

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 177**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2014 PCT/FR2014/050821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2014 E 14720662 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2983784**

54 Título: **Composición que comprende la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para el tratamiento de la resistencia a la insulina**

30 Prioridad:

10.04.2013 FR 1353245

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

21.04.2020

73 Titular/es:

**THE HEALTHY AGING COMPANY (100.0%)
320 rue St-Honoré
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ANDREELLI, FABRIZIO;
AMOUYAL, PAUL;
MAGNAN, CHRISTOPHE;
CRUCIANI-GUGLIELMACCI, CÉLINE;
FAIVRE, JAMILA;
DARNAUD, MARION;
JAMOT, LAURE;
BRECHOT, CHRISTIAN y
AMOUYAL, GILLES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 755 177 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

Composición que comprende la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para el tratamiento de la resistencia a la insulina

Estado de la técnica

La presente invención se refiere a la utilización de la proteína HIP/PAP o de uno de sus derivados, para reducir la resistencia a la insulina o para prevenir su desarrollo. La invención estará particularmente destinada a los pacientes no insulino-requirientes.

La resistencia a la insulina se define por la disminución de los efectos metabólicos de la insulina sobre los tejidos insulino-sensibles (músculos esqueléticos, tejido adiposo blanco, hígado). En la práctica, la insulino-resistencia (IR) se manifiesta por una incapacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa hepática (mediante la inhibición de la neoglucogénesis o de la glicogenolisis), por una disminución de la capacidad del tejido muscular para captar, y por lo tanto utilizar, la glucosa, y por una lipólisis exagerada del tejido adiposo blanco que provoca una elevación de la concentración plasmática de ácidos grasos libres.

Con la secreción de insulina, la sensibilidad a la insulina (o a la inversa, la resistencia a la insulina), son dos variables dependientes, que interactúan de común acuerdo para mantener la homeostasis glucémica. Cualquier modificación de la glucemia provoca una modificación de la insulinemia y a la inversa. En consecuencia, cualquier aumento de la insulino-resistencia se compensa por el aumento concomitante de la secreción de insulina (se observa entonces una hiperinsulinemia compensatoria) a fin de mantener la glucemia normal (normoglucemia) o limitar la evolución hacia una hiperglucemia (es decir evitar la escalada patológica de la tolerancia glucémica normal, hacia la glucemia moderada en ayunas o la intolerancia a la glucosa). A partir de un cierto límite, la progresión de IR provoca un fenómeno de escape debido al agotamiento de la función insulino-secretora beta-pancreática, cuyos mecanismos subyacentes son todavía complejos (pérdida funcional y estructural de la función mitocondrial y/o apoptosis de las células beta pancreáticas, especialmente relacionada con una glucotoxicidad). La glucemia aumenta entonces francamente (glucemia en ayunas $\geq 1,26$ g/l, es decir 7 mM), se habla entonces de diabetes. Se considera que la diabetes de tipo II se establece cuando la glucemia supera este umbral de 7 mM en ayunas dos veces en una muestra de sangre. Esto se traduce en la no compensación de IR por la secreción de insulina, que demuestra la existencia de una insulinopenia denominada relativa. En esta fase, puede ser necesario iniciar una insulino-terapia en complemento del tratamiento de la IR, por las medidas higieno-dietéticas, o unos tratamientos farmacológicos. En una fase avanzada, la insulino-secreción dependiente de la glucosa se vuelve demasiado débil (incluso casi nula), se vuelve entonces imperativo desarrollar una insulino-terapia por multi-inyecciones (véase Silvio E *et al.*, *Diabetes Care* 35:1364-1379, 2012; Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)).

La insulina se analiza en el hombre mediante el método radio-inmunológico, o ELISA, en ayunas sobre plasma o suero. Los valores de base (en ayunas) normales van de 3,2 a 16,3 mUI/l, después aumentan hasta 40 mUI/l, a partir del minuto 20 después de una carga oral de glucosa de 75 g, y vuelven a valores basales dos horas después de la ingestión de glucosa. Esta medida, combinada con la de la glucemia, permite estimar la capacidad de la insulina para promover la captación tisular de la glucosa y mantener así una homeostasis glucosídica normal.

La sensibilidad a la insulina (así como la función secretora pancreática β que se le relaciona) puede estimarse utilizando el programa HOMA calculator (v. 2.2.2, Diabetes trials Unit, University of Oxford, descargable en la dirección siguiente: <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/download.php>) recientemente afinado e HOMA2 (*Homeostatic Model Assessment*). El modelo HOMA 2 (Levy JC *et al.*, *Diabetes Care*, 1998; 21: 2191-2192, véase también Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. *Diabetes Care*, 2004; 27(6): 1487-95) es un modelo estructural informático, cuyo calculador se basa en el bucle de regulación glucosa/insulina, y permite determinar, a partir de mediciones de las concentraciones plasmáticas en ayunas de glucosa y de insulina (o de péptido C), la función pancreática beta (% β , es decir HOMA B), y la sensibilidad a la insulina (% S) de un individuo, ya que para cada combinación de % β y de % S, existe sólo una única combinación de glucosa y de insulina/péptido C correspondiente. La validación de este calculador se ha efectuado comparando las ecuaciones utilizadas con los valores obtenidos por la medición directa de la sensibilidad a la insulina y de la secreción de insulina por unos métodos invasivos y reservados a la investigación (métodos de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico o de pinzamiento hiperglucémico). El calculador permite estimar al mismo tiempo la sensibilidad a la insulina y a la secreción de insulina mediante extracciones sanguíneas en ayunas.

