

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 404**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/775** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/US2012/021802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO2012100010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12705517 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2665485**

54 Título: **Apolipoproteína AIV como péptido antidiabético**

30 Prioridad:

**19.01.2011 US 201161434196 P**

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

**28.06.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CINCINNATI (100.0%)  
51 Goodman Drive Suite 240  
Cincinnati, OH 45221-0829, US**

72 Inventor/es:

**TSO, PATRICK;  
DAVIDSON, SEAN;  
WOODS, STEPHEN y  
WANG, FEI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 620 404 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

Apolipoproteína AIV como péptido antidiabético

### Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento de la diabetes. Más en concreto, la presente descripción se refiere al uso de la apolipoproteína A-IV para tratar la diabetes mellitus de tipo dos.

### Antecedentes

10 La aparición de la diabetes está muy extendida, y aproximadamente 8% de la población de EEUU padece diabetes. La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por un alto contenido de azúcar en sangre debido a que el cuerpo es incapaz de producir y/o utilizar la insulina con eficacia. La diabetes puede conducir a una diversidad de complicaciones físicas que incluyen, pero no se limitan a insuficiencia renal, ceguera, daños nerviosos, enfermedad cardíaca, apnea del sueño y enfermedad celíaca. Por ejemplo, en EEUU, la diabetes es la principal causa de insuficiente renal, ceguera, amputación, accidentes cerebrovasculares y ataque cardíaco. También en EEUU, la diabetes es la sexta causa principal de muerte y se ha demostrado que reduce la esperanza de vida de adultos de mediana edad en aproximadamente cinco a diez años.

15 La forma más habitual de diabetes es la diabetes mellitus de tipo dos (en lo sucesivo "T2DM"). La T2DM se caracteriza por hiperglucemia, resistencia a la insulina, disfunción de células  $\beta$ , y gluconeogénesis hepática desregulada. Las personas que padecen T2DM sufren una pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa relacionada con la liberación alterada de gránulos de insulina almacenados desde las células  $\beta$  en la primera fase de la secreción de insulina. En la segunda fase de la secreción de insulina, las personas que padecen T2DM sufren una pérdida gradual de la capacidad para sintetizar insulina activamente en respuesta a estímulos de glucosa.

20 La prevalencia de la T2DM está aumentando y, en 2002, la T2DM produjo unos costes sanitarios de más de 130 mil millones de dólares americanos. Así, son necesarias nuevas terapias para tratar la T2DM con eficacia.

### Sumario

25 La presente descripción se basa en el sorprendente descubrimiento de que la apolipoproteína A-IV es un péptido antidiabético eficaz que está íntimamente implicado en la resolución de la T2DM. La apolipoproteína A-IV es una hormona intestinal clave que contribuye a la tolerancia a la glucosa posprandial y actúa como un mediador, previamente no percibido, en la mejoría de la tolerancia a la glucosa. Por consiguiente, en una realización se describen compuestos para su uso para tratar la T2DM en un sujeto que lo necesite. En particular, se describe una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90, o al menos 99% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para tratar la diabetes de tipo II en un sujeto.

30 En otra realización, se describe una composición farmacéutica que comprende la apolipoproteína A-IV. La composición farmacéutica comprende una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90, o al menos 99% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para tratar la T2DM, para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesite, o para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa en un sujeto.

35 En otra realización, se describen compuestos para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa en un sujeto que lo necesite, hasta un nivel normal. En particular, se describe una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90, o al menos 99% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa en un sujeto. Los usos según la descripción pueden comprender la administración sistémica de la apolipoproteína A-IV, o su análogo biológicamente activo.

40 En otra realización, se describen compuestos para disminuir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesite. En particular, se describe una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90, o al menos 99% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesite. La apolipoproteína A-IV, o su análogo biológicamente activo, para su uso según la descripción puede administrarse en una dosis de 1 a 10  $\mu\text{g/g}$ , de 0,25 a 2  $\mu\text{g/g}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{g/g}$ .

45 Estas y otras características y ventajas de estas y otras realizaciones diversas según la presente descripción serán más evidentes a la vista de los dibujos, la descripción detallada y las reivindicaciones proporcionadas en la presentes.

### Breve descripción de los dibujos

50 La siguiente descripción detallada de las realizaciones de la presente descripción puede entenderse mejor cuando se considera junto con los siguientes dibujos, en los que estructuras similares se indican con número de referencia

similares, y en los que:

FIG. 1 es una vista en perspectiva lateral de un dispositivo que presenta un depósito de una composición farmacéutica y una jeringa según una realización de la presente descripción.

5 FIG. 2 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) en ratones macho de tipo salvaje y con la apolipoproteína A-IV inactivada con respecto al tiempo (min) para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

FIG. 3 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (min) para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en animales de tipo salvaje y con la apolipoproteína A-IV inactivada de 16 meses de edad.

10 FIG. 4 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (min) en ratones macho con la apolipoproteína A-IV inactivada después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-IV recombinante ( $\mu\text{g/g}$ ) o disolución salina para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

FIG. 5 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (min) en ratones con la apolipoproteína A-IV inactivada después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-I recombinante o disolución salina para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

15 FIG. 6 es una gráfica de la secreción de insulina (ng/ml) con respecto al tiempo (min) en ratones con la apolipoproteína A-IV inactivada después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-I recombinante o disolución salina.

FIG. 7 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/ml) con respecto al tiempo (min) en ratones de tipo salvaje y con la apolipoproteína A-IV inactivada que consumen, de modo crónico, una dieta rica en grasas en un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

20 FIG. 8 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/ml) con respecto al tiempo (min) en ratones con la apolipoproteína A-IV inactivada que consumen, de modo crónico, una dieta rica en grasas, después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-IV de ratón recombinante ( $1 \mu\text{g/g}$ ) o disolución salina para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

25 FIG. 9 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (h) en ratones diabéticos después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-IV de ratón recombinante ( $1 \mu\text{g/g}$ ) o disolución salina para un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

FIG. 10 muestra los resultados de un análisis de la transferencia Western del nivel del componente de proteína A amiloide en suero en ratones de tipo salvaje, ratones con la apolipoproteína A-IV inactivada, y ratones con la apolipoproteína A-I inactivada.

30 FIG. 11 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) en ratones hembra de tipo salvaje y con la apolipoproteína A-IV inactivada con respecto al tiempo (min) durante un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT).

FIG. 12 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (min) en ratones de tipo salvaje después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-IV humana  $1,0 \mu\text{g/g}$  o disolución salina durante un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

35 FIG. 13 es una gráfica de la glucosa en plasma (mg/dl) con respecto al tiempo (min) en ratones hembra de tipo salvaje después de la administración intraperitoneal de apolipoproteína A-IV de ratón recombinante  $1,0 \mu\text{g/g}$  o disolución salina durante un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

FIG. 14 es una gráfica de barras que muestre el efecto de apoA-IV humana  $10 \mu\text{g/g}$  sobre islotes humanos despolarizados con KCl 30 mM y diazóxido  $250 \mu\text{M}$  en presencia de glucosa 3 mM o 20 mM.

40 FIG. 15 es una proteína con la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV humana de tipo salvaje de longitud completa (SEQ ID NO:1).

FIG. 16 es una proteína con la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV de ratón de tipo salvaje de longitud completa (SEQ ID NO:2).

45 FIG. 17 es una proteína con la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV humana de tipo salvaje de longitud completa con la adición de glicina en el extremo *N*-terminal (SEQ ID NO:3).

FIG. 18 es una proteína con la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV humana que muestra las sustituciones polimórficas T347S, Q360H, y/o E165K, y la adición opcional de glicina, alanina o valina en el extremo *N*-terminal (SEQ ID NO:4).

50 FIG.19 es un polinucleótido (SEQ ID NO:5) que codifica la apolipoproteína A-IV humana de tipo salvaje de longitud completa.

Los expertos en la técnica apreciarán que los elementos en las figuras se ilustran para simplificar y aclarar y no están dibujados necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos en las figuras pueden exagerarse con relación a otros elementos, así como se han retirado partes convencionales para ayudar a mejorar la comprensión de las diversas realizaciones de la presente descripción.

## 5 Descripción detallada

En la siguiente solicitud se emplean los siguientes términos y expresiones:

10 Tal como se emplea en la presente, la expresión "cantidad eficaz" describe la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. La cantidad eficaz para cualquier aplicación concreta puede variar dependiendo de una diversidad de factores que incluyen, pero no se limitan a la composición concreta que se está administrando, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad y/o el trastorno que se está tratando. En una realización, una "cantidad eficaz" es una dosis de aproximadamente 0,25 a 10  $\mu\text{g/g}$  de una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos. Como alternativa, una "cantidad eficaz" de una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, es de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{g/g}$ , de aproximadamente 0,25 a 2  $\mu\text{g/g}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{g/g}$ . Una apoA-IV, o un análogo biológicamente activo, se administra una vez diaria. Como alternativa, una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra aproximadamente 2 veces diarias. En otra alternativa, una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra más de dos veces diarias, por ejemplo, tres veces diarias. En otra alternativa, la apoA-IV se administra una vez cada segundo, tercer, cuarto, quinto o sexto día, o una vez semanal.

20 Tal como se emplea en la presente, la expresión "efecto biológico deseado" indica reducir los efectos, contrarrestar y/o eliminar una enfermedad o un trastorno. Por ejemplo, en el contexto de la T2DM, los efectos biológicos deseados incluyen, pero no se limitan a disminuir la glucosa en sangre, mejorar la tolerancia a la glucosa, restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa hasta un nivel normal, mejorar la secreción de insulina y/o restablecer sustancialmente la secreción de insulina hasta un nivel normal.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "nivel normal" describe un nivel que es sustancialmente el mismo nivel que aparecen en un sujeto que no necesita tratamiento. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de la T2DM, un nivel normal de glucosa en sangre es de aproximadamente 70 mg/dl a aproximadamente 130 mg/dl antes de las comidas y menor que aproximadamente 180 mg/dl aproximadamente una o dos horas después de las comidas, o de aproximadamente 70 mg/dl a aproximadamente 100 mg/dl antes de las comidas y menor que aproximadamente 140 mg/dl aproximadamente una o dos horas después de las comidas. En otro ejemplo, en el contexto del tratamiento de la T2DM, un nivel normal de tolerancia a la glucosa describe la capacidad del sujeto para metabolizar carbohidratos, de modo que el nivel de la glucosa en sangre es de aproximadamente 70 mg/dl a aproximadamente 130 mg/dl antes de las comidas y menor que aproximadamente 180 mg/dl aproximadamente una o dos horas después de las comidas, o de aproximadamente 70 mg/dl a aproximadamente 100 mg/dl antes de las comidas y menor que aproximadamente 140 mg/dl aproximadamente una o dos horas después de las comidas. En otro ejemplo, en el contexto del tratamiento de la T2DM, un nivel normal de secreción de insulina es la cantidad requerida para mantener un nivel normal de tolerancia a la glucosa, en el que el nivel de secreción de insulina es mayor que aproximadamente 1 ng/ml aproximadamente quince horas después de las comidas.

40 En el contexto del nivel de glucosa en sangre, el término "restablecer" describe el cambio del nivel de glucosa en sangre de un sujeto hasta un nivel normal. De modo similar, en el contexto de la tolerancia a la glucosa, el término "restablecer" describe el cambio de la tolerancia a la glucosa de un sujeto hasta un nivel normal. Además, en el contexto de la secreción de insulina, "restablecer" describe el cambio de la secreción de insulina de un sujeto hasta un nivel normal.

45 En el contexto de la apolipoproteína A-IV, la expresión "fragmento biológicamente activo" describe un fragmento de la apolipoproteína A-IV que es capaz de realizar un efecto biológico deseado en un sujeto con T2DM. La expresión "análogo biológicamente activo" describe un análogo de una apolipoproteína A-IV que es capaz de realizar un efecto biológico deseado en un sujeto con T2DM. En un ejemplo, un efecto biológico deseado es restablecer la tolerancia a la glucosa en ratones con apoA-IV inactivada, según se describe en el 2. Otro ejemplo de un efecto biológico deseado es provocar una disminución estadísticamente significativa de los niveles anómalos de glucosa en un modelo animal de T2DM, tal como el modelo de ratón descrito en el ejemplo 7.

50 Tal como se emplea en la presente, el término "obeso" describe un trastorno en el que un sujeto tiene un peso muy por encima del peso normal. En un ejemplo específico, el término "obeso" describe un trastorno en el que un sujeto tiene un peso de más de aproximadamente 20% por encima de su peso ideal y/o presenta un índice de masa corporal de aproximadamente treinta o más de aproximadamente treinta. En otra realización, el sujeto que se está tratando está obeso; en otra realización, el sujeto que se está tratando no está obeso; y en otra realización, el sujeto que se está tratando tiene un peso corporal normal.

55 Las realizaciones de la presente descripción se refieren a compuestos para su uso para tratar la T2DM en un sujeto que lo necesite, y composiciones farmacéuticas para su uso para tratar la T2DM.

En una realización, se describen compuestos y composiciones para su uso para tratar la diabetes. En una realización concreta, se describe una apolipoproteína A-IV (en lo sucesivo "apoA-IV"), o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso para tratar la T2DM en un sujeto que lo necesite.

5 En una realización, los compuestos y las composiciones son eficaces para disminuir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto. En un ejemplo concreto, los compuestos son eficaces para disminuir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto en aproximadamente 20 al 50%. En otro ejemplo, los compuestos son eficaces para disminuir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto en aproximadamente 40%. En otro ejemplo, los compuestos son eficaces para restablecer sustancialmente el nivel de glucosa en sangre hasta un nivel normal.

10 En otra realización, los compuestos y las composiciones para su uso para tratar la T2DM son eficaces para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa de un sujeto hasta un nivel normal. En un ejemplo concreto, los compuestos y las composiciones restablecen sustancialmente la tolerancia a la glucosa de un sujeto hasta un nivel normal dentro de aproximadamente dos horas después de la administración de una dosis de una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos. En otro ejemplo, la tolerancia a la glucosa de un sujeto se restablece sustancialmente hasta un nivel normal durante aproximadamente ocho a doce horas.

15 En otro ejemplo, los compuestos y las composiciones son eficaces para restablecer sustancialmente la secreción de insulina hasta un nivel normal. En un ejemplo concreto, el tratamiento es eficaz para restablecer sustancialmente la secreción de insulina hasta un nivel normal dentro de aproximadamente dos horas después de la administración de una dosis de una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos. En otro ejemplo, la secreción de insulina se restablece sustancialmente hasta un nivel normal durante aproximadamente ocho a doce horas. En otro ejemplo, el tratamiento es eficaz para disminuir el nivel de proteína C reactiva.

20 En una realización, una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra de modo sistémico. La administración sistémica de la apoA-IV, o de uno de sus análogos, se selecciona del grupo que consiste en la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

25 En otra realización, se describe una composición farmacéutica. En una realización concreta, la composición farmacéutica comprende una apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos. En otra realización, la apoA-IV, o uno de sus análogos, se formula para la administración a un sujeto para el tratamiento de la T2DM. En esta realización concreta, el tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica al sujeto.

30 Una "apolipoproteína A-IV" (también denominada en la presente "apoA-IV") se refiere a una apoA-IV de mamífero e incluye la apoA-IV de longitud completa y los fragmentos biológicamente activos de apoA-IV. La apoA-IV humana de longitud completa es una proteína de 376 aminoácidos (SEQ ID NO:1), cuya secuencia de aminoácidos se muestra en FIG. 15; la secuencia de aminoácidos de la apoA-IV de ratón de longitud completa (SEQ ID NO:2) se muestra en FIG. 16. La expresión "apolipoproteína A-IV" también incluye el análogo conocido en el que se añade una glicina al extremo *N*-terminal de la apolipoproteína A-IV de la secuencia humana de longitud completa (SEQ ID NO:3, tal como se muestra en FIG. 17), y sus análogos que presentan sustituciones conservativas para la glicina *N*-terminal (tal como alanina y valina). Una "apolipoproteína A-IV" también incluye sus formas polimórficas, que incluyen las sustituciones T347S, Q360H, o E165K en la secuencia humana representada por SEQ ID NO:1, o las correspondientes posiciones de SEQ ID NO:3. Así, "apolipoproteína A-IV" incluye la proteína de SEQ ID NO:4, mostrada en FIG. 18.

40 Un análogo biológicamente activo de la apolipoproteína A-IV tiene al menos 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con una apolipoproteína A-IV. Tal como se ha descrito en el párrafo anterior, una apolipoproteína A-IV incluye la apolipoproteína A-IV de mamífero de longitud completa (por ejemplo, humana o de mamífero), sus formas polimórficas, las proteínas de SEQ ID NO:3 y 4, y los fragmentos biológicamente activos de cualquiera de las anteriores. Las variaciones en los aminoácidos de los análogos biológicamente activos serán preferiblemente sustituciones conservativas con relación a las secuencias de tipo salvaje. Una "sustitución conservativa" es la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene la misma carga electrónica neta y aproximadamente el mismo tamaño y forma. Los restos aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos alifáticas o alifáticas sustituidas tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales se diferencia en no más de aproximadamente cuatro. Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramificaciones en sus cadenas laterales se diferencia en no más de una. Se consideran que los restos aminoácidos con grupos fenilo o fenilo sustituido en sus cadenas laterales tienen aproximadamente el mismo tamaño y forma. A continuación, se listan cinco grupos de aminoácidos. La sustitución de un resto aminoácido por otro resto aminoácido del mismo grupo produce una sustitución conservativa:

55 Grupo I: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, y aminoácidos no naturales con cadenas laterales alifáticas C1-C4 o alifáticas C1-C4 sustituidas con hidroxilo (de cadena lineal o monorramificadas).

Grupo II: ácido glutámico, ácido aspártico y aminoácidos no naturales con cadenas laterales alifáticas C1-C4 sustituidas con carboxilo (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo III: lisina, ornitina, arginina y aminoácidos no naturales con cadenas laterales alifáticas C1-C4 sustituidas con

amina o guanidino (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo IV: glutamina, asparagina y aminoácidos no naturales con cadenas laterales alifáticas C1-C4 sustituidas con amida (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo V: fenilalanina, fenilglicina, tirosina y triptófano.

5 Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, puede estar glicosilada o no glicosilada. La preparación de apolipoproteínas A-IV de ratón y humanas no glicosiladas recombinantes se describe en el ejemplo 11. La secuencia polinucleotídica de la apolipoproteína humana de tipo salvaje de longitud completa (SEQ ID NO:1) se muestra como SEQ ID NO:4 en la figura 18. La apolipoproteína A-IV empleada en los ejemplos 1-10 no está glicosilada. La apoA-IV puede prepararse según un método conocido en el campo de la biología molecular. Por ejemplo, la apoA-IV puede prepararse por medio de técnicas de clonación moleculares tradicionales.

Los ratones con apolipoproteína A-IV inactivada utilizados en los ejemplos se generaron según los procedimientos descritos en J. Lipid Res., septiembre de 1997, 38(9):1782-94.

15 En una realización concreta, la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen una amplia gama de diluyentes conocidos (es decir, disolventes), cargas, agentes extensores, ligantes, agentes suspensores, disgregantes, tensioactivos, lubricantes, excipientes, agentes humectantes y similares, que se emplean habitualmente en este campo. La composición farmacéutica es preferiblemente acuosa, es decir, es una formulación líquida, y preferiblemente comprende agua apirógena. Estos vehículos pueden emplearse por sí solos o en combinación, según la forma de la preparación farmacéutica. La preparación resultante puede incorporar, si es necesario, uno o más agentes solubilizantes, tampones, conservantes, colorantes, perfumes, aromatizantes y similares, que se emplean con profusión en el campo de las preparaciones farmacéuticas.

25 La apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, puede formularse en una forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras, inyecciones, disoluciones, emulsiones, suspensiones y jarabes. La forma y la vía de administración para la composición farmacéutica no están limitadas y pueden seleccionarse de modo adecuado. Por ejemplo, los comprimidos, las cápsulas, los gránulos, las píldoras, los jarabes, las disoluciones, las emulsiones y las suspensiones pueden administrarse por vía oral. Además, pueden administrarse inyecciones (por ejemplo, subcutáneas, intravenosas, intramusculares e intraperitoneales) por vía intravenosa solas o en combinación con un reconstituyente convencional que contenga glucosa, aminoácidos y/o similares, o pueden administrarse solas por vía intramuscular, intracutánea, subcutánea y/o intraperitoneal.

35 La composición farmacéutica de la invención para tratar la T2DM puede prepararse según un método conocido en la técnica farmacéutica de este tipo, empleando un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las formas orales, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras y similares, se preparan según métodos conocidos empleando excipientes tales como sacarosa, lactosa, glucosa, almidón, manitol y similares; ligantes, tales como jarabe, goma arábiga, sorbitol, tragacanto, metilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares; disgregantes, tales como almidón, carboximetilcelulosa o su sal de calcio, celulosa microcristalina, polietilenglicol y similares; lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, sílice y similares; y agentes humectantes, tales como laurato de sodio, glicerol y similares.

40 Pueden prepararse inyecciones, disoluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y similares según un método conocido y de modo adecuado empleando disolventes para disolver el ingrediente activo, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, polietilenglicol, aceite de sésamo y similares; tensioactivos, tales como éster de ácido graso de sorbitano, éster de ácido graso de polioxietilensorbitano, éster de ácido graso de polioxietileno, polioxietileno de aceite de ricino hidrogenado, lecitina y similares; agentes suspensores, tales como derivados de celulosa que incluyen carboximetilcelulosa sodio, metilcelulosa y similares, gomas naturales, que incluyen tragacanto, goma arábiga y similares; y conservantes, tales como ésteres del ácido parahidroxibenzoico, cloruro de benzalconio, sales del ácido sórbico y similares.

La proporción del ingrediente activo que va a contener la composición farmacéutica de la invención para tratar la diabetes puede seleccionarse, de modo adecuado, de un amplio intervalo.

50 En una realización concreta, el sujeto que necesita tratamiento para la T2DM es un mamífero. El mamífero puede seleccionarse del grupo que consiste en seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos, porcinos, y lagomorfos. En una realización concreta, el mamífero es un ser humano. En otra realización, la apoA-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, puede administrarse a un sujeto para el tratamiento de la T2DM, en el que el sujeto está obeso. Como alternativa, la apoA-IV puede administrarse a un sujeto para el tratamiento de la T2DM, en el que el sujeto no está obeso.

55 Remitiéndose a FIG. 1, se describe un dispositivo 1. El dispositivo 1 comprende un depósito 10 de la composición farmacéutica previamente analizada. El depósito 10 comprende un vial 12. El vial 12 puede estar formado de cualquier material que no inhiba la función de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el vial 12 puede

comprender vidrio y/o plástico. Además, el vial 12 puede comprender un septo 14 que puede ser atravesado con una aguja, a través del cual puede retirarse la composición farmacéutica. Durante el uso, el septo 14 del vial es atravesado por la aguja 22 de una jeringa 20, la composición farmacéutica se retira por medio de la jeringa 20 del vial 12, y la composición farmacéutica se administra mediante inyección a un sujeto que lo necesite.

## 5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran las composiciones de la presente descripción y la forma en que pueden utilizarse.

Ejemplo 1: Intolerancia a la glucosa de ratones con ApoA-IV inactivada

10 *Protocolo experimental.* Se obtuvieron ratones macho con apoA-IV inactivada ("knockout", en lo sucesivo "KO"). Ratones de tipo salvaje ("wild-type", en lo sucesivo "WT") actuaron como controles. Los ratones ApoA-IV KO y WT se obtuvieron de una colonia mantenida en University of Cincinnati (Cincinnati, OH). Los ratones ApoA-IV KO y WT fueron alimentados con una dieta de pienso. Antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa, los ratones ApoA-IV KO y los ratones WT se dejaron en ayunas durante cinco horas. En los ensayos de tolerancia a la glucosa, los ratones apoA-IV KO y los ratones WT recibieron una inyección por vía intraperitoneal con una dosis de  
15 aproximadamente 2 mg/g de peso corporal de glucosa, y se midió la glucosa en plasma aproximadamente 0, 15, 30, 60, y 120 minutos después de la inyección de glucosa. Los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron dos veces, una vez a los tres meses de edad y, de nuevo, a los dieciséis meses de edad.

20 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 2, ratones apoA-IV KO son intolerantes a la glucosa con relación a los ratones WT. De modo específico, FIG. 2 demuestra que los niveles de glucosa en plasma en ratones WT fueron más bajos que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO durante dos horas después de la inyección intraperitoneal de glucosa. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, la implicación de estos estudios es que la apoA-IV es necesaria para la homeostasis normal de la glucosa (al menos en machos). Además, tal como se muestra en FIG. 3, los ratones apoA-IV KO mostraron una mayor intolerancia a la glucosa cuando se ensayan a los dieciséis meses de edad. De modo específico, FIG. 3 demuestra que los niveles de glucosa en  
25 plasma en ratones apoA-IV KO ensayados a los dieciséis meses de edad fueron mayores que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO ensayados a los tres meses de edad. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, la implicación de estos estudios es que la tolerancia a la glucosa de ratones apoA-IV KO empeora con la edad.

*Experimento con ratones hembra de tipo salvaje y con ApoA-IV inactivada*

30 Ratones hembra de tipo salvaje y con ApoA-IV inactivada fueron sometidos al mismo ensayo de intolerancia a la glucosa intraperitoneal que el empleado para los ratones macho apoA-IV KO y WT, tal como se describió anteriormente en este ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 11. Los ratones hembra apoA-IV  $-/-$ , cuando se exponen por vía intraperitoneal a la glucosa, presentan unos mayores niveles de glucosa en plasma, comparado con los animales hembra WT, pero las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, los machos sí  
35 presentan una diferencia significativa entre los animales WT y KO.

Ejemplo 2: Restablecimiento de la tolerancia a la glucosa en ratones con ApoA-IV inactivada

40 *Protocolo experimental.* Tras demostrar que los ratones apoA-IV KO son intolerantes a la glucosa, se realizaron una serie de estudios en profundidad para determinar si la administración de apoA-IV a ratones apoA-IV KO restablecería la tolerancia a la glucosa hasta un nivel normal. De modo específico, se realizaron una serie de estudios para determinar no solo la cantidad de apoA-IV que se va a administrar, sino también el momento óptimo en el que administrar la apoA-IV antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa.

45 Ratones macho ApoA-IV KO recibieron una inyección por vía intraperitoneal con unas dosis de aproximadamente 0,25, 0,5, 1, y 2  $\mu$ g/g en peso de apoA-IV. Los ratones ApoA-IV KO también recibieron una inyección por vía intraperitoneal de disolución salina como control. Después de la inyección de apoA-IV de ratón o disolución salina, se realizaron los ensayos de tolerancia a la glucosa en los ratones de tres meses de edad, tal como se analizó previamente. De modo específico, los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron aproximadamente dos horas después de la inyección de apoA-IV o disolución salina. Los resultados experimentales indican que el momento óptimo para restablecer la tolerancia a la glucosa en ratones apoA-IV KO resulta ser cuando se administra apoA-IV aproximadamente dos horas antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa.

50 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 4, la administración de apoA-IV a ratones apoA-IV KO restablece la tolerancia a la glucosa hasta un nivel normal. De modo específico, FIG. 4 demuestra que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de apoA-IV fueron menores que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de disolución salina. Además, tal como se muestra en FIG. 4, los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de apoA-IV fueron los más bajos en los ratones apoA-IV KO inyectados con la dosis más alta de apoA-IV; de modo  
55 similar, los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de apoA-IV fueron los más altos en los ratones apoA-IV KO inyectados con la dosificación más baja de apoA-IV. Por consiguiente, se

descubrió que el grado de mejoría de la tolerancia a la glucosa depende de la dosis de apoA-IV administrada y, cuando se administran las dosis más altas, se consigue una tolerancia a la glucosa mejorada.

Ejemplo 3: Especificidad de la ApoA-IV para restablecer la tolerancia a la glucosa en ratones con ApoA-IV inactivada

5 *Protocolo experimental.* Para evaluar la especificidad de la apoA-IV, se administró apolipoproteína AI (en lo sucesivo "apoA-I") a ratones apoA-IV KO. La ApoA-I es una proteína fabricada por las células epiteliales del intestino delgado que también producen apoA-IV. La ApoA-I comparte muchas de las funciones de la apoA-IV. Ratones ApoA-IV KO recibieron una inyección por vía intraperitoneal con una dosis de 1 µg/g en peso de apoA-I. Ratones ApoA-IV KO también recibieron una inyección por vía intraperitoneal de disolución salina como control. Después de la inyección de apoA-I o disolución salina, se realizaron los ensayos de tolerancia a la glucosa en los ratones de tres meses de edad, tal como se analizó previamente. De modo específico, los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron aproximadamente dos horas después de la inyección de apoA-I o disolución salina.

10 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 5, la administración de apoA-I a ratones apoA-IV KO no restablece ni mejora la tolerancia a la glucosa.

Ejemplo 4: Mecanismo de restablecimiento de la tolerancia a la glucosa en ratones con ApoA-IV inactivada

15 *Protocolo experimental.* Para evaluar el mecanismo mediante el cual la ApoA-IV mejora la tolerancia a la glucosa en ratones apoA-IV KO, se midió la secreción de insulina inducida por glucosa en ratones apoA-IV KO. De modo más específico, se midió la secreción de insulina inducida por glucosa durante los ensayos de tolerancia a la glucosa en ratones de tres meses de edad, tal como se analizó previamente. En este estudio, ratones apoA-IV KO recibieron una inyección por vía intraperitoneal con una dosis de aproximadamente 1 µg/g en peso de apoA-IV de ratón dos horas antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa. Ratones ApoA-IV KO recibieron una inyección de disolución salina aproximadamente dos horas antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa como control.

20 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 6, la fase I de secreción de insulina no apareció en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de disolución salina. Sin embargo, tal como se muestra en FIG. 6, la fase I de secreción de insulina fue restablecida en ratones apoA-IV KO cuando se inyectó por vía intraperitoneal apoA-IV dos horas antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa.

Ejemplo 5: Eficacia de la ApoA-IV en ratones con ApoA-IV inactivada y de tipo salvaje que consumen dietas ricas en grasas

30 *Protocolo experimental.* Ratones ApoA-IV KO y WT fueron alimentados de forma crónica con dietas experimentales nutricionalmente completas semipurificadas ricas en grasas (AIN-93M) obtenidas en Dyets (Bethlehem, PA) durante 10 semanas. Las dietas de alto contenido en grasas contenía aproximadamente 20 g de grasas (de modo concreto, aproximadamente 19 g de grasa de mantequilla y 1 g de aceite de soja para proporcionar los ácidos grasos esenciales) por 100 g de dieta. Los ratones apoA-IV KO y WT fueron alojados en jaulas de tubo individuales con un lecho de mazorcas de maíz en un vivario con temperatura (aproximadamente  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminación (aproximadamente 12 h de luz/12 de oscuridad) controladas. Los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron en los ratones de tres meses de edad, tal como se analizó previamente. Antes de realizar los ensayos de tolerancia a la glucosa, los ratones ApoA-IV KO y los ratones WT se dejaron en ayunas durante cinco horas. En los ensayos de tolerancia a la glucosa, los ratones apoA-IV KO y los ratones WT recibieron una inyección por vía intraperitoneal con una dosis de aproximadamente 2 mg/g de peso corporal de glucosa

35 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 7, los ratones apoA-IV KO mostraron mayor intolerancia a la glucosa, con relación a los ratones WT. De modo específico, FIG. 7 demuestra que los niveles de glucosa en plasma en ratones WT fueron más bajos que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO durante dos horas después de la inyección intraperitoneal de glucosa.

Ejemplo 6: Restablecimiento de la tolerancia a la glucosa en ratones con ApoA-IV inactivada y ratones de tipo salvaje que consumen dietas ricas en grasas

45 *Protocolo experimental.* Se realizaron una serie de estudios relacionados con la administración de apoA-IV a ratones apoA-IV KO y WT que consumen dietas ricas en grasas durante 14 semanas a los tres meses de edad (20% en peso de grasa, 19% de grasa de mantequilla, y 1% de aceite de cártamo). De modo específico, ratones apoA-IV KO y WT recibieron una inyección por vía intraperitoneal con una dosis de aproximadamente 1 µg/g de peso corporal de apoA-IV de ratón. Los ratones ApoA-IV KO y WT también recibieron una inyección por vía intraperitoneal de disolución salina como control. Después de la inyección de apoA-IV o disolución salina, se realizaron los ensayos de tolerancia a la glucosa. De modo específico, los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron aproximadamente dos horas después de la inyección de apoA-IV o disolución salina.

50 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 8, la administración de apoA-IV a ratones apoA-IV KO mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa. De modo específico, FIG. 8 demuestra que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de apoA-IV fueron más bajos que los niveles de glucosa en plasma en ratones apoA-IV KO que recibieron una inyección de disolución salina [la frase

anterior es redundante, puesto que la siguiente frase describe lo mismo]. Aunque no se incluyen los datos en la presente, también se descubrió que la administración de apoA-IV a ratones WT que consumen, de modo crónico, una dieta rica en grasas, también mejora significativamente la tolerancia a la glucosa.

Ejemplo 7: Restablecimiento de la tolerancia a la glucosa en ratones con T2DM

5 *Protocolo experimental.* Para confirmar que la apoA-IV es eficaz para estimular la tolerancia a la glucosa en animales con T2DM, se obtuvieron ratones heterocigóticos KK Cg-A/J (en lo sucesivo "Cg-A/J") de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ratones Cg-A/J desarrollan hiperglucemia, hiperinsulinemia, obesidad e intolerancia a la glucosa a las ocho semanas de edad. La principal causa de la diabetes en estos ratones es la resistencia a la insulina producida por las interacciones poligénicas con la mutación A<sup>y</sup>, que codifica la proteína relacionada con el agutí y antagonista del receptor de melanocortina-IV. Los ratones Cg-A/J recibieron una dieta de pienso. Además, se produjo un notable aumento en la glucosa en sangre desde las diez hasta las catorce semanas de ser alimentados con dieta de pienso.

15 A las catorce semanas de edad, los ratones Cg-A/J recibieron apoA-IV de ratón (aproximadamente 1 µg/g de peso corporal) o disolución salina (como control) por medio de una inyección intraperitoneal. Después se determinó la glucosa en plasma a aproximadamente 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, y 24 horas.

20 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 9, la apoA-IV produce un efecto notable en la disminución del nivel de azúcar en sangre en ratones Cg-A/J, con relación al control de disolución salina. Aunque los ratones Cg-A/J que recibieron una inyección de disolución salina mantuvieron un nivel de glucosa en plasma constante a lo largo de las 24 horas del periodo de estudio, los ratones Cg-A/J que recibieron una inyección de apoA-IV experimentaron una disminución de la glucosa en plasma durante más de 10 horas y, durante la mayor parte de este periodo, el nivel de glucosa en plasma fue comparable con el de los animales C57BL/6J que los inventores habían estado estudiando. A partir de este estudio, se concluyó que la administración de apoA-IV es eficaz para disminuir la glucosa en plasma en ratones Cg-A/J.

Ejemplo 8: Nivel de componente P amiloide en suero en ratones ApoA-IV KO, ApoA-I KO, y WT

25 *Protocolo experimental.* Se realizaron una serie de estudio para determinar el nivel del componente de proteína A amiloide en suero A (en lo sucesivo "SAP") en ratones apoA-IV KO, apoA-I KO, y WT con dietas aterogénicas. Los ratones apoA-IV KO, apoA-I KO, y WT se obtuvieron en the University of Cincinnati. El SAP es una forma sérica del componente P amiloide (en lo sucesivo "AP"), una proteína pentámera de 25 kDa que se identificó por primera vez como el constituyente pentagonal de depósitos patológicos *in vivo* denominados amiloides. El SAP se comporta como una proteína C reactiva en seres humanos. De modo específico, se determinó el nivel de SAP en plasma en ratones apoA-IV KO, apoA-I KO, y WT en ratones apoA-IV KO, apoA-I KO, y WT después de 12 semanas de dieta aterogénica. El nivel de SAP en plasma se determinó mediante un análisis de la transferencia Western.

35 *Resultados experimentales.* Tal como se muestra en FIG. 10, el nivel de SAP en ratones apoA-IV KO (que se corresponde con los ratones número 1, 8, y 10) aumenta con relación al nivel de SAP en ratones apoA-I KO (que se corresponde con los ratones número 28, 29, y 30) y ratones WT (que se corresponde con los ratones número 19, 20, y 25).

40 Con el fin de describir y definir la presente descripción, se hace notar que los términos "aproximadamente" y "sustancialmente" se emplean en la presente para representar el grado inherente de incertidumbre que puede atribuirse a cualquier comparación cuantitativa, valor, medición u otra representación. Los términos "aproximadamente" y "sustancialmente" también se emplean en la presente para representar el grado en que una representación cuantitativa puede variar con respecto a una referencia mencionada sin que se produzca un cambio en la función básica del asunto en cuestión.

45 La anterior descripción y los dibujos solo deben considerarse ilustrativos de ejemplos de realizaciones, que llevan a cabo las características y las ventajas de la presente descripción. Pueden realizarse modificaciones y sustituciones en las características y las etapas descritas sin apartarse de la intención y el alcance de la presente descripción. Por consiguiente, no debe considerarse que la descripción está limitada a la anterior descripción y a los dibujos, sino que solo está limitada por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 8: La ApoA-IV humana disminuye los niveles de glucosa en sangre en ratones de tipo salvaje sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

50 *Protocolo experimental.* Se realizaron estudios para determinar si la administración de apoA-IV humana a ratones de tipo salvaje afectaría a los niveles de glucosa en sangre en ratones sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa.

55 Ratones de tipo salvaje de tres meses de edad recibieron una inyección por vía intraperitoneal con unas dosis de aproximadamente 1 µg/g en peso de apoA-IV humana. Como control, otro grupo de ratones de tipo salvaje recibió una inyección por vía intraperitoneal de disolución salina. Después de la inyección de apoA-IV humana o disolución salina, se realizaron los ensayos de tolerancia a la glucosa. De modo específico, los ensayos de tolerancia a la

glucosa se realizaron aproximadamente dos horas después de la inyección de apoA-IV o disolución salina y después de cinco horas de ayuno. Se recolectó sangre de la cola y se midió con un glucómetro.

*Resultados experimentales.* Tal como se muestra en la figura 12, la apoA-IV humana resultó eficaz para disminuir la glucosa en sangre en ratones de tipo salvaje sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa.

- 5 Ejemplo 9: Efecto de la ApoA-IV de ratón en ratones hembra de tipo salvaje sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

*Protocolo experimental.* Se realizaron estudios para determinar si la administración de apoA-IV de ratón a ratones hembra de tipo salvaje afectaría a los niveles de glucosa en sangre en ratones sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa.

- 10 Ratones hembra de tipo salvaje de tres meses de edad recibieron una inyección por vía intraperitoneal con unas dosis de aproximadamente 1 µg/g en peso de apoA-IV de ratón. Como control, otro grupo de ratones hembra de tipo salvaje recibió una inyección por vía intraperitoneal de disolución salina. Después de la inyección de apoA-IV humana o disolución salina, se realizaron los ensayos de tolerancia a la glucosa. De modo específico, los ensayos de tolerancia a la glucosa se realizaron aproximadamente dos horas después de la inyección de apoA-IV o disolución salina y después de cinco horas de ayuno. Se recolectó sangre de la cola y se midió con un glucómetro.

*Resultados experimentales.* Tal como se muestra en la figura 13, la apoA-IV de ratón resultó eficaz para disminuir la glucosa en sangre en ratones hembra de tipo salvaje sometidos a un ensayo de tolerancia a la glucosa.

Ejemplo 10: La ApoA-IV humana estimula la liberación de insulina en islotes humanos

- 20 Los islotes humanos de alta pureza fueron suministrados por University of Virginia, Axon Cells. Los islotes se cultivaron en RPMI 1640, que contenía FBS al 10% y glucosa 11 mM a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Después se preincubaron cuatro grupos de islotes 50 IEQ a 37°C durante 1 h en KRB normal (NaCl 129 mM, KCl 4,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, HEPES 10 mM y BSA al 0,2%) que contenía glucosa 3,0 mM. Los islotes en los dos primeros grupos después se incubaron en KRB normal que contenía glucosa 3,0 mM durante una hora en presencia o en ausencia de A-IV humana 10 µg/ml y después se incubaron con glucosa 20 mM durante una hora más en presencia o en ausencia de A-IV humana 10 µg/ml. Los islotes en los dos últimos grupos se incubaron en KRB KCl 30mM (NaCl 103,8 mM, KCl 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, HEPES 10 mM y BSA al 0,2%) más diazóxido 250 µmol/l que contenía glucosa 3,0 mM durante una hora en presencia o en ausencia de A-IV humana 10 µg/ml y después se incubaron con glucosa 20 mM durante una hora más en presencia o en ausencia de A-IV humana 10 µg/ml. Los medios se recolectaron al final de cada incubación de una hora. Los niveles de insulina se midieron con un kit de ELISA (Millipore).

Tal como puede observarse en FIG. 14, cuando los islotes humanos fueron máximamente despolarizados por KCl 30 mM más diazóxido 250 µM, la hA-IV 10 µg/ml mostró un significativo efecto estimulante sobre la secreción de insulina.

- 35 Ejemplo 11: Preparación de ApoA-IV no glicosilada

- Se introdujo el ADNc de apoA-IV humana y de ratón en un vector de mantenimiento pSP65, y se introdujo un sitio de restricción Afl III inmediatamente 5' de la secuencia codificadora para la proteína de apoA-IV madura. El gen se extrajo del vector de mantenimiento y se acopló en el vector de expresión pET30. La construcción se transfirió en células de *E. coli* BL-21 (DE3) y se cultivó en cultivos Luria-Bertani suplementados con kanamicina (30 µg/ml) a 37°C. Después de la inducción de la síntesis de la proteína de apoA-IV en las células, las células se recolectaron y se sonicaron. La proteína de ApoA-IV del lisado se purificó mediante una cromatografía en columna de afinidad de unión a His y diálisis. La proteína de apoA-IV resultante se diluyó hasta una concentración final de 1,0 mg/ml en disolución salina.

**REIVINDICACIONES**

1.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para tratar la diabetes mellitus de tipo II en un sujeto.

5 2.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para disminuir el nivel de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesite.

3.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, que tiene al menos 90% de identidad con la apolipoproteína A-IV, para su uso para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa en un sujeto.

10 4.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que su análogo biológicamente activo tiene al menos 99% de identidad con la apolipoproteína A-IV;

preferiblemente cuando el sujeto es un ser humano.

5.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV es:

X<sub>1</sub>VSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG  
 DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLREL  
 QQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX<sub>2</sub>  
 LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGL  
 TFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHL  
 DQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDK  
 VNSFFSTFKEKESQDKX<sub>3</sub>LSLPELEQQQEQQ<sub>4</sub>QEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID  
 NO:4)

15 en la que X es G, A, V o está ausente;

X<sub>2</sub> es E o K;

X<sub>3</sub> es T o S; y

X<sub>4</sub> es Q o H.

20 6.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la apolipoproteína A-IV es una apolipoproteína A-IV humana de longitud completa;

preferiblemente en la que la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV es:

EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAGD  
 LQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQQ  
 RLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKAK  
 IDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQMK  
 KNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE  
 FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFST  
 FKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO:1).

7.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína A-IV es:

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG  
 DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ  
 QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELK  
 AKIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQ  
 MKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQV  
 EEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVN SFF  
 STFKEKESQDKT LSLPELEQQQEQQQEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO:3).

5 8.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la apolipoproteína A-IV está glicosilada; o en la que la apolipoproteína A-IV no está glicosilada.

9.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la apolipoproteína A-IV se administra de modo sistémico;

10 preferiblemente, en la que la administración sistémica de la apolipoproteína A-IV, o de uno de sus análogos biológicamente activos, se selecciona del grupo que consiste en la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, e intraperitoneal.

15 10.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la apolipoproteína A-IV se administra en una dosis de 1 a 10 µg/g; o en la que la apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra en una dosis de 0,25 a 2 µg/g; o en la que la apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra en una dosis de aproximadamente 1 µg/g.

20 11.- Una apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la apolipoproteína A-IV se administra una vez diaria; o en la que la apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, se administra aproximadamente 2 veces diarias.

12.- Una composición farmacéutica que comprende la apolipoproteína A-IV, o uno de sus análogos biológicamente activos, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso para tratar la diabetes mellitus de tipo II en un sujeto, o para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un sujeto que lo necesite, o para restablecer sustancialmente la tolerancia a la glucosa en un sujeto.

25 13.- La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que la composición farmacéutica comprende además un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

14.- La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12 o 13, en la que la composición farmacéutica es una formulación líquida.

30 15.- La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que la composición farmacéutica es una formulación acuosa;

preferiblemente, en la que la formulación acuosa es apirógena.

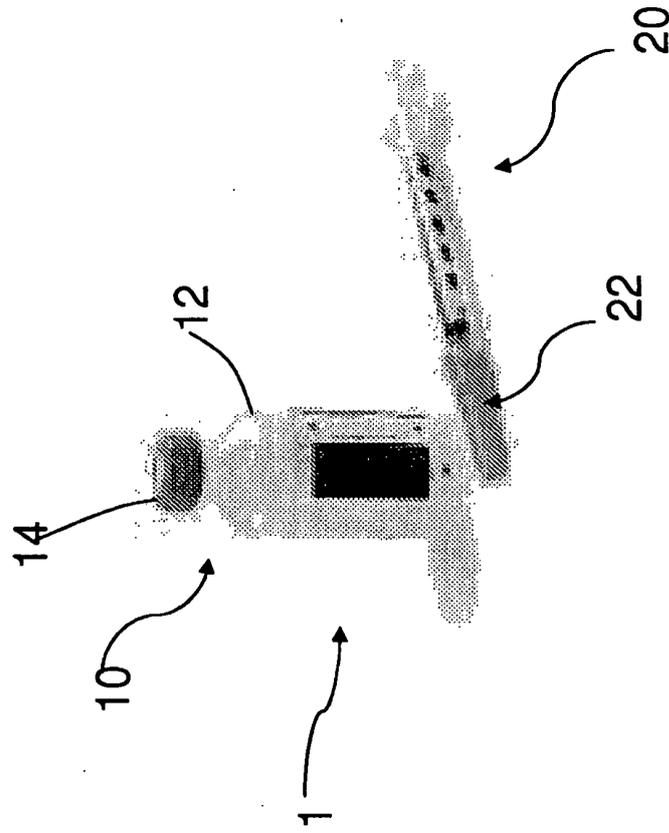


FIG. 1

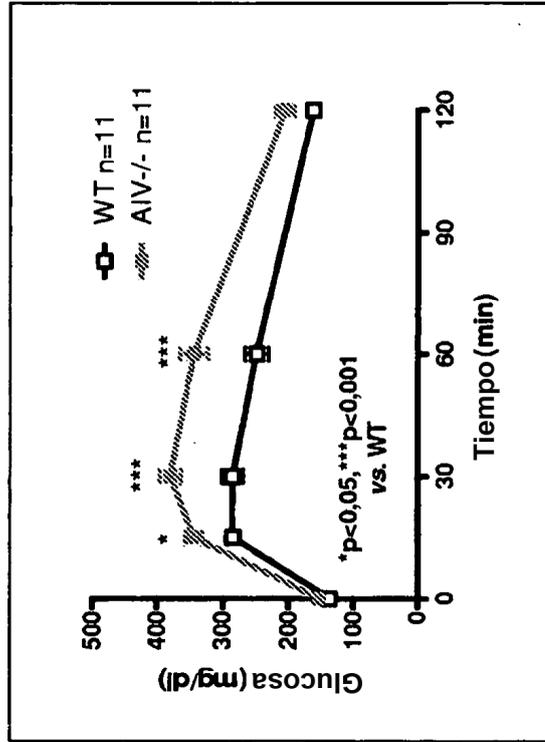


FIG. 2

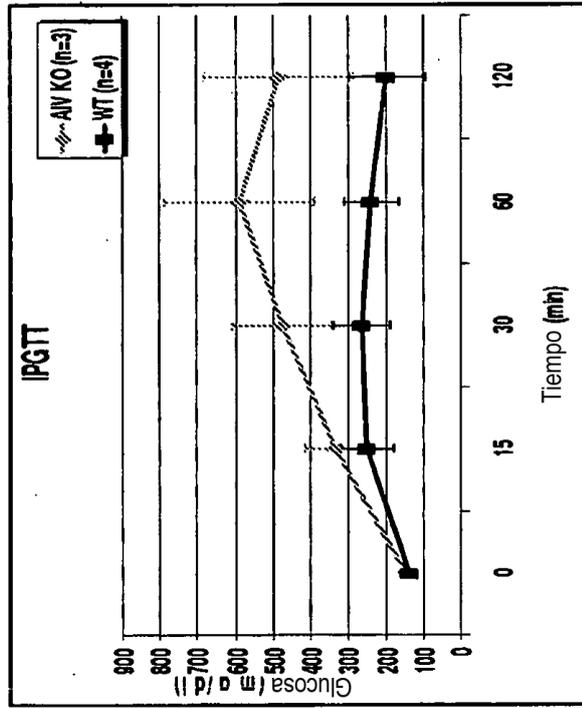


FIG. 3

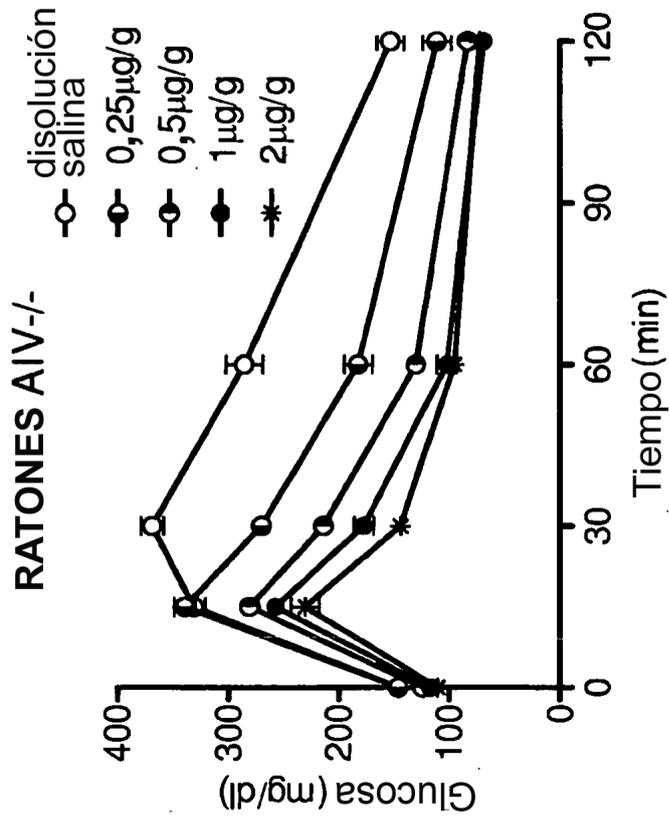


FIG. 4

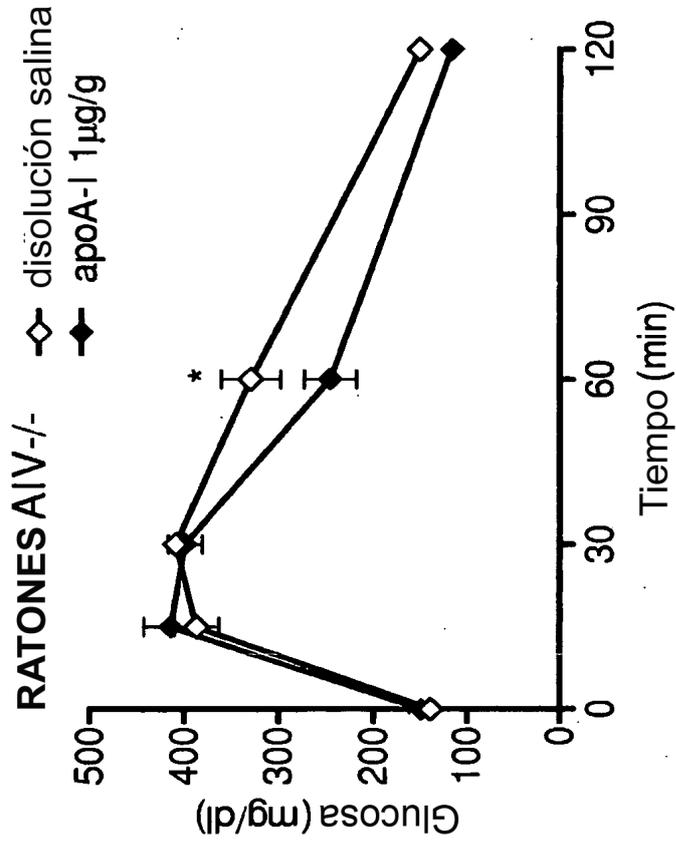


FIG. 5

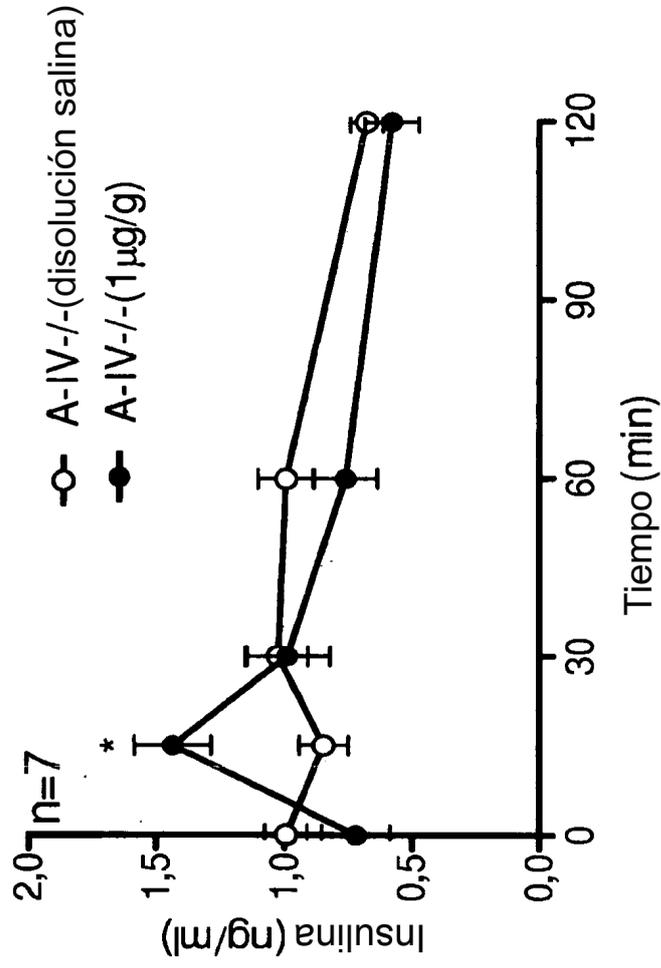


FIG. 6

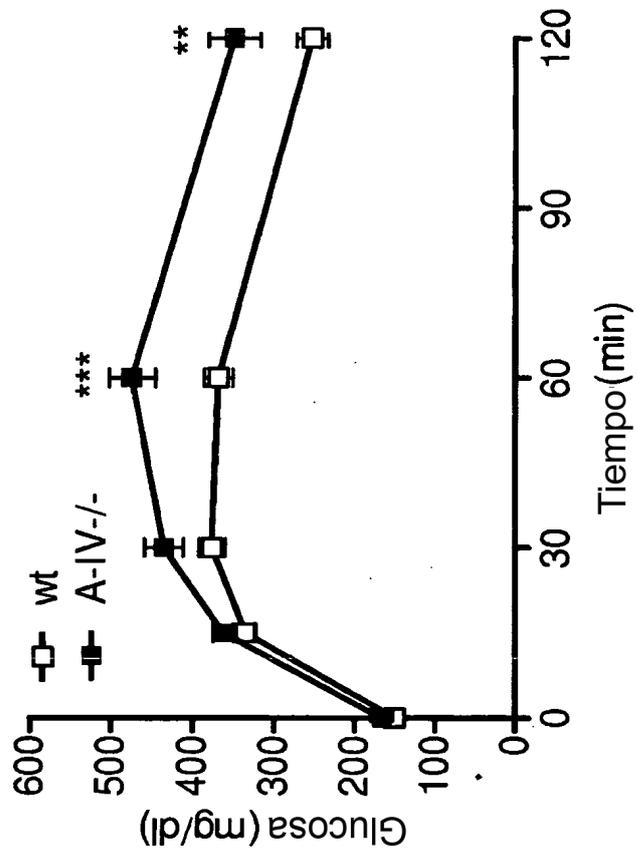


FIG. 7

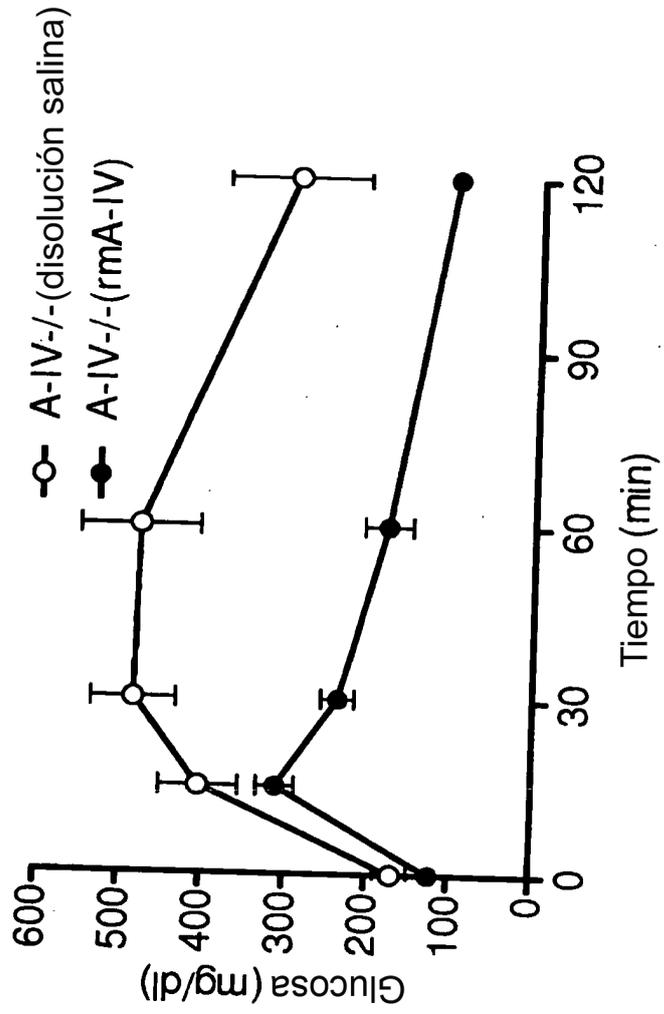


FIG. 8

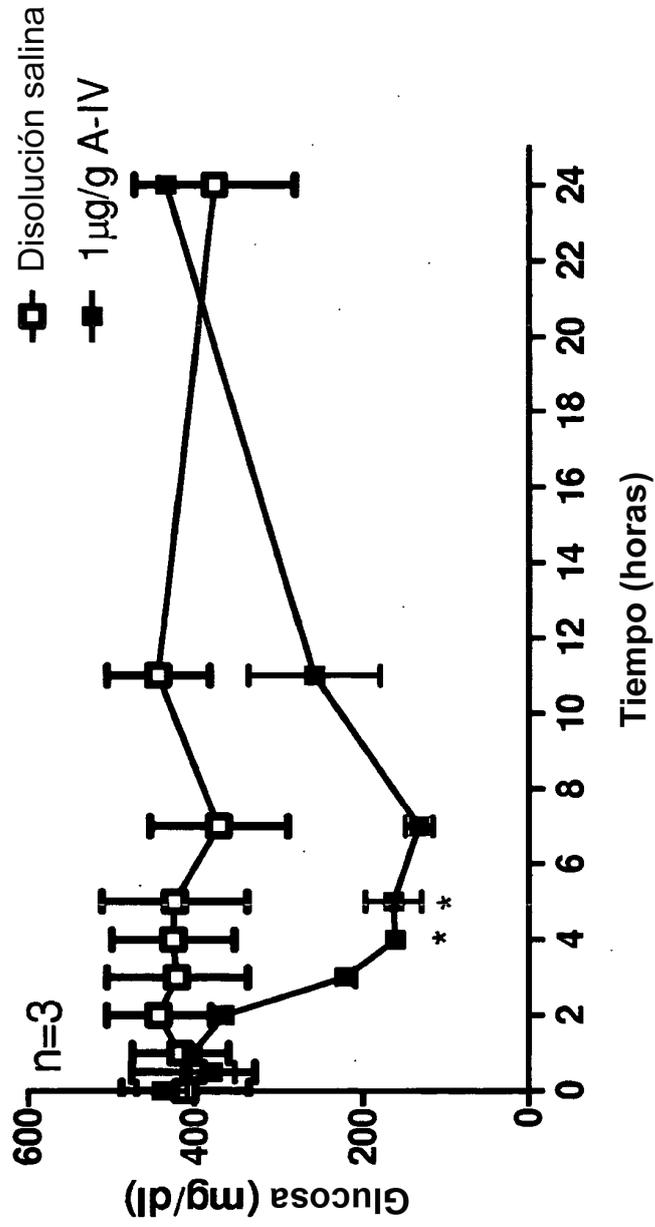


FIG. 9

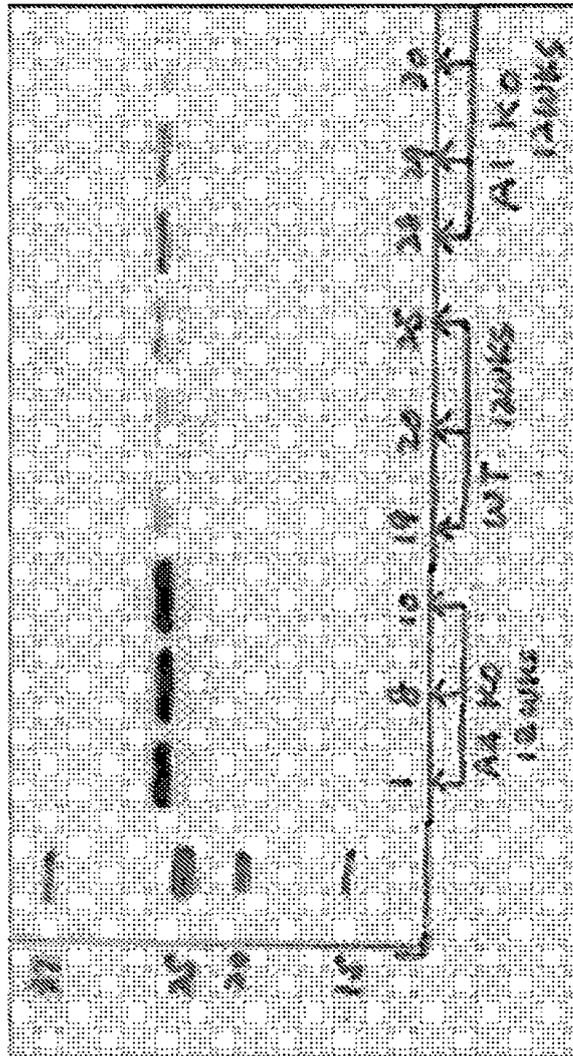


FIG. 10

IPGTT en ratones hembra WT y AIV-KO

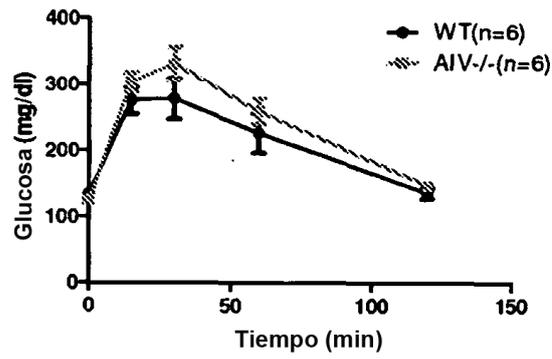


FIG. 11

IPGTT en ratones WT  
después de una inyección i.p.de A-IV  
humana o disolución salina

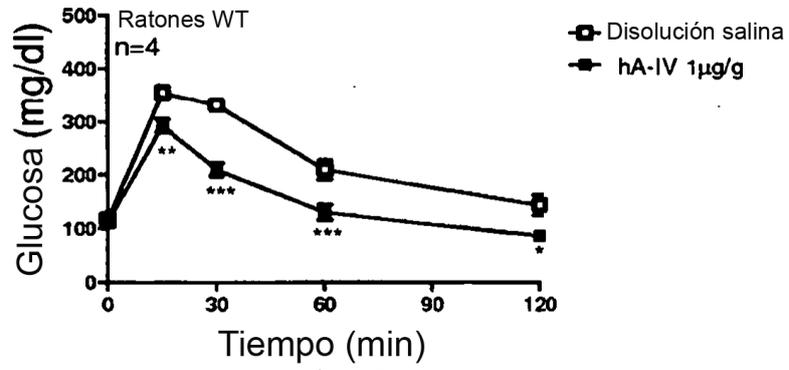


FIG. 12

Ratones hembra WT

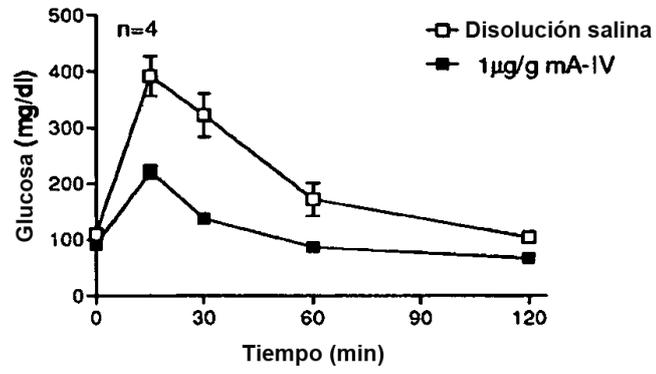
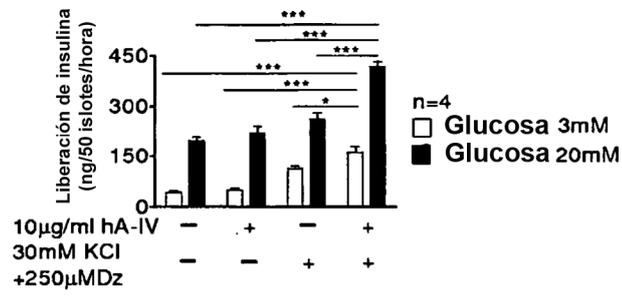


FIG. 13

## Islotes humanos tratados con A-IV humana



Cuando los islotes humanos se despolarizaron por medio de KCl 30 mM más Dz 250 µM, hA-IV 10 µg/ml mostró un efecto significativamente estimulador sobre la secreción de insulina.

FIG. 14

EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY  
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGD  
NLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQAS  
LRPHADELKAKIDQNVEELKGRRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQE  
KLNHQLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGL  
QKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVPEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDV  
EGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQQEQQV  
QMLAPLES

SEQ ID NO:1

FIG. 15

EVTSDQVANVVWDYFTQLSNNAKEAVEQFQKTDVQQLST  
LFASTYADGVHNLKLPFVVQLSGHLAQETERVKEEIKKEL  
EDLRDRKTQTFGENMQKLQEHLKPYAVDLQDQINTQTQE  
MKLQLTPYIQRMQTTIKENVVDNLHTSMPLATNLKDKFN  
RNMEELKGHLTPRANELKATIDQNLEDLRRSLAPLTVGVQ  
EKLNHQMEGLAFQMKKNAEELQTKVSAKIDQLQKNLAPL  
VEDVQSKVKGNTTEGLQKSLEDLNRQLEQQVEEFRRTVEP  
MGEMFNKALVQQLEQFRQQLGPNSGEVESHLSFLEKSLRE  
KVNSFMSTLEKKGSPDQPQALPLPEQAQEQAQEQAQEQVQ  
PKPLES

SEQ ID NO:2

FIG. 16

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKL  
GEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV  
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA  
DSLQASLRPHADELKAKIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPY  
AQDTQEKLNHQLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR  
GNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLG  
PHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKT LSLPELEQQQEQQQE  
QQQEQVQMLAPLES

SEQ ID NO:3

FIG. 17

X<sub>1</sub>EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKL  
GEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV  
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA  
DSLQASLRPHADX<sub>2</sub>LKAKIDQNVEELKGRLLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAP  
YAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNAAELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNL  
RGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKL  
GPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX<sub>3</sub>L<sub>3</sub>SLPELEQQQE<sub>3</sub>  
QEQQQE<sub>3</sub>QVQMLAPLES

X<sub>1</sub> es G, A, V o está ausente

X<sub>2</sub> es E o K

X<sub>3</sub> es T o S

X<sub>4</sub> es Q o H

SEQ ID NO:4

**FIG. 18**

GTCAGTGCTGACCAGGTGGCCACAGTGATGTGGGACTACTTCAGCC  
AGCTGAGCAACAATGCCAAGGAGGCCGTGGAACATCTCCAGAAATCTGAA  
CTCACCCAGCAACTCAATGCCCTCTTCCAGGACAAACTTGGAGAAGTGAAC  
ACTTACGCAGGTGACCTGCAGAAGAAGCTGGTGCCCTTTGCCACCGAGCT  
GCATGAACGCCTGGCCAAGGACTCGGAGAACTGAAGGAGGAGATTGGGA  
AGGAGCTGGAGGAGCTGAGGGCCCGGCTGCTGCCCCATGCCAATGAGGT  
GAGCCAGAAGATCGGGGACAACCTGCGAGAGCTTCAGCAGCGCCTGGAG  
CCCTACGCGGACCAGCTGCGCACCCAGGTCAACACGCAGGCCGAGCAGC  
TGCGGCGCCAGCTGACCCCTACGCACAGCGCATGGAGAGAGTGCTGCG  
GGAGAACGCCGACAGCCTGCAGGCCTCGCTGAGGCCCCACGCCGACGAG  
CTCAAGGCCAAGATCGACCAGAACGTGGAGGAGCTCAAGGGACGCCTTAC  
GCCCTACGCTGACGAATTCAAAGTCAAGATTGACCAGACCGTGGAGGAGC  
TGCGCCGCAGCCTGGCTCCCTATGCTCAGGACACGCAGGAGAAGCTCAAC  
CACCAGCTTGAGGGCCTGACCTTCCAGATGAAGAAGAACGCCGAGGAGCT  
CAAGGCCAGGATCTCGGCCAGTGCCGAGGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCG  
CCCTTGCCGAGGACGTGCGTGGCAACCTGAGGGGCAACACCGAGGGGC  
TGCAGAAGTCACTGGCAGAGCTGGGTGGGCACCTGGACCAGCAGGTGGA  
GGAGTTCCGACGCCGGGTGGAGCCCTACGGGGAAAATTCAACAAAGCCC  
TGGTGACGACAGATGGAACAGCTCAGGCAGAACTGGGCCCCCATGCGGG  
GGACGTGGAAGGCCACCTGAGCTTCTTGAGAAGGACCTGAGGGACAAG  
GTCAACTCCTTCTTCAGCACCTTCAAGGAGAAAGAGAGCCAGGACAAGACT  
CTCTCCCTCCCTGAGCTCGAGCAACAGCAGGAACAGCAGCAGGAGCAGCA  
GCAGGAGCAGGTGCAGATGCTGGCCCCTTTGGAGAGC

SEQ ID NO:5

FIG. 19