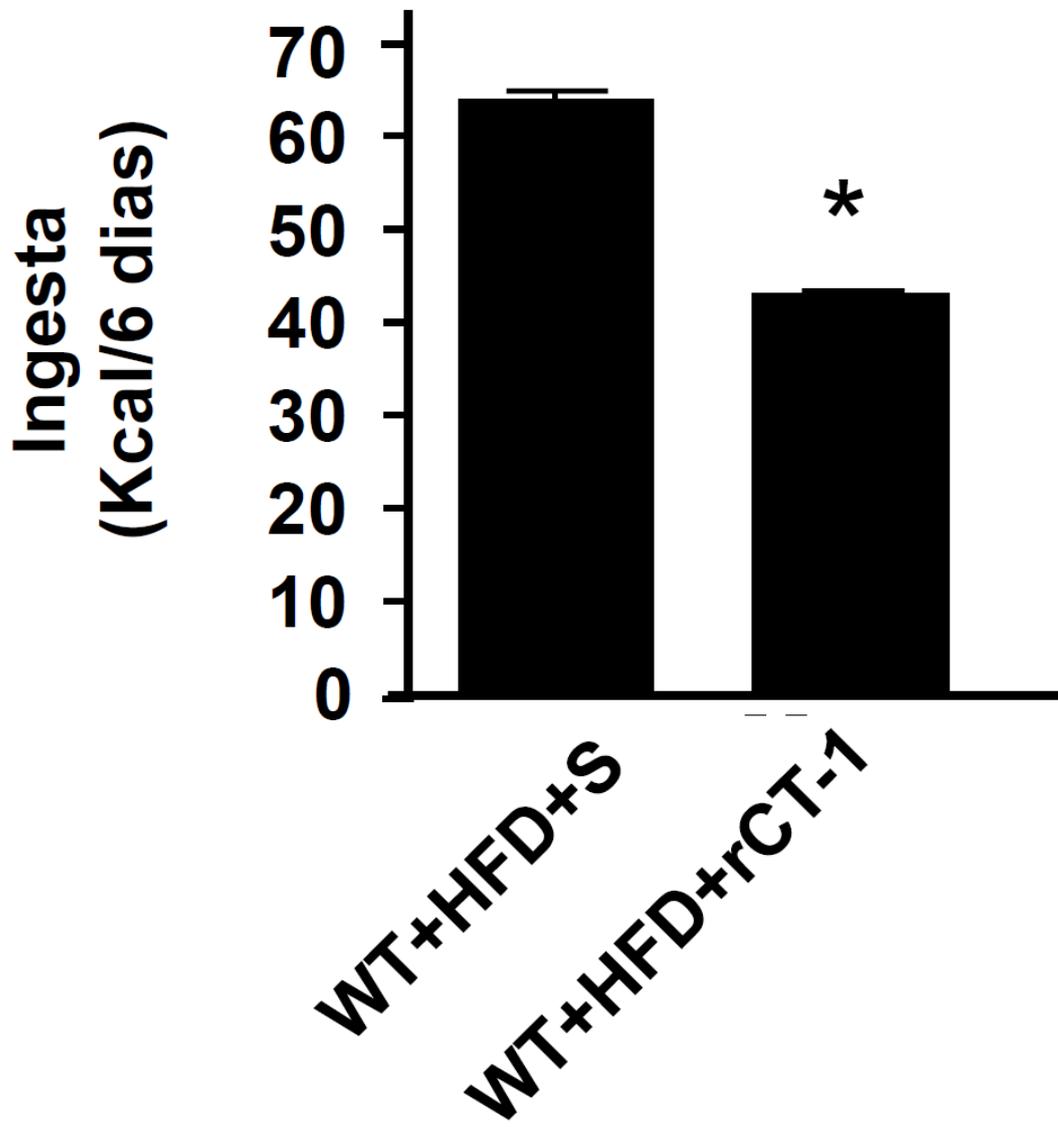


FIGURA 2

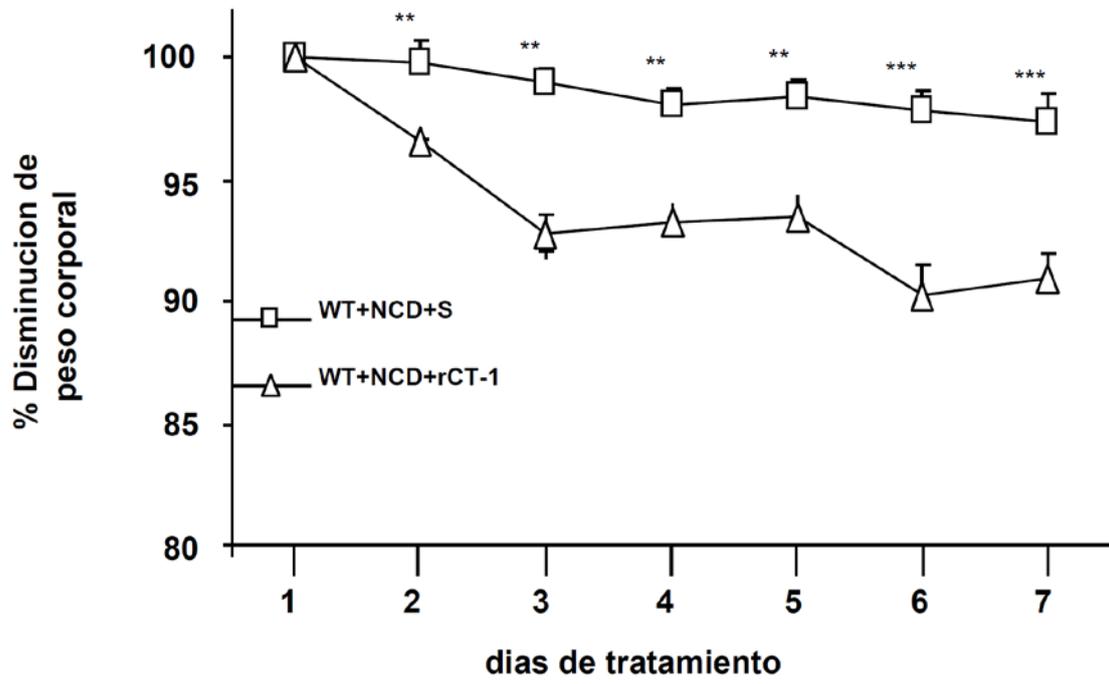


FIGURA 3

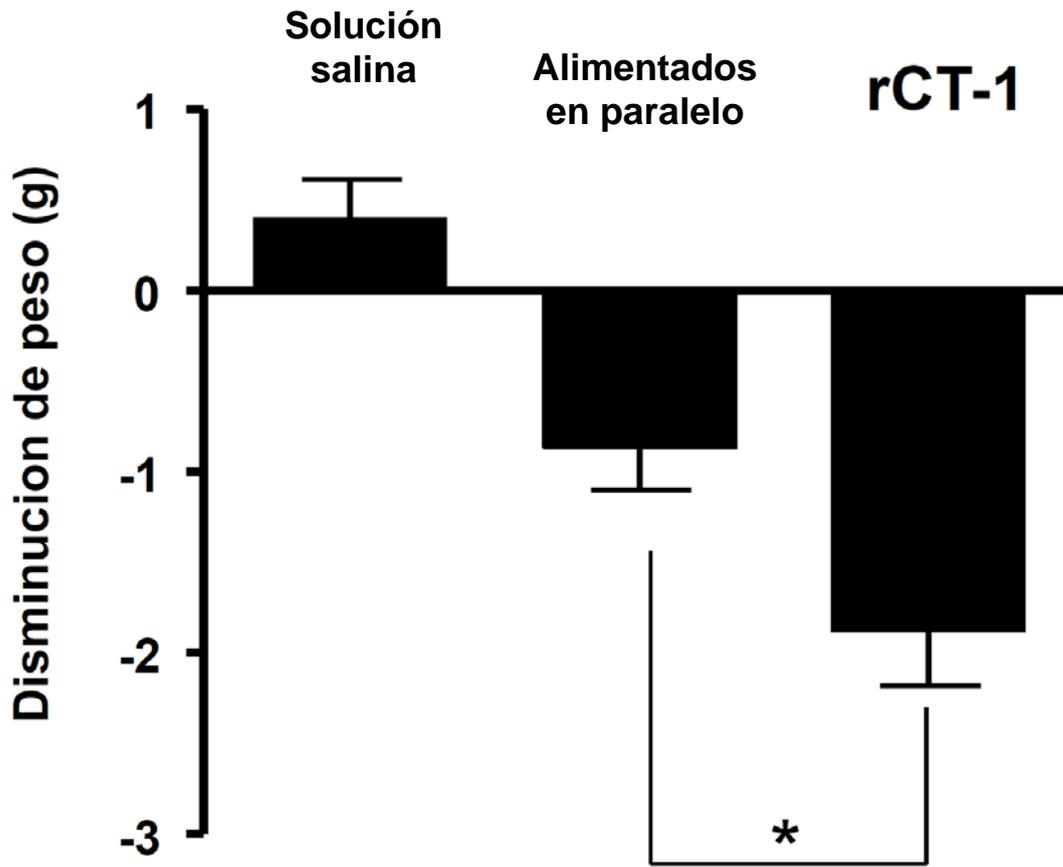


FIGURA 4

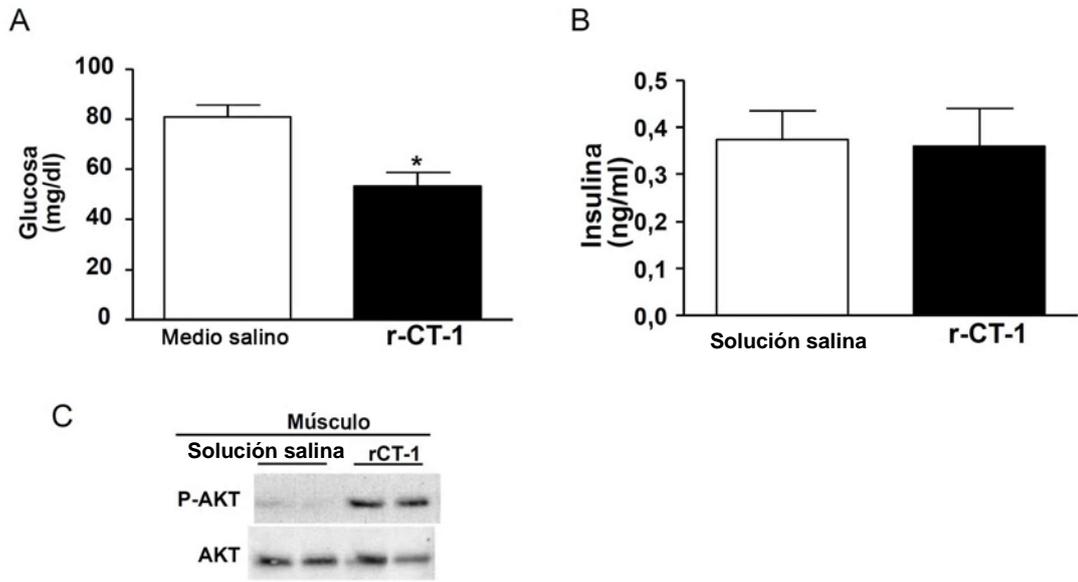


FIGURA 5

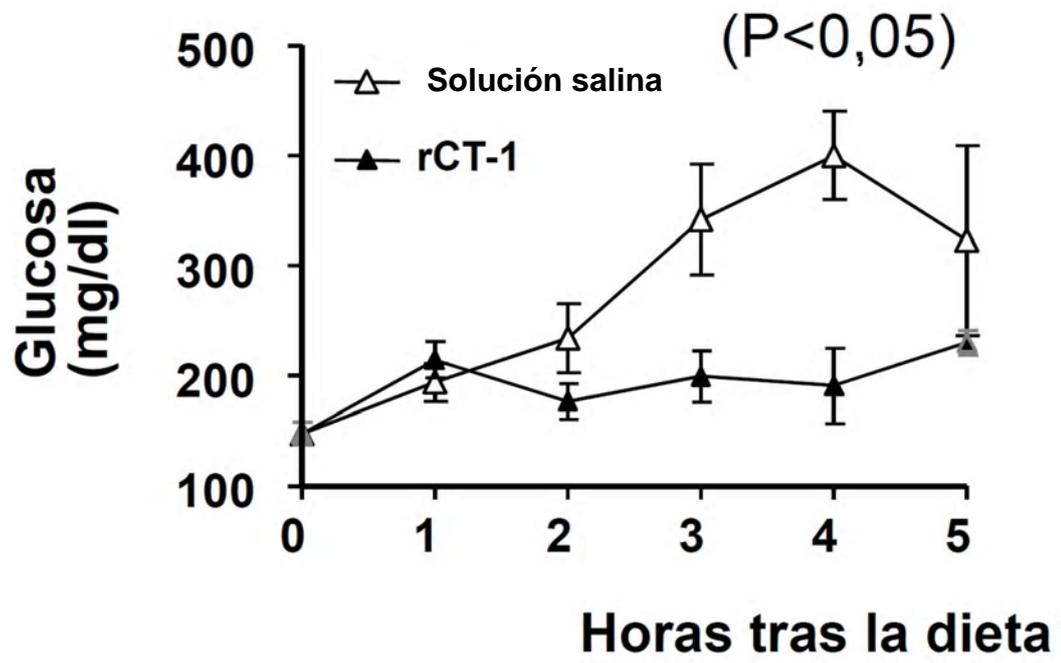


FIGURA 6

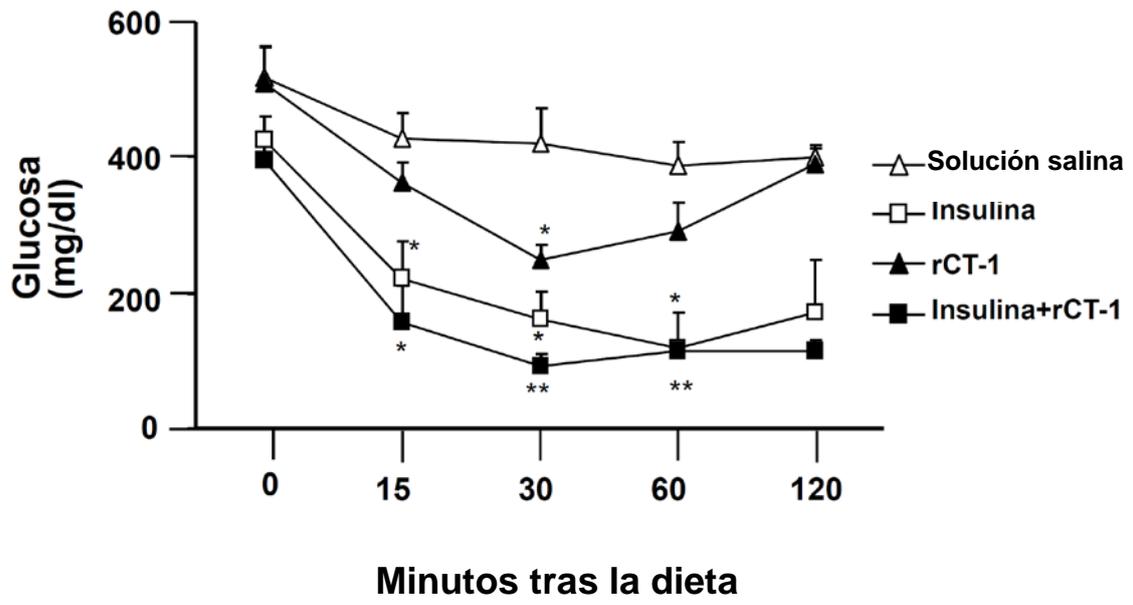


FIGURA 7

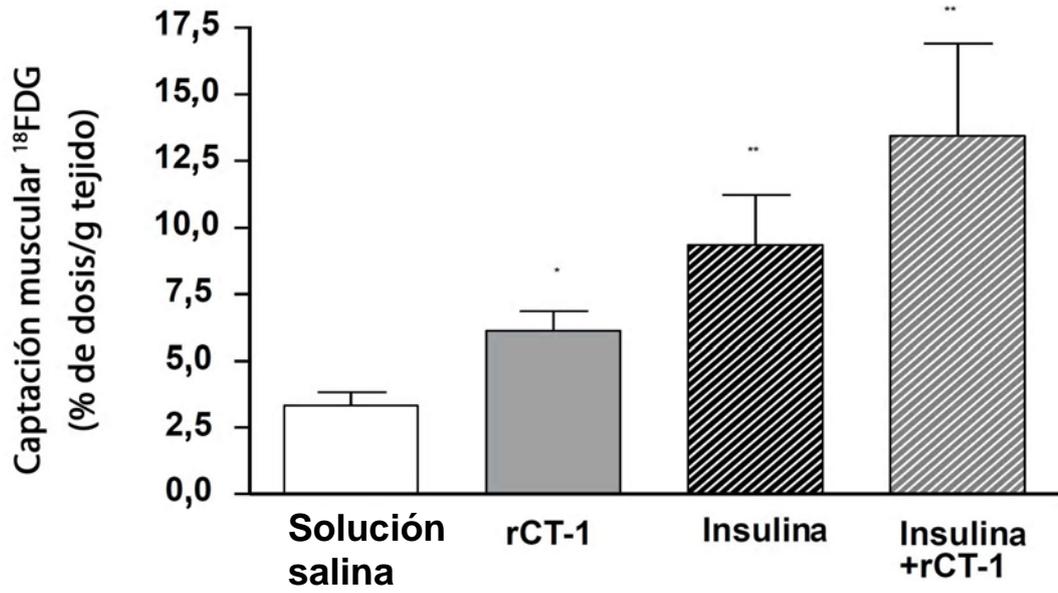


FIGURA 8

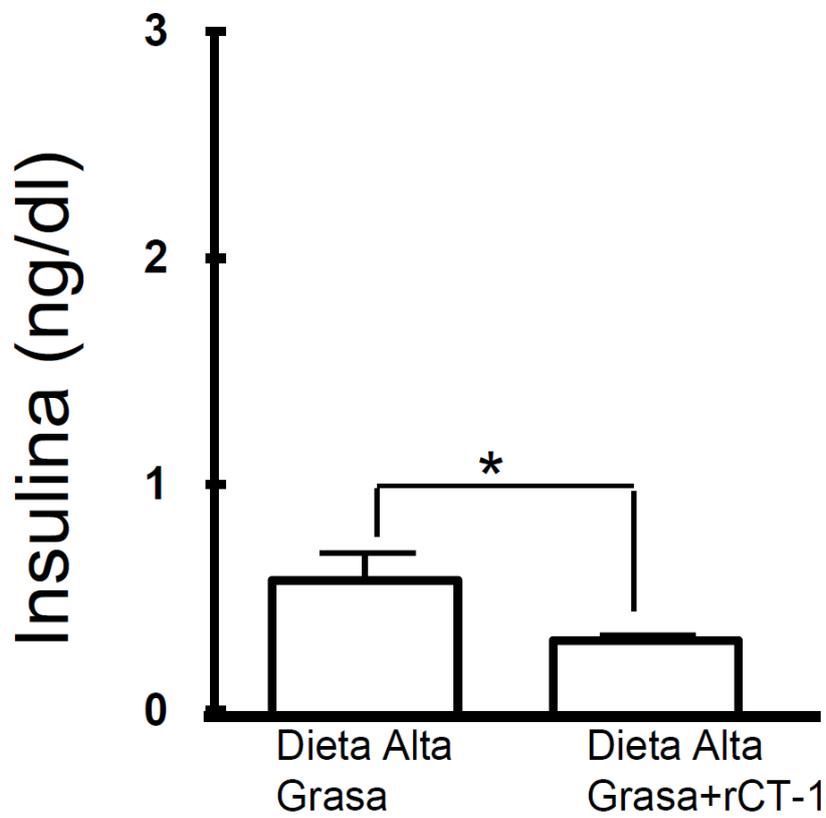
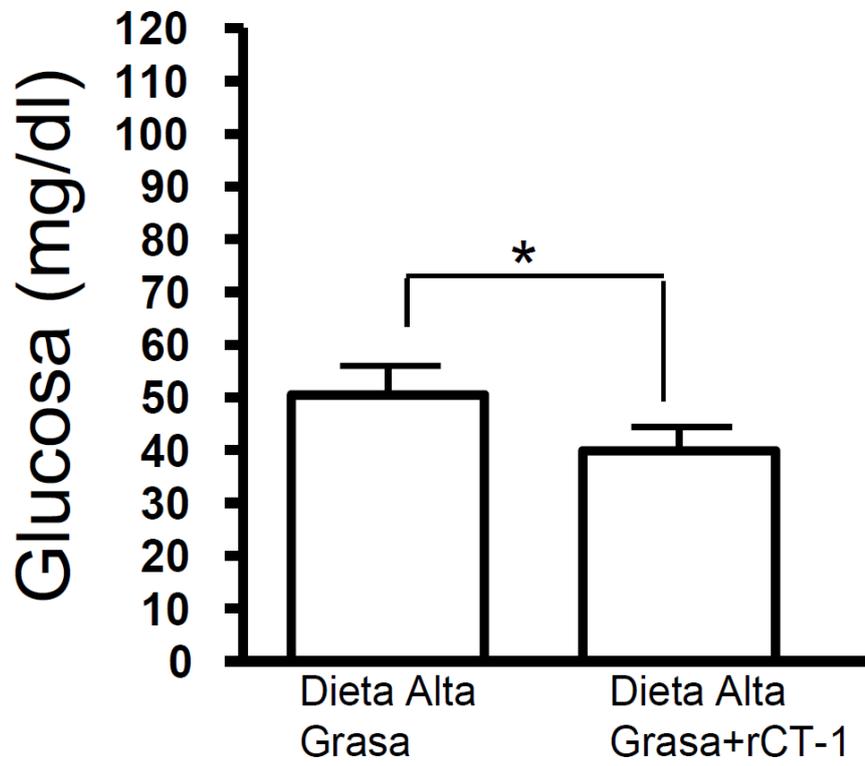


FIGURA 9

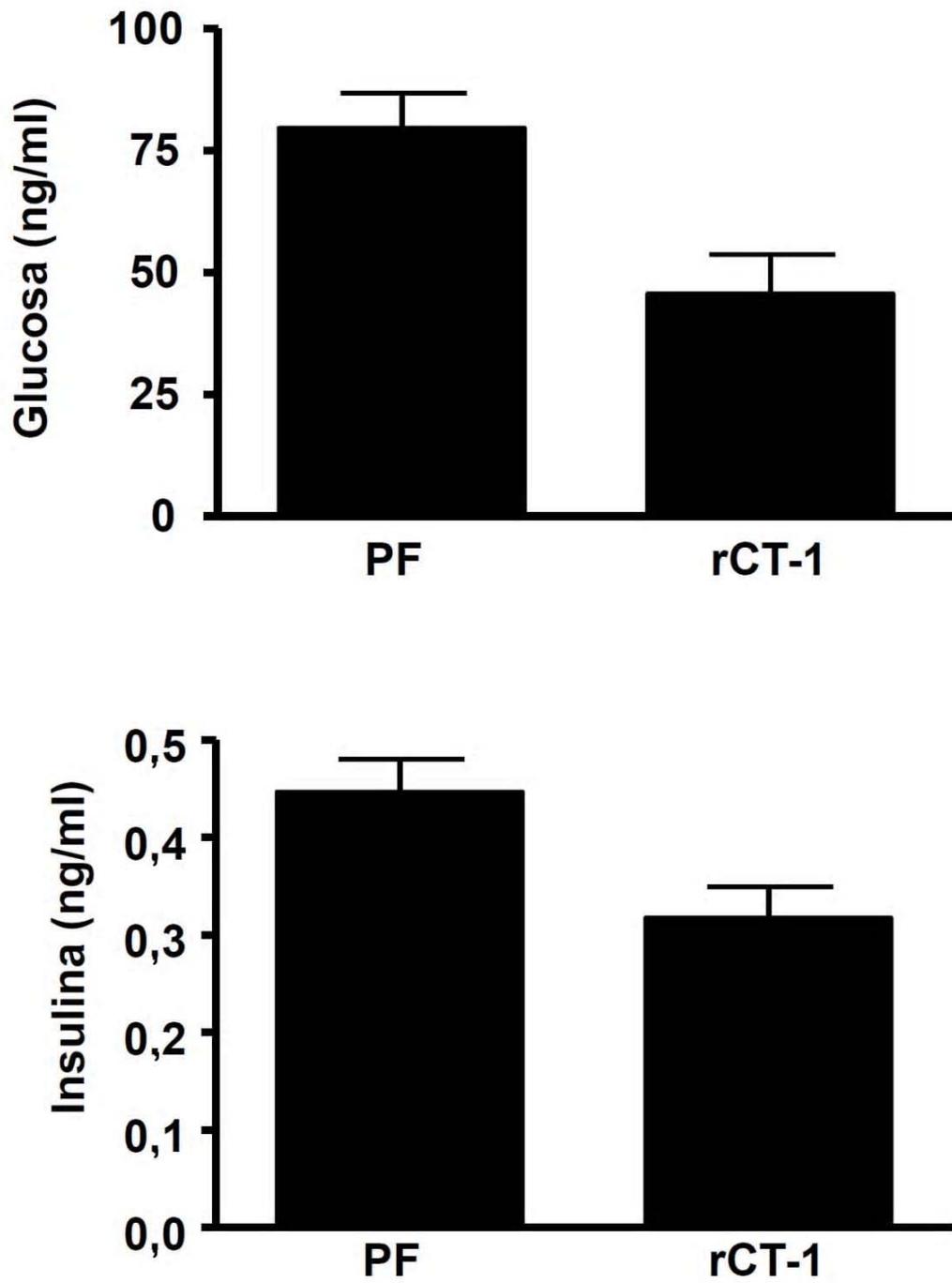


FIGURA 10

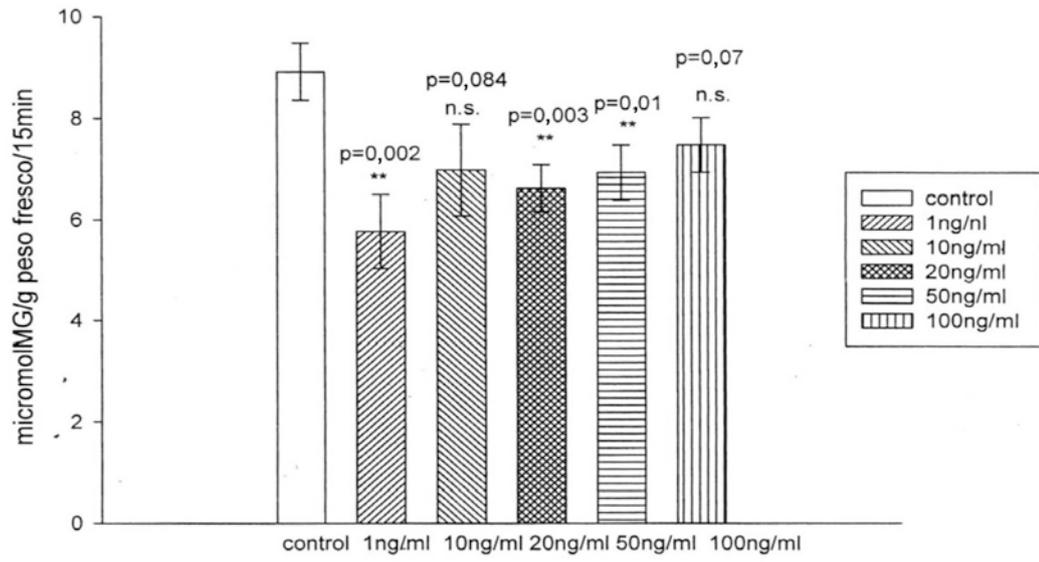


FIGURA 11

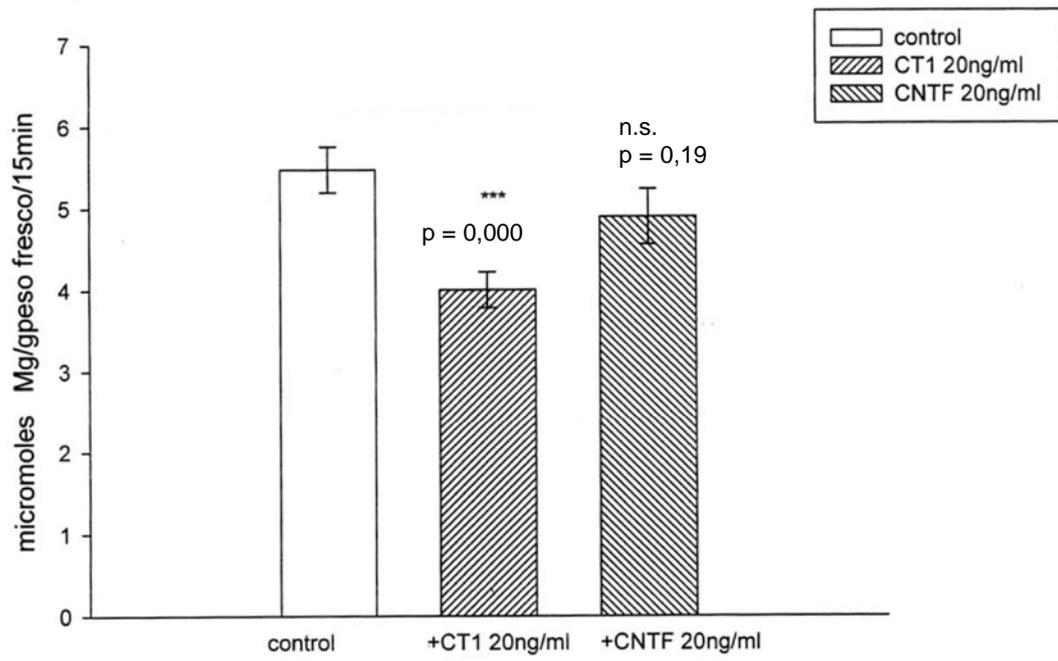


FIGURA 12

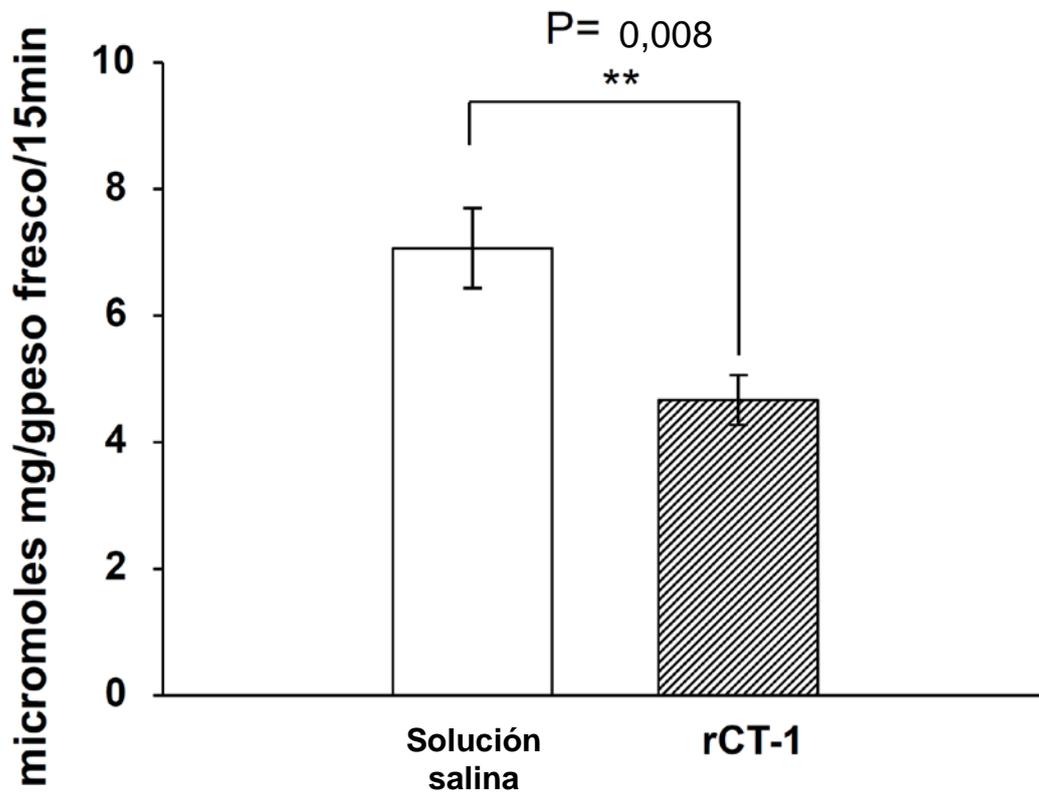


FIGURA 13

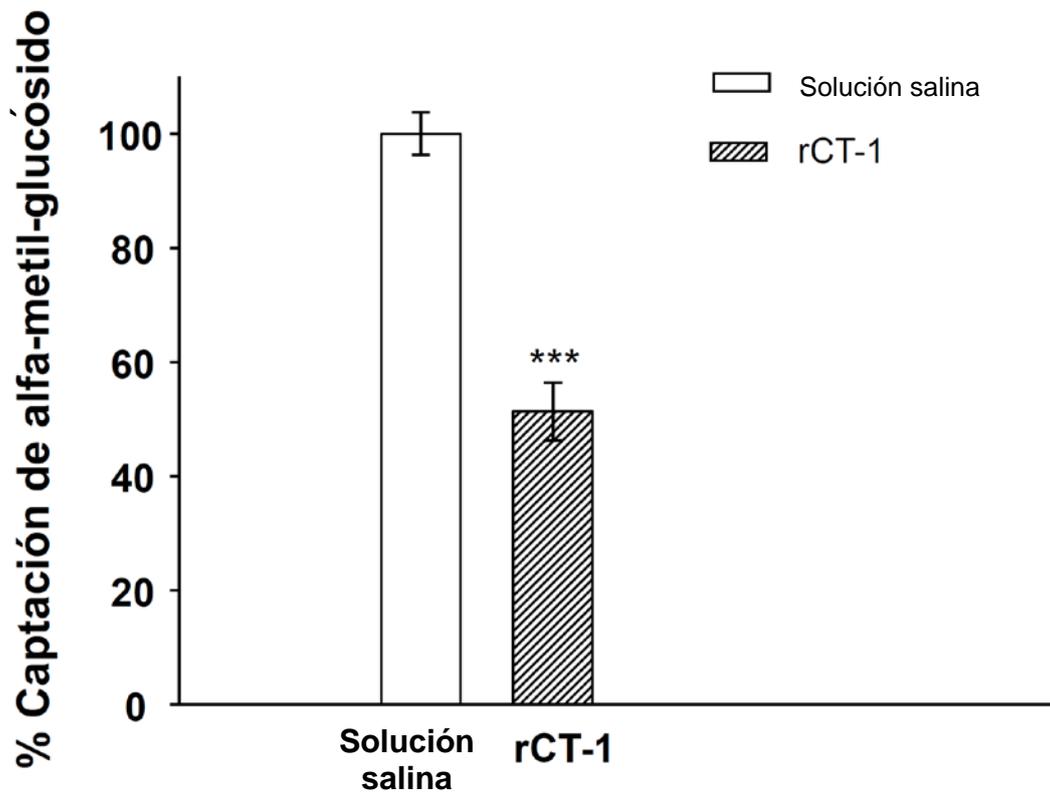


FIGURA 14

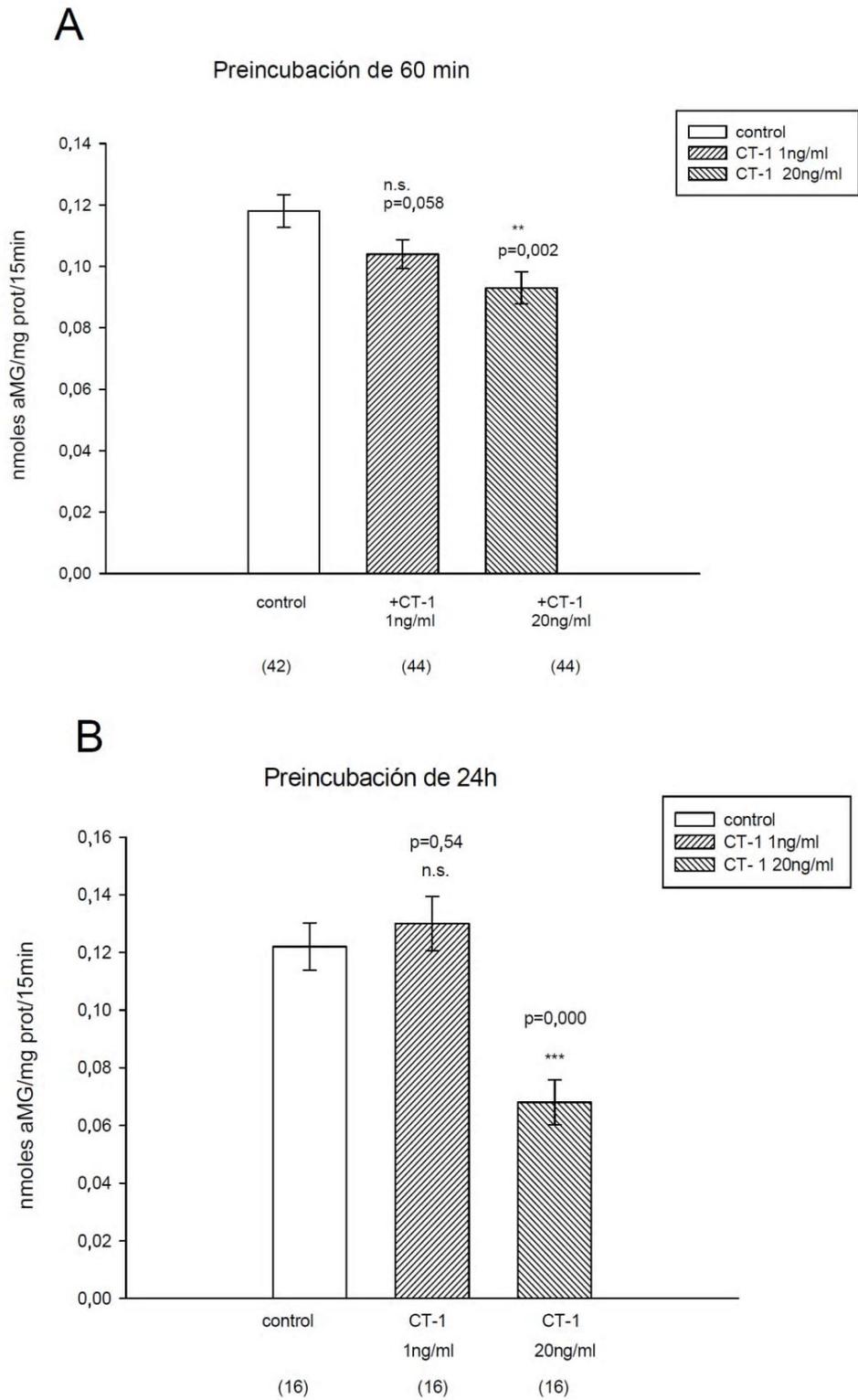


FIGURA 15

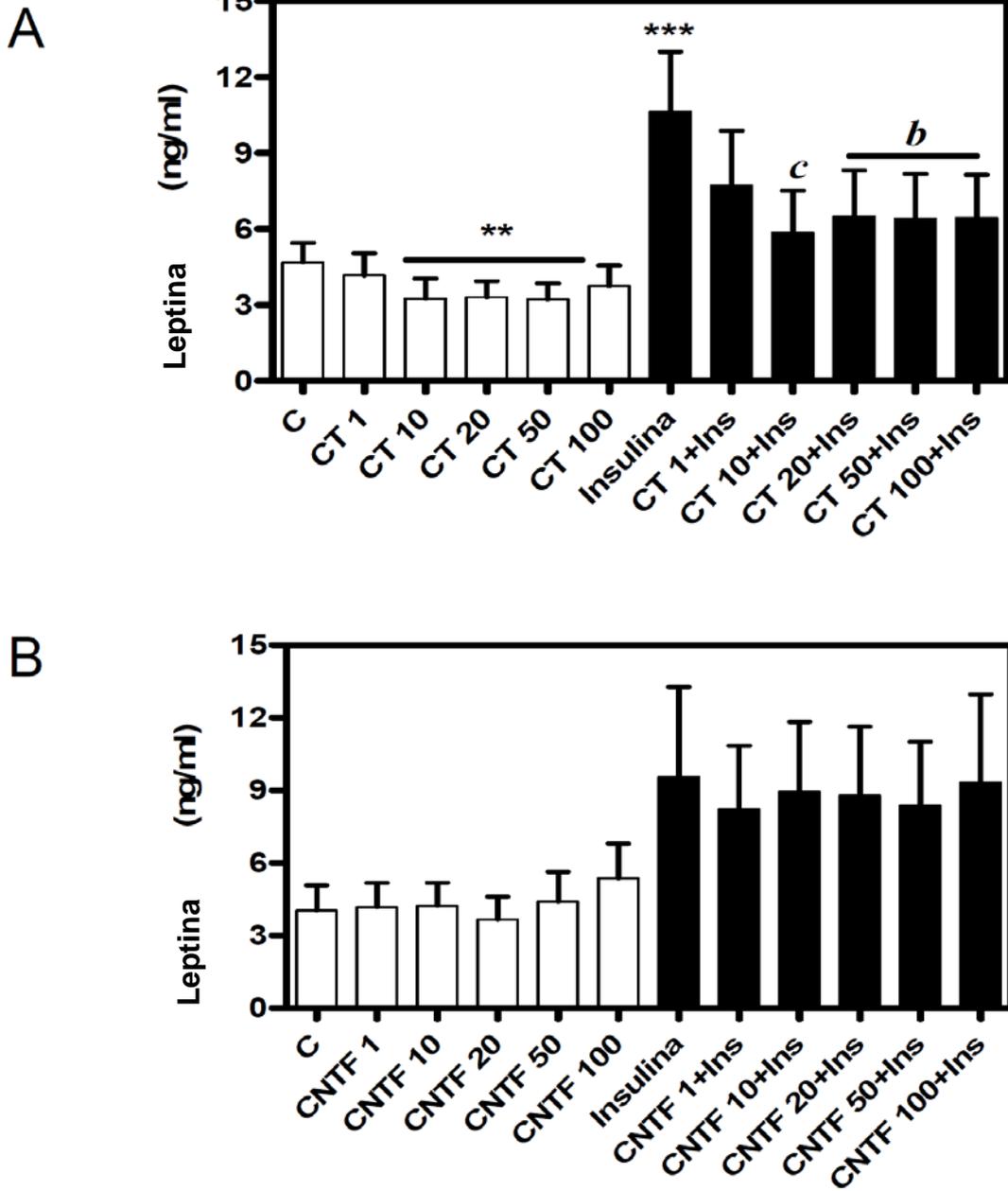


FIGURA 16

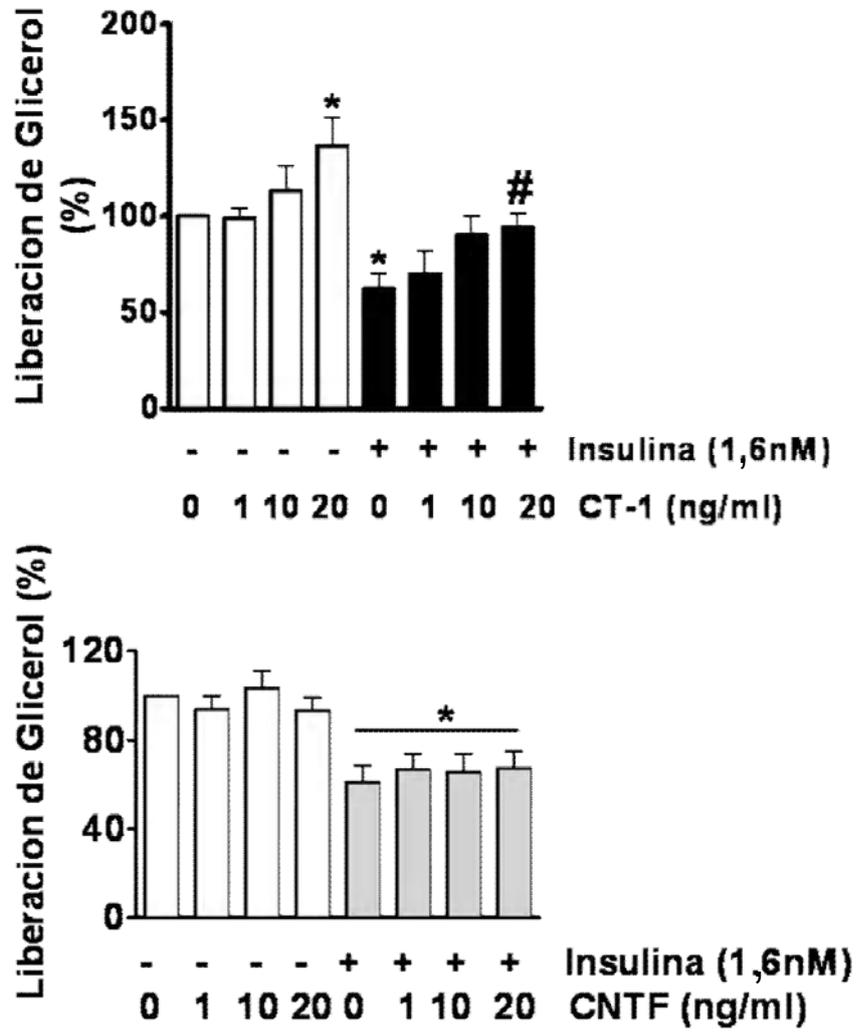


Figura 17

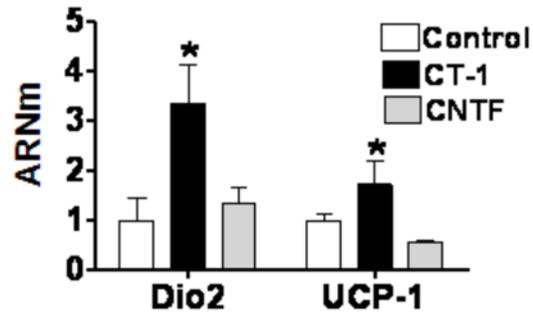


Figura 18

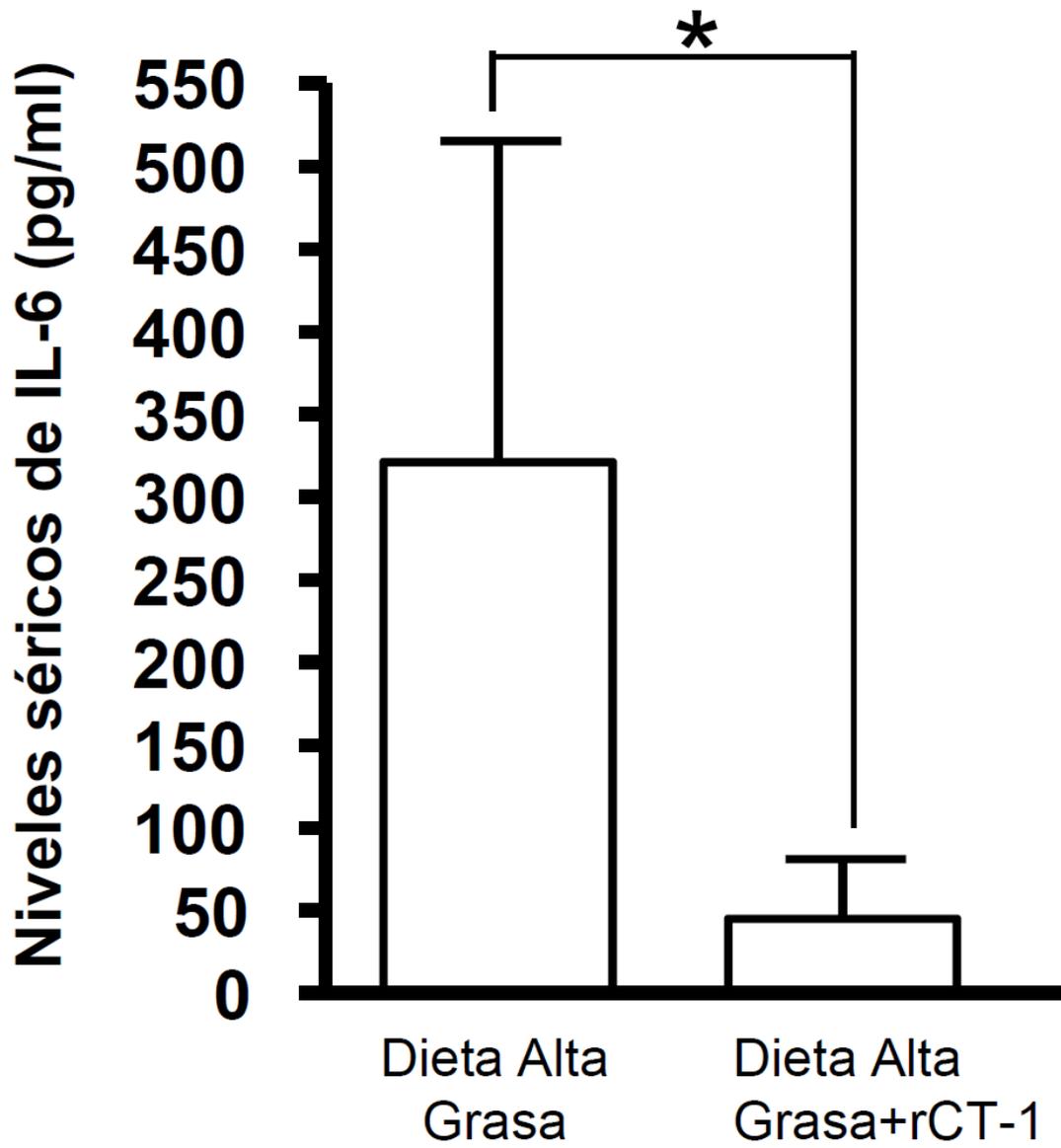


FIGURA 19

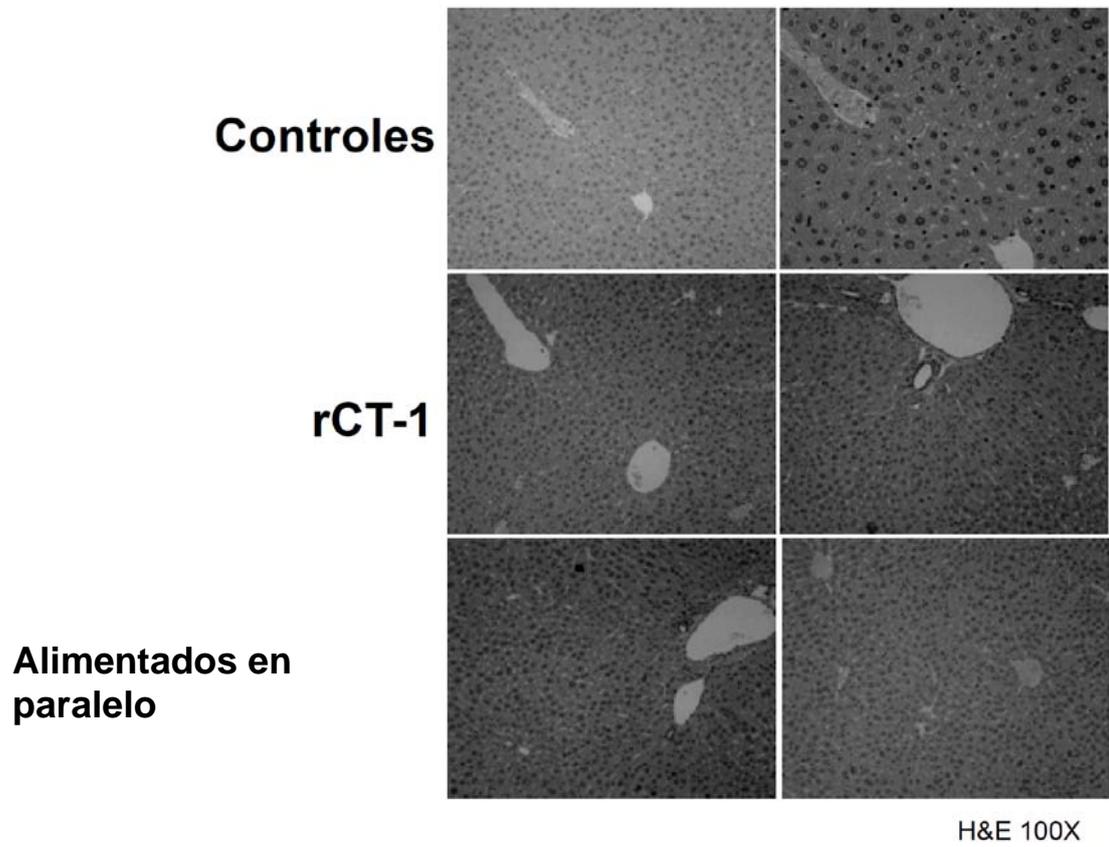


FIGURA 20

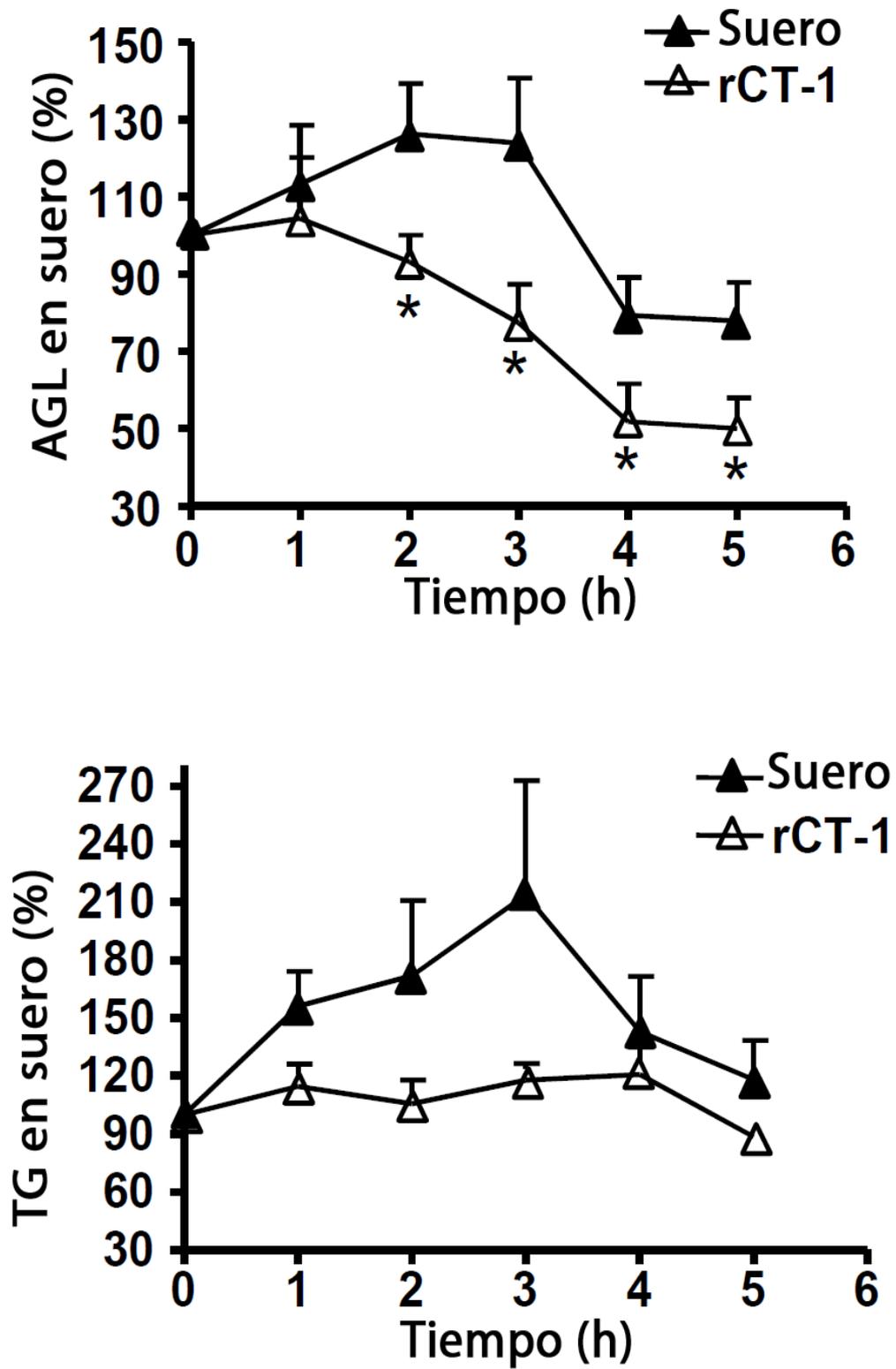


FIGURA 21

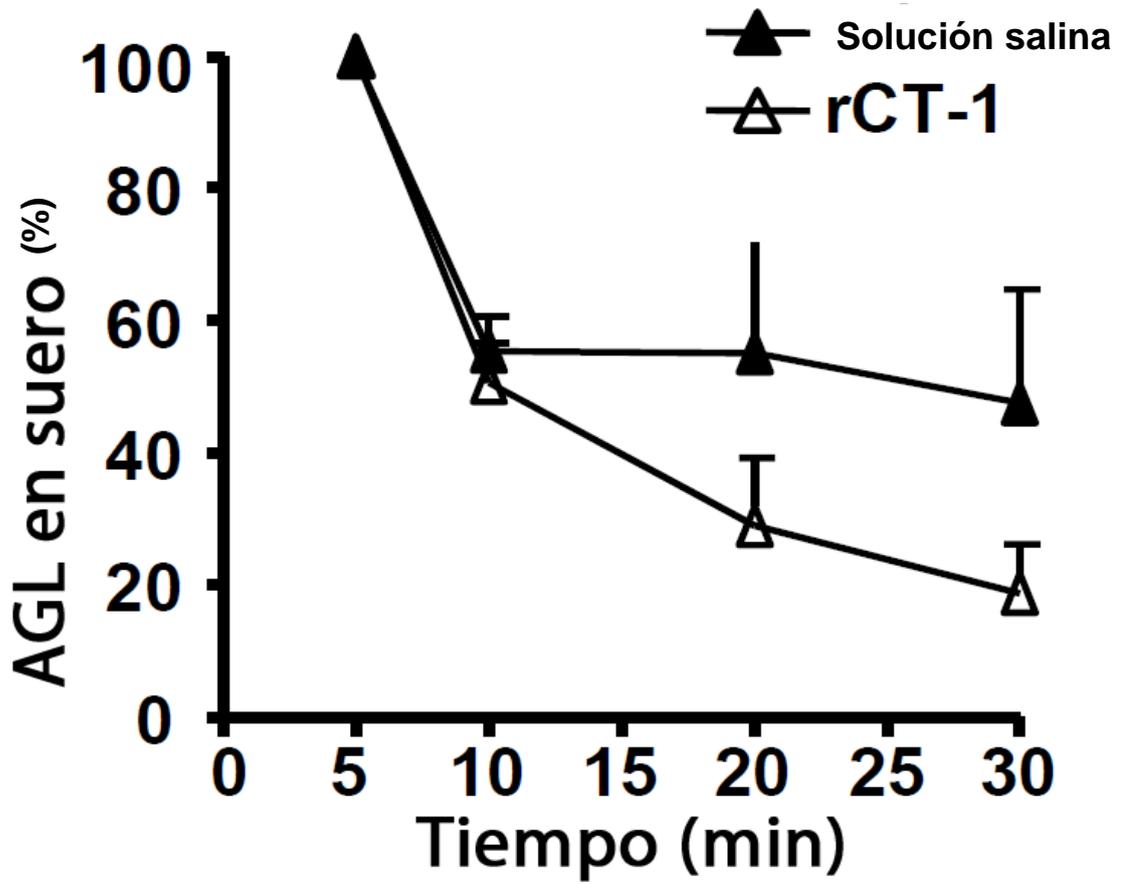


FIGURA 22

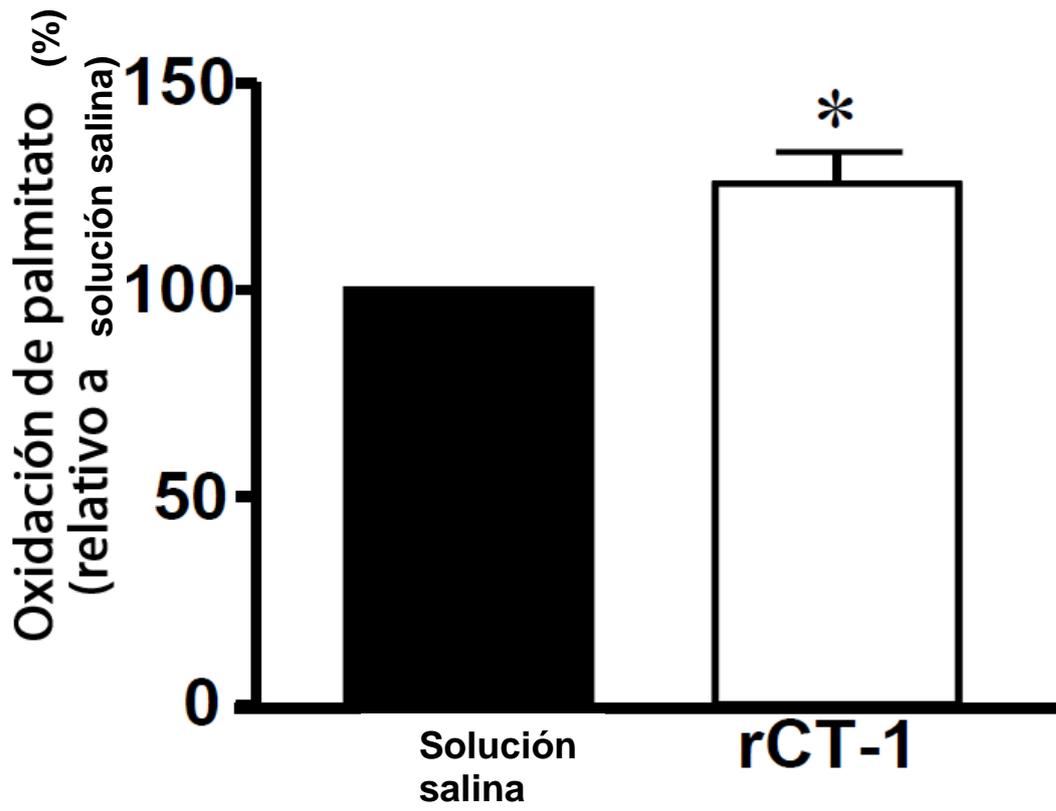


FIGURA 23

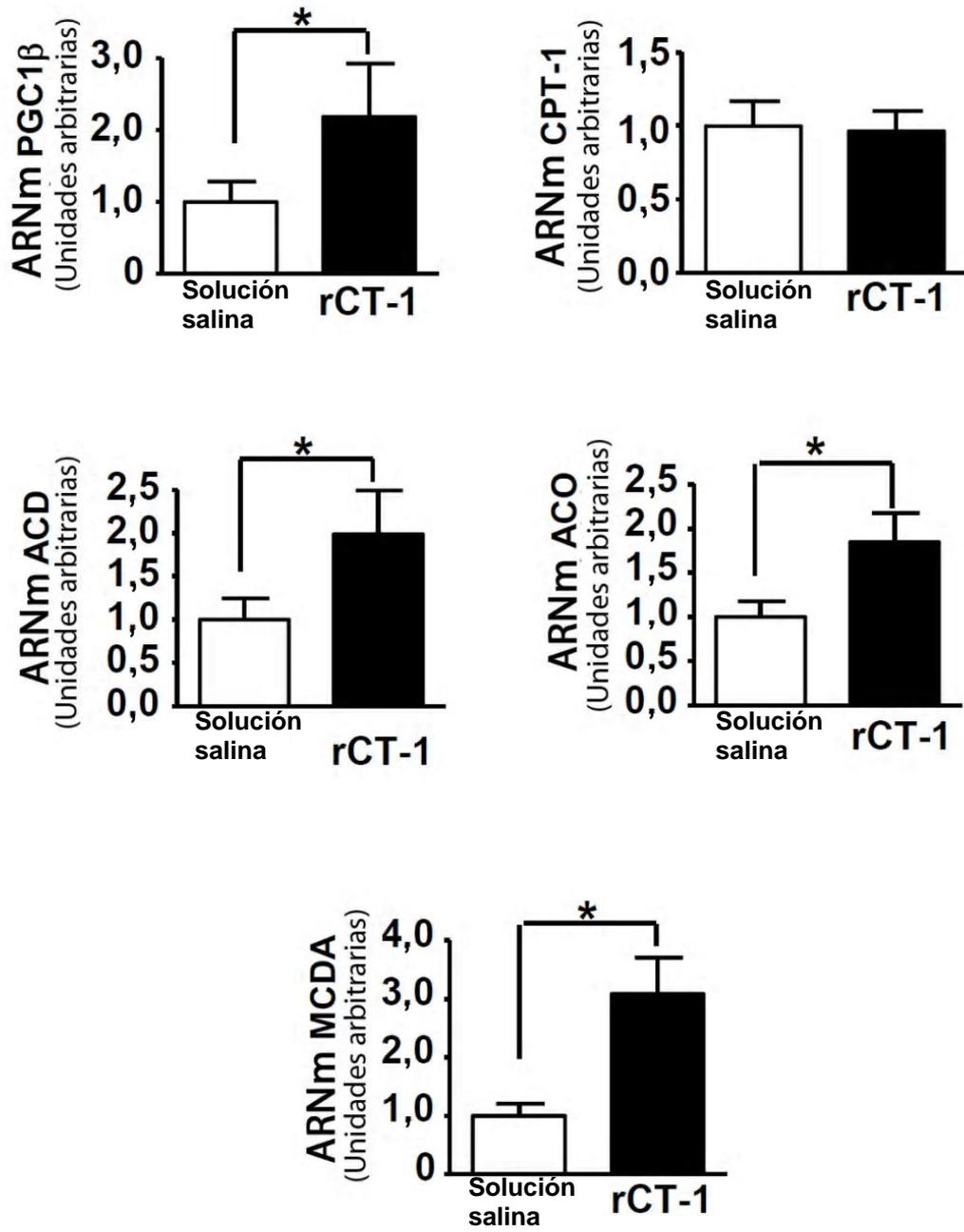


FIGURA 24

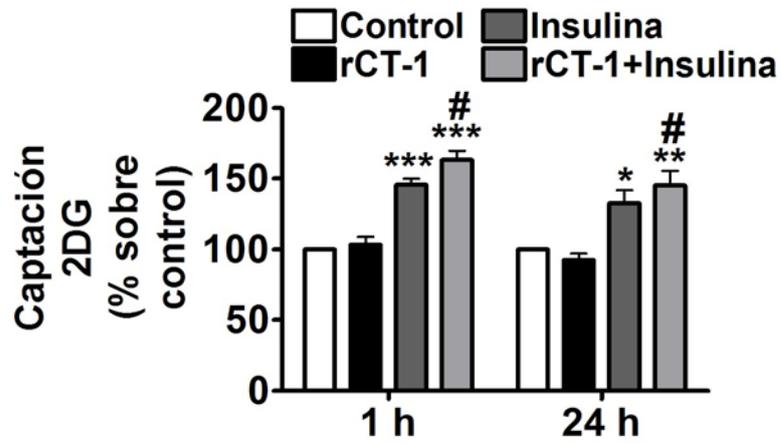


Figura 25

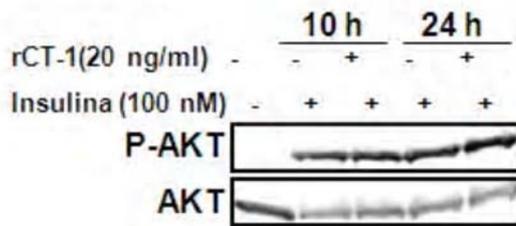
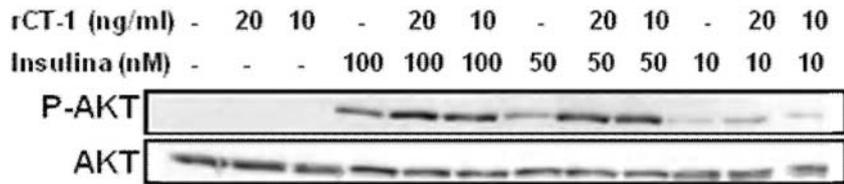


Figura 26

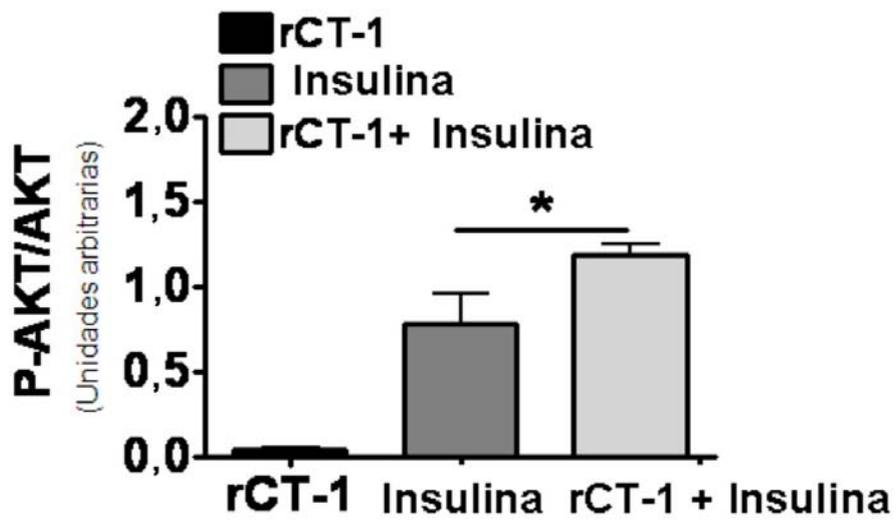
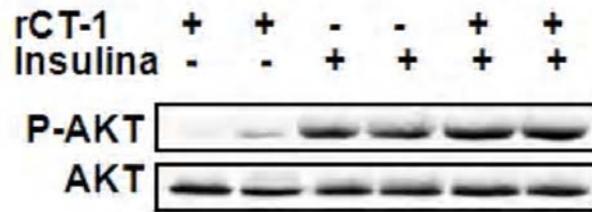


FIGURA 27

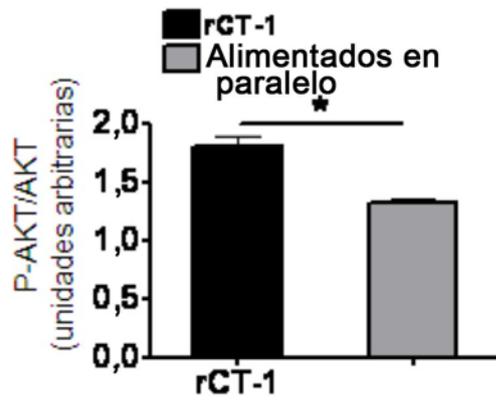
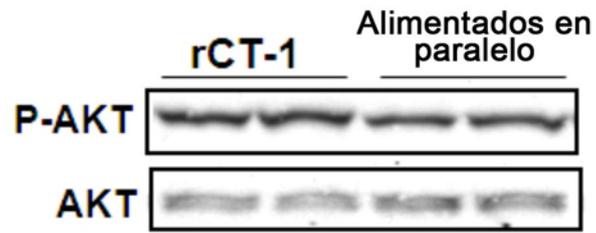


FIGURA 28