Se ha mostrado (Kahn SE *et al.*, *Diabetes* 1993), que en un sujeto con una tolerancia glucídica normal, y unos grados variables de obesidad o de insulino-resistencia, la función secretora β varía de manera cuantitativa con la sensibilidad a la insulina. Existe en efecto una relación hiperbólica entre la sensibilidad a la insulina (S) y la función β (β). El producto del valor de las ordenadas (β) por el valor de las abscisas S es una constante que corresponde a la tolerancia glucídica del sujeto.

Así, es posible estimar la resistencia a la insulina mediante el cálculo del índice HOMA-IR (Matthews *et al.*, 1985), según la fórmula siguiente: $[(\text{Insulinemia}_{\text{en ayunas}} (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucemia}_{\text{en ayunas}} (\text{mM})) / 22,5]$. En un sujeto sano, no insulinoresistente, el índice HOMA-IR en ayunas es generalmente próximo a 1.

5 Finalmente, es posible realizar un ensayo de tolerancia a la insulina (ITT), que consiste en vigilar la glucemia después de haber inyectado (por vía peritoneal, intravenosa o subcutánea) una dosis de insulina de acción rápida calculada sobre el peso corporal (generalmente 0,75 UI/kg de peso corporal). Esta técnica se practica sobre todo en el animal. En el hombre, con el fin de librarse de las dificultades y de los riesgos relacionados con la hipoglucemia, se han propuesto varias disposiciones, que definen un ensayo de tolerancia a la insulina modificada o ensayo corto por vía intravenosa. La interpretación se refiere sólo a la velocidad de decrecimiento de las glucemias durante los quince primeros minutos del ensayo, con determinación de la relación $[(\text{glucemia}_{\text{basal G0}} - \text{Glucemia a 15 minutos G15}) / \text{G0}]$. Esta relación es normalmente inferior a 0,5 en pacientes sanos, no insulinoresistentes.

15 La concentración sérica de péptido C es un marcador de la secreción de insulina y refleja la capacidad de las células beta pancreáticas para producir la insulina. Los valores normales en ayunas van de 0,27 a 1,43 nmoles/l (o de 0,8 a 4,2 ng/ml) en el hombre. En un sujeto que presenta una diabetes de tipo I o una diabetes de tipo II con daños a las células pancreáticas, el índice de péptido C disminuye. En los pacientes que presentan una resistencia a la insulina asociada a una hiperinsulinemia endógena, este índice aumenta con respecto a la normalidad.

20 Las etiologías posibles de la resistencia a la insulina son numerosas y resultan de varias anomalías eventualmente combinadas: un sobrepeso abdominal, o una obesidad visceral, un sedentarismo prolongado o inactividad física, anomalías genéticas o adquiridas que afectan al funcionamiento de las proteínas de la cascada de señalización post-receptor de la insulina, un exceso de hormonas contra-reguladoras, un disfuncionamiento ovárico, diversos agentes farmacéuticos (como por ejemplo las corticoterapias, el abuso de esteroides sexuales), la gestación, las situaciones de hipercatabolismo, la desnutrición, un peso de nacimiento bajo para el tamaño y/o una malnutrición fetal. Se ha mostrado, en particular, que la obesidad era un factor principal de IR y que esta última aumentaba cuando el índice de masa corporal (IMC) aumentaba. En particular, la IR es prácticamente segura cuando el IMC supera los 40 kg/m² (Mericq *et al.*). De forma complementaria, se ha mostrado que la distribución del exceso de masa grasa tiene también un papel en el desarrollo de la IR. En efecto, la obesidad abdominal (o troncular o visceral) está reconocida como fundamental en la fisiopatología de IR a escala del organismo entero. Esto explica la posibilidad de ser insulinoresistente para unas IMC ampliamente inferiores a 40 kg/m² incluso en los valores del sobrepeso en sujetos, si el exceso de masa grasa es abdominal. Entran en esta categoría los pacientes que han tenido un evento cardiovascular (infarto del miocardio, accidente vascular cerebral isquémico, arteriopatía de los miembros inferiores), que hace descubrir el estado de insulinoresistencia hasta ahora desconocido. En efecto, estas poblaciones que padecen insulinoresistencia son de alto riesgo de aparición de un evento cardiovascular, independientemente de los factores de riesgo clásico (LDL-colesterol elevado, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes de tipo 2). La aparición de un evento cardiovascular en esta población debe hacer diagnosticar la insulinoresistencia a fin de tratarla en el plano terapéutico. La mayoría de las situaciones en las que la insulinoresistencia está presente tienen en común una alteración de la distribución del almacenamiento de la masa grasa. El tejido adiposo tiene, en efecto, un papel importante en el almacenamiento del exceso energético que proviene de los alimentos en forma de ácido graso. Su masa incrementada en la obesidad reduce la captación de la glucosa y aumenta la lipólisis. En los sujetos predispuestos a IR, se observa un desarrollo del tejido adiposo intra-abdominal. Este es a su vez menos sensible que el tejido adiposo subcutáneo para el efecto de inhibición de la lipólisis por la insulina. En consecuencia, el tejido adiposo visceral tiene capacidades lipolíticas incrementadas. Los ácidos grasos liberados en exceso y de manera mal regulada se recuperan por la circulación peritoneal y después la vena porta y después por el hígado. Esta afluencia de ácidos grasos participa en gran parte en la fisiopatología de la esteatosis hepática no alcohólica de los sujetos insulino-resistentes. El hígado esteatosico exporta en parte los lípidos almacenados en forma de triglicéridos (partículas VLDL-triglicéridos) en la sangre circulante. Estos triglicéridos pueden entonces hidrolizarse por la lipoproteína lipasa (LPL) endotelial, lo que permite a los músculos esqueléticos y a los islotes pancreáticos captar estos ácidos grasos. Aparecen así unos depósitos multilobulados de lípidos ectópicos, que participan a su vez en la reducción del efecto de la insulina y/o en la reducción de la secreción de insulina.

55 La IR está, por lo tanto, asociada a diversos estados patológicos, tales como las dislipidemias y/o la hipertensión arterial. El fenotipo asociado a IR se considera así como un actor central en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares ateromatosas.

60 La resistencia a la insulina representa ahora una diana terapéutica en su totalidad. Así, en el ámbito del riesgo de aparición de un evento cardiovascular, aunque se recomienda controlar los factores cardiovasculares clásicos (hipertensión arterial, dislipidemia aterógena, tabaquismo, diabetes de tipo 2), está también cada vez más indicado intervenir directamente sobre la resistencia a la insulina.

65 Además, se considera actualmente que el hiperinsulinismo crónico provocado por IR puede favorecer la mitogénesis celular que explica un sobre riesgo de aparición de cánceres en las poblaciones insulino-resistentes.

Parece por lo tanto fundamental desarrollar unas herramientas terapéuticas que permitan determinar específicamente la resistencia a la insulina, y no la insulinopenia y/o las deficiencias funcionales beta pancreáticas, para tratar unos pacientes, en particular por encima de la diabetes de tipo II, y más particularmente de los pacientes no insulino-requirientes.

5 Los antidiabéticos orales conocidos, como las sulfamidas hipoglucemiantes o sulfonilureas y las glinidas actúan exclusivamente sobre las células beta del páncreas endocrino estimulando la insulino-secreción, pero no tienen ningún efecto directo sobre la sensibilidad a la insulina.

10 Se conocen actualmente unos compuestos que permiten reducir específicamente la insulino-resistencia (sin efecto sobre la insulino-secreción), como las tiazolidinodionas, o las glitazonas, o también, en menor medida, la metformina, que actúan respectivamente sobre la insulino-resistencia adiposa y hepática. Sin embargo, su utilización es delicada debido a efectos secundarios importantes o a la dificultad de emplearlos en algunos pacientes (intolerancia digestiva, embarazo, insuficiencia renal o cardiaca o hepática, etc.).

15 Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos compuestos para tratar, disminuir o prevenir la resistencia a la insulina en pacientes no insulino-requirientes, o no insulinopénicos. Y eso especialmente por que la clase de las glitazonas no se comercializa ya en Francia, reduciendo la clase de los hipoglucemiantes insulino-sensibilizadores solo a la metformina.

20 La solicitante ha demostrado que, de manera sorprendente, la proteína HIP/PAP permitía disminuir específicamente la resistencia a la insulina. La proteína HIP/PAP puede, por lo tanto, utilizarse ventajosamente para tratar, limitar o prevenir la IR y los síntomas y trastornos asociados, en particular en pacientes no insulino-requirientes.

25 La proteína HIP/PAP es conocida por su actividad anti-apoptótica y mitogénica sobre las células hepática (US 13/032,521, WO 2004/112824, Simon *et al.*, FASEB J. agosto de 2003;17(11):1441-50).

30 Se ha demostrado también que un péptido de 15 aminoácidos, derivado de la familia Reg IIIa (HIP/PAP), el péptido HIP (Human prolslet Peptide), poseía una actividad regeneradora sobre los islotes pancreáticos y estimulaba así la producción de insulina (US 2010/0093605). En base a estos resultados, se ha sugerido la utilización de dicho péptido y de derivados de proteínas de la familia Reg IIIa para el tratamiento de pacientes estrictamente insulino-requirientes (que padecen diabetes de tipo I o que presentan una diabetes de tipo II descompensada).

35 Según el conocimiento de la solicitante, ningún documento de la técnica anterior describe el efecto de la proteína HIP/PAP sobre la resistencia a la insulina, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes.

Resumen de la invención

40 El presente documento describe la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para su utilización, en sujetos no insulino-requirientes, para el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina.

45 La presente invención se refiere por lo tanto a la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para su utilización, en pacientes no insulino-requirientes, para el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina, caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4. El presente documento describe también la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para limitar y/o reducir la resistencia a la insulina o para prevenir su aparición en poblaciones de riesgo. Se describe también la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos.

50 Según diferentes modos de realización, los sujetos objeto de la invención presentan una función pancreática β (% β , por ejemplo: HOMA B), estimada a partir del modelo HOMA 2, superior o igual al 60% y/o un HOMA-R inferior a 6.

55 En particular, la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, puede destinarse a sujetos que presentan una glucemia en ayunas inferior a 125 mg/dl, especialmente inferior a 120 mg/dl y más particularmente inferior a 110 mg/dl.

En algunos modos de realización, los sujetos presentan, 2h después de un ensayo de tolerancia oral a la glucosa, una glucemia inferior a 200 mg/dl, especialmente inferior a 180 mg/dl y más particularmente inferior a 140 mg/dl.

60 En algunos modos de realización, los sujetos tienen una tolerancia glucídica normal y/o son normoglucémicos en ayunas.

65 La presente invención encontrará también aplicaciones para aumentar el desarrollo muscular, estimular la toma de masa magra y prevenir o limitar el catabolismo muscular y la desnutrición proteica, para prevenir o tratar la dislipidemia y en particular la hipercolesterolemia, para prevenir o tratar la aterosclerosis, en particular la enfermedad coronaria o cerebral, y la arteriopatía de los miembros inferiores.

Así, la presente invención tiene también por objeto la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para aumentar el desarrollo muscular, estimular la toma de masa magra y prevenir o limitar el catabolismo muscular y la desnutrición proteica, caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.

La presente invención tiene además por objeto la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para prevenir o tratar la dislipidemia y en particular la hipercolesterolemia, caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.

La presente invención se refiere también a la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para prevenir o tratar la aterosclerosis y en particular la enfermedad coronaria y la arteriopatía de los miembros inferiores, caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.

Así, el presente documento se destinará ventajosamente también a los sujetos que presentan al menos uno de los trastornos seleccionados entre sobrepeso visceral, obesidad, síndrome metabólico, síndrome de ovarios poliquísticos, trastorno de la alimentación, hepatitis C, esteatosis hepática, sarcopenia, y más particularmente a los sujetos que presentan al menos un trastorno seleccionado entre el grupo constituido por sobrepeso visceral, obesidad, hiperandrogenia, trastorno de la alimentación, sarcopenia, hipercatabolismo, y desnutrición. La presente invención está ventajosamente destinada, por otro lado, a los sujetos que presentan al menos uno de los trastornos seleccionados del grupo constituido por: sobrepeso visceral, obesidad, hiperandrogenia, trastorno de la alimentación, sarcopenia, hipercatabolismo, desnutrición.

La proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, según la invención, está también destinada al tratamiento de la insulino-resistencia asociada al envejecimiento. En algunos modos de realización de la invención, el sujeto no insulino-requiriente es, por lo tanto, un sujeto mayor.

Los derivados de la proteína HIP/PAP se caracterizan por que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4. La secuencia de dichos derivados difiere de la secuencia SEQ ID nº 4 por al menos 1 aminoácido.

La invención se refiere finalmente a una composición que comprende una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP o de uno de sus derivados, tal como se define según la presente invención, en mezcla con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, para su utilización para tratar o prevenir la insulino-resistencia en el sujeto no insulino-requiriente.

Las composiciones según la invención podrán comprender una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP o de uno de sus derivados, en asociación con otro agente activo para regular la homeostasis glucémica.

Los diferentes modos de realización de la invención podrán tomarse, o no, en combinación los unos con los otros.

Descripción detallada de la invención

La solicitante ha puesto en evidencia que la administración de la proteína HIP/PAP a sujetos no insulino-requirientes, pero que presentan trastornos de la homeostasis glucídica, provoca una disminución muy significativa del índice HOMA-IR así como un aumento del efecto hipoglucemiante de la insulina exógena, lo que se traduce por una mayor caída de la glucemia, después de la administración intra-peritoneal de insulina de acción rápida durante un ensayo de tolerancia a la insulina (o ITT). Este efecto sugiere que la administración de la proteína HIP/PAP provoca una reducción específica de la insulino-resistencia. Estos efectos no se acompañan de un aumento de la secreción de insulina, ni a nivel basal, ni durante ensayos OGTT. Estos resultados ilustran así un efecto específico de la proteína HIP/PAP sobre la disminución de la resistencia a la insulina (o sobre el aumento de la sensibilidad a la insulina) y no sobre la insulino-secreción.

Categorías de sujetos y aplicación terapéutica de la invención:

El presente documento describe la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización para tratar, o reducir, la resistencia a la insulina, y la resistencia de los tejidos periféricos, o prevenir, limitar o impedir su desarrollo (y a la inversa, para aumentar la sensibilidad a la insulina, o limitar o prevenir la disminución de la sensibilidad a la insulina), en unos sujetos no insulino-requirientes.

Ventajosamente, la proteína HIP/PAP se utilizará también para estimular o aumentar la asimilación tisular de la glucosa por los tejidos diana.

5 Según la invención, los sujetos consisten en mamíferos, en particular seres humanos, animales domésticos y de granja así como los animales de zoo y de deporte, como los perros, los gatos, los caballos, los terneros, las vacas, los bueyes, los cerdos, los conejos, etc. Más particularmente, la presente invención está destinada a seres humanos. Los valores dados en el presente documento, en definición de los diferentes parámetros de la solicitud, se proporcionan en referencia a los valores medios encontrados en el hombre sano.

10 Por sujetos no insulino-requirientes, se entiende un sujeto para el cual el mantenimiento de la homeostasis glucémica no necesita la administración de insulina. Más particularmente, los pacientes no insulino-requirientes no siguen ningún tratamiento con antidiabéticos orales de la familia de los insulino-secretore. A título de ejemplo, un insulino-secretor comprende especialmente las sulfamidas hipoglucemiantes o sulfonilureas y las glinidas. En tales
15 pacientes, en efecto, la función secretora beta pancreática se mantiene (ausencia de insulinopenia endógena), de manera que no se administra una insulino-terapia exógena.

El presente documento describe varios modos de realización definidos a continuación, que podrán tomarse en combinación los unos con los otros.

20 En particular, la invención se dirige a sujetos que tienen una función pancreática β (β ; es decir HOMA B), estimada a partir del modelo HOMA 2 superior o igual al 60%, en particular superior o igual al 70%, superior o igual al 75%, o superior o igual al 80%. Este valor no puede ser superior al 100%. Tales sujetos presentan también un HOMA-IR inferior a 6 y más particularmente inferior o igual a 5, especialmente inferior o igual a 4,5. Según la invención, el índice HOMA-IR es también superior o igual a 0,8, y especialmente superior o igual a 0,9. Por ejemplo, la proteína
25 HIP/PAP se puede administrar a sujetos que presentan un índice HOMA-IR que varía de 0,8 a 5, o también de 0,9 a 4,5, más particularmente de 0,9 a 3.

La invención podrá así aplicarse a sujetos que presentan una glucemia variable inferior a 126 mg/dl en ayunas. En particular la invención no está destinada a los diabéticos.

30 Los sujetos de la invención podrán, por lo tanto, presentar una glucemia normal (sujetos normoglucémicos en ayunas), es decir inferior a 110 mg/dl en ayunas, preferentemente inferior o igual a 100 mg/dl, en particular que varían entre 80 y 100 mg/dl, o también inferior o igual a 95 mg/dl, y especialmente que varía de 80 a 95 mg/dl en ayunas. Los sujetos de la invención podrán, según otro aspecto, presentar una hiperglucemia moderada en ayunas
35 inferior a 125 mg/dl en ayunas, especialmente inferior o igual a 120 mg/dl, en particular que varía de 110 a 125 mg/dl, más particularmente de 110 a 120 mg/dl en ayunas.

En algunos modos de realización, los sujetos de la invención, que presentan una hiperglucemia moderada en ayunas, pueden ser también intolerantes a la glucosa y presentar así en la 2ª hora de una carga oral de 75 g de glucosa, una glucemia inferior a 200 mg/dl, y especialmente comprendida entre 140 y 200 mg/dl. Para unos valores inferiores a 140 mg/dl en la 2ª hora de la carga oral de 75 g de glucosa, se considera generalmente que la tolerancia glucídica es normal.

45 La proteína HIP/PAP para su utilización según la invención se destinará también particularmente a unos sujetos tales como los definidos, con riesgos de desarrollar una insulino-resistencia, es decir que presentan por ejemplo una al menos de las condiciones patológicas siguientes, favorables para el desarrollo de una insulino-resistencia: sobrepeso, especialmente visceral u obesidad (especialmente visceral), una anomalía de distribución de la masa grasa tal como las lipoatrofias parciales o generalizadas, adquiridas o congénitas, las lipohipertrofias parciales o
50 totales, adquiridas o congénitas, perteneciendo las anomalías de distribución de la masa grasa a un síndrome genético de IR (tales como el síndrome de Dunningan, el síndrome de Köbberling, el síndrome de Barraquer y Simones, el síndrome de Launsois-Bensaude o lipomatosis simétrica proximal, el síndrome de Rabson-Mendenhall), una hiperandrogenia, un trastorno de la alimentación, una disminución de la masa y de la fuerza muscular (dicho de otra manera, una sarcopenia), un sedentarismo prolongado o una inactividad física, unas anomalías genéticas o
55 adquiridas que afectan al funcionamiento de las proteínas de la cascada de señalización post-receptores de la insulina, un exceso de hormonas contra-reguladoras, una disfunción ovárica, diversos agentes farmacéuticos (como por ejemplo las corticoterapias o las perturbaciones de la secreción endógena del cortisol, el abuso de esteroides sexuales, los antiretrovirales), un evento cardiovascular revelador de la insulino-resistencia, una situación de hipercatabolismo, un peso de nacimiento reducido para el tamaño y/o una malnutrición fetal.

60 El sobrepeso visceral o abdominal hace referencia a una distribución de tipo androide, en la cual el exceso de grasa se sitúa a nivel de los órganos abdominales, en la pared abdominal y a veces en la parte alta de la espalda. El sobrepeso (o sobrecarga ponderal) y la obesidad se definen habitualmente por un Índice de Masa Corporal (IMC), que tiene en cuenta el peso y el tamaño de un sujeto para categorizar su corpulencia. Expresado en kg/m^2 , el IMC corresponde al peso dividido por el cuadrado del tamaño. Según las normas de la OMS, para un ser humano adulto,
65 un IMC comprendido entre 18,5 y 25 kg/m^2 corresponde a una corpulencia denominada "normal", es decir no

asociada a un aumento de la carga de morbilidad (efectos indeseables sobre la salud). El sobrepeso se caracteriza por un IMC comprendido entre 25 y 30 kg/m², y la obesidad por un IMC superior a 30 kg/m².

5 Según un modo de realización preferido de la invención, la proteína HIP/PAP se utilizará para prevenir, en particular para reducir o limitar el desarrollo de la insulino-resistencia, en sujetos no insulino-pépicos y/o intolerantes a la glucosa y/o normoglucémicos. Tales sujetos podrán presentar al menos uno de los factores de riesgo tales como los detallados anteriormente.

10 La solicitante ha demostrado también que la proteína HIP/PAP presentaba un efecto significativo sobre las dislipidemias, y permitía especialmente reducir las concentraciones séricas del colesterol y/o de triglicéridos en sujetos normales, o en sujetos cuyo peso es superior al normal (sobrepeso u obesidad). La proteína HIP/PAP se utilizará por lo tanto ventajosamente en sujetos que presentan una dislipidemia y especialmente una hipercolesterolemia (cantidad sérica de colesterol superior o igual a 2 g/l) y/o una hipertrigliceridemia (cantidad de triglicéridos superior o igual a 2,3 mmol/l). La proteína HIP/PAP se utilizará también según la invención en
15 pacientes que han sufrido un accidente cardiovascular o que presenta una aterosclerosis, una enfermedad coronaria y/o una arteriopatía de los miembros inferiores.

Según ciertos modos de realización, la proteína HIP/PAP según la invención se utilizará así para tratar, reducir la hiperlipemia, y en particular la hipercolesterolemia, o para prevenir o limitar su desarrollo. Más particularmente, la
20 utilización de la proteína HIP/PAP o de uno de sus derivados según la invención, permitirá reducir los niveles séricos de LDL-colesterol o limitar, reducir o impedir su aumento. La proteína HIP/PAP de la invención será también adecuada para el tratamiento y la prevención de patologías asociadas tales como la aterosclerosis, la enfermedad coronaria y la arteriopatía de los miembros inferiores.

25 Finalmente, la solicitante ha puesto en evidencia que la proteína HIP/PAP provoca, en los sujetos normales, como en los sujetos con sobrepeso y/o que siguen un régimen hiperlipídico, una disminución de la proporción masa grasa/masa magra. Más particularmente, el tratamiento con la proteína HIP/PAP provoca, en los sujetos con sobrepeso y/o que siguen un régimen hiperlipídico, una disminución significativa de la masa grasa, asociada a una
30 tendencia al aumento de la masa magra. En los sujetos normales, la administración de HIP/PAP provoca un aumento significativo de la masa magra asociada a una tendencia a la disminución de la masa grasa. Este efecto no está asociado a una pérdida de peso. Estos resultados demuestran que HIP/PAP influencia el metabolismo energético y modifica la composición corporal disminuyendo la proporción masa grasa/masa magra en los sujetos normales como en los sujetos con sobrepeso. Finalmente, se ha mostrado que la proteína HIP/PAP aumenta la asimilación de la glucosa específicamente por los músculos esqueléticos, en particular en los sujetos que tienen un
35 régimen hiperlipídico y/o con sobrepeso.

Las composiciones de la invención son también particularmente útiles para tratar o prevenir la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos. Se entiende en particular por tejidos periféricos, el hígado, el tejido adiposo y los
40 tejidos musculares esqueléticos. El aumento de la sensibilidad a la insulina de estos tejidos se traduce, entre otros, por una mejora de su capacidad para asimilar la glucosa.

El aumento de la asimilación de la glucosa a nivel muscular favorece el desarrollo muscular. Además, se sabe que una disminución de la relación masa grasa/masa magra influye favorablemente en la evolución de patologías del
45 metabolismo energético, como el síndrome metabólico, la intolerancia a la glucosa, el síndrome de los ovarios poliquísticos, la hiperandrogenia o las diabetes.

El presente documento describe, por lo tanto, también la utilización de la proteína HIP/PAP para disminuir la relación masa grasa/masa magra; se aplica en particular en sujetos mayores y/o que padecen trastornos del metabolismo
50 energético y/o en sujetos desnutridos y/o que presentan una sarcopenia y/o un hipercatabolismo y/o que tienen un antecedente quirúrgico significativo (como una cirugía bariátrica y/o una derivación intestinal y/o una reducción de la secreción exocrina del páncreas post-quirúrgico y/o una resección intestinal y/o la necesidad post-quirúrgica de una alimentación por soporte nutricional artificial). Por sujeto mayor, se entiende especialmente los sujetos de más de 60 años en particular, los sujetos de más de 70 años y más particularmente los sujetos de 75 años y más. En estos
55 sujetos, la proteína HIP/PAP será también útil para aumentar el anabolismo y el desarrollo muscular, prevenir o tratar la desnutrición, en particular proteica, estimular el aumento de masa magra y prevenir y/o limitar el catabolismo muscular o la sarcopenia, en particular del sujeto mayor. Ventajosamente, la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados según el presente documento se utilizará para tratar, reducir o limitar la pérdida muscular o la sarcopenia asociada al envejecimiento en el sujeto mayor, o a la desnutrición proteica.

60 La proteína HIP/PAP se utilizará también ventajosamente para el tratamiento o la prevención de la desnutrición o del hipercatabolismo. Por ejemplo, la proteína HIP/PAP podrá administrarse en sujetos desnutridos o en pacientes en estado hipercatabólico, o con riesgo de serlo, independientemente del IMC de los sujetos, es decir en sujetos que tienen un peso normal o que presentan sobrepeso u obesidad. En efecto, la desnutrición alcanza también los sujetos con sobrepeso u obesos.

65

El presente documento describe por lo tanto también un interés para la utilización de la invención para el tratamiento de la insulino-resistencia asociada al envejecimiento. La proteína HIP/PAP según la invención se utilizará así ventajosamente, en particular en sujetos mayores, para aumentar el desarrollo muscular y/o estimular el aumento de masa magra y/o prevenir y/o limitar el catabolismo muscular y la desnutrición, especialmente proteica.

5 La proteína HIP/PAP o uno de sus derivados podrá también utilizarse en forma de una composición que comprende una cantidad eficaz de dicha proteína o de uno de sus derivados y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

10 Según algunos modos de realización de la invención, la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados, podrá administrarse en combinación con al menos otro compuesto terapéutico para el tratamiento de la insulino-resistencia o de trastornos asociados.

15 El documento describe también un método de tratamiento de la insulino-resistencia en sujetos no insulino-requirientes, que comprende la administración de la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados.

El documento describe finalmente la utilización de la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la insulino-resistencia en sujetos no insulino-requirientes.

20 Proteína HIP/PAP y derivados según la invención:

La proteína HIP/PAP según la invención consiste en la proteína de secuencia SEQ ID nº 4.

25 Un derivado de la proteína HIP/PAP descrito en el presente documento comprende una proteína que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 1. La secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 1 corresponde a la proteína HIP/PAP de secuencia SEQ ID nº 4, escindida del péptido señal de 26 aminoácidos en N-terminal de dicha proteína.

30 Según otro modo de realización descrito en el presente documento, un derivado de la proteína HIP/PAP comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 2 o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 2. La secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 2 corresponde a la forma corta de la proteína HIP/PAP y, comparada con la secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 1, está escindida del pro-péptido de 11 aminoácidos en la posición N-terminal.

35 En un modo de realización alternativo, un derivado de la proteína HIP/PAP comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 3. La secuencia SEQ ID nº 3 corresponde a la secuencia SEQ ID nº 1, a la cual se ha añadido una metionina en la posición N-terminal. El derivado HIP/PAP de secuencia SEQ ID nº 3 se ilustra más particularmente en los ejemplos y se denomina también rcHIP/PAP o ALF5755. Este derivado puede producirse especialmente de manera recombinante en unas células de *E. coli*. El propéptido N-terminal de 12 aminoácidos (propéptido de 11 aminoácidos más la metionina adicional) puede escindirse a fin de obtener la forma corta de la proteína HIP/PAP (SEQ ID nº 2).

Pueden utilizarse, indistintamente, las formas corta o larga de la proteína HIP/PAP o de sus derivados.

45 Por derivado de la proteína HIP/PAP, se entienden también las formas derivadas biológicamente activas de la proteína HIP/PAP de secuencia SEQ ID nº 4 o de las formas escindida del péptido señal o corta, respectivamente de secuencias SEQ ID nº 1 o 2. Por biológicamente activo, se entiende que los derivados de la proteína HIP/PAP poseen la misma actividad biológica que la proteína HIP/PAP, o que las formas de secuencias SEQ ID nº 1 o 2.

50 A título de ejemplo, un derivado biológicamente activo de la proteína HIP/PAP posee, cuando se administra en una cantidad eficaz (véanse los protocolos definidos en la parte experimental), una al menos de las actividades siguientes:

- disminución del índice HOMA-IR durante el ensayo OGTT en ratones ob/ob o que han tenido un régimen hiperlipídico (High Fat Diet), tal como se define en los ejemplos.
- 55 - disminución de la glucemia durante el ensayo de tolerancia a la glucosa, frente a animales control.
- disminución de la masa grasa y/o aumento de la masa magra.
- 60 - aumento de la absorción muscular de la glucosa.

La invención se refiere a los derivados de la proteína HIP/PAP según la invención que corresponden a una proteína que tiene al menos un 90% de identidad con una proteína seleccionada entre el grupo formado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID 1 a 4.

65

Se entiende que una proteína que tiene al menos un 90% de identidad con una proteína de referencia poseerá al menos un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99% de identidad en aminoácidos con dicha proteína de referencia.

5 A fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos para las necesidades de la invención, las secuencias se alinearán para permitir una comparación óptima. Se pueden introducir unos espacios (gap) en una u otra de las secuencias a alinear a fin de permitir una alineación óptima, y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para la comparación. El porcentaje de identidad de las dos secuencias de aminoácidos comparadas puede obtenerse como se describe en el libro de D. Voet y J.G. Voet, Biochimie (2ª edición, De Boeck & Larcier, 2005, sección 7.4, párrafo B). Las alineaciones se realizan con el programa CLUSTAL W (versión 1.82) con los parámetros siguientes: (1) CPU MODE = ClustalW mp; (2) ALIGNMENT = « full »; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers »; (4) OUTPUT ORDER = « aligned »; (5) COLOR ALIGNMENT = « no »; (6) KTUP (word size) = « default »; (7) WINDOW LENGTH = « default »; (8) SCORE TYPE = « percent »; (9) TOPDIAG = « default »; (10) PAIRGAP = « default »; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = « none »; (12) MATRIX = « default »; (13) GAP OPEN = « default »; (14) END GAPS = « default »; (15) GAP EXTENSION = « default »; (16) GAP DISTANCES = « default »; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

20 Los derivados biológicamente activos de la proteína HIP/PAP incluyen los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos suficientemente homóloga a la proteína HIP/PAP o a una de sus secuencias de aminoácidos SEQ ID nº 1 a 4, que comprenden el mismo número de aminoácidos que la secuencia de referencia correspondiente y que posee la misma actividad biológica.

25 Los derivados biológicamente activos de la proteína HIP/PAP incluyen también los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos suficientemente homóloga a la proteína HIP/PAP o a una de sus secuencias de aminoácidos SEQ ID nº 1 a 4, que comprenden un número superior de aminoácidos a la secuencia de referencia correspondiente y que poseen la misma actividad biológica.

30 Además de las variantes alélicas naturales de la porción biológicamente activa de la proteína HIP/PAP que existen en el mamífero, el experto en la materia comprenderá que pueden introducirse unos cambios suplementarios por mutaciones en las secuencias SEQ ID nº 1 a 4, que no alteran la actividad biológica de dichas variantes. En particular, pueden aportarse sustituciones de aminoácidos no esenciales en las secuencias que corresponden a la proteína HIP/PAP o a los derivados de secuencias SEQ ID nº 1 a 3. Un aminoácido “no esencial” es un aminoácido cuyo cambio frente a la secuencia de referencia, y en particular frente a la proteína HIP/PAP salvaje (de secuencia SEQ ID nº 4) no altera la actividad biológica. Por el contrario, un aminoácido “esencial” consiste en un aminoácido cuyo cambio altera la actividad biológica de la proteína o del péptido derivado.

40 En algunos modos de realización, la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, puede asociarse o combinarse por unos enlaces no covalentes con porciones no-HIP/PAP. Por ejemplo, la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados podría asociarse a una partícula de liposoma. En función del tipo de liposoma, o del procedimiento de fabricación, la proteína HIP/PAP, o su derivado, podrá asociarse en la superficie del liposoma o encapsularse en el interior de dicho liposoma.

45 La proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, podría también asociarse a unas porciones no-HIP/PAP mediante enlaces covalentes. Tales porciones no-HIP/PAP pueden seleccionarse entre los compuestos proteicos o no, por ejemplo, el polietilenglicol, formando así un derivado HUP/PAP pegilado.

Un derivado de la proteína HIP/PAP según la invención comprende también los derivados que se vuelven biológicamente activos sólo durante su administración al paciente.

50 Finalmente, los derivados de la proteína HIP/PAP comprenden también las proteínas quiméricas o las proteínas de fusión. Tales proteínas se fusionan con unos polipéptidos no HIP/PAP. Estas últimas pueden fusionarse con la parte N o C-terminal. Típicamente, la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados pueden fusionarse con la secuencia GST a nivel de su parte C-terminal, a fin de facilitar la purificación de las proteínas recombinantes.

55 En algunos modos de realización, la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, se produce de manera recombinante en unas células bacterianas o animales, incluyendo las células de insectos y de mamíferos, según unas técnicas conocidas por el experto en la materia.

60 En otros modos de realización, la proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, tal como se ha descrito anteriormente, puede aislarse a partir de una célula o de un tejido mediante unas técnicas conocidas de purificación.

La proteína HIP/PAP y sus derivados pueden también producirse por síntesis química.

65 A continuación en el documento, el término proteína HIP/PAP recubrirá la proteína HIP/PAP en sí misma, así como sus derivados tales como se han descrito anteriormente.

Composiciones según la invención:

La invención se refiere también a una composición que comprende la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados tales como se han descrito anteriormente, para su utilización para tratar, reducir, limitar o prevenir el desarrollo de la insulino-resistencia en pacientes no insulino-requirientes.

Tal composición podrá también utilizarse para aumentar la proporción masa magra/masa grasa en pacientes que presentan trastornos del metabolismo energético.

Según diferentes modos de realización, la invención es particularmente ventajosa para el tratamiento de sujetos tales como los definidos anteriormente.

Tal composición comprenderá una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, en particular un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por excipiente fisiológicamente aceptable, se entiende un excipiente no tóxico para el sujeto al cual se le administra en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables corresponden a los excipientes clásicamente utilizados por el experto en la materia en el ámbito de preparación farmacéutica. Los excipientes se seleccionan según la forma farmacéutica y el modo de administración deseado entre excipientes habituales que se conocen por el experto en la materia (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A éd., 1980).

A título de ejemplo, unas composiciones descritas en el presente documento podrán comprender, en función de las indicaciones terapéuticas y de la proteína HIP/PAP o de su derivado:

a) la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados;

b) un tampón capaz de mantener el pH en un intervalo de estabilidad máximo, preferiblemente de 1 a 9, más preferiblemente de 4 a 8, y más particularmente aún de 6 a 7,5;

c) un detergente o un tensioactivo que estabiliza la proteína o el polipéptido contra la agregación inducida por la agitación

d) un isotónico

e) un conservante, seleccionado por ejemplo entre el grupo constituido por los fenoles, los alcoholes bencílicos, los haluros de benzotelio, los cloruros

f) agua

Si el detergente o el tensioactivo empleado es no iónico, podrá seleccionarse entre los polisorbatos, el PLURONIC TM, el polietilenglicol (PEG) o los poloxámeros.

Un isotónico permitirá mantener la isotonicidad de la composición e incluirá típicamente unos polialcoholes como la glicerina, el eritritol, el arabitol, el xilitol, el sorbitol o el manitol, utilizados solos o en combinación. Alternativamente, el cloruro de sodio y/o cualquier otra sal inorgánica, podrá utilizarse como isotónico.

El tampón podrá ser, por ejemplo, el acetato, el citrato, el succinato, un tampón fosfato o cualquier otro tampón inorgánico, en función del pH deseado.

Los conservantes de tipo fenol, alcohol bencílico, haluros de benzotelio y cloruros son unos agentes antimicrobianos conocidos. Unos conservantes típicos comprenden el cloruro de octadecildimetilbencilamonio, el cloruro de hexametonio, el cloruro de benzalquonio, los fenol, butilo o alcoholes bencílico, los alquilparabenos como el metil o propil parabeno, el catecol, el resorcinol, el ciclohexanol, el 3-pentanol y el m-cresol.

Unos excipientes complementarios podrán asimismo comprender los antioxidantes, como el ácido ascórbico y la metionina, unos agentes quelantes, como EDTA, unos azúcares como la sacarosa, el manitol, la tetralosa o el sorbitol, etc.

La proteína HIP/PAP o su derivado podrá estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Se entienden así unas sales preparadas a partir de ácidos no tóxicos o de bases no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, que incluyen las sales y los ácidos orgánicos e inorgánicos. A título de ejemplo, se pueden citar las sales de metales alcalinos (sales de sodio y de potasio), las sales de metales alcalinotérreos (sales de calcio y de magnesio), las sales de amonio, las sales de bases orgánicas (sales de piridina o de trietilamina), las sales de ácidos inorgánicos (hidrocloruro, sulfato, nitrato), y las sales de ácidos orgánicos (acetato, oxalato, p-toluenosulfonato).

Modos de administración de la proteína HIP/PAP:

- 5 Según un modo de realización preferido, la proteína HIP/PAP se administra en una cantidad eficaz, es decir la cantidad necesaria para obtener los efectos esperados de la invención. Tal cantidad de proteína HIP/PAP se determinará, generalmente de manera empírica, en función de la condición patológica considerada y del sujeto a tratar. La cantidad eficaz dependerá también del modo de administración considerado, del compuesto administrado (proteína HIP/PAP o derivado) y de su formulación. Los ajustes necesarios para la determinación de la cantidad eficaz para obtener el efecto terapéutico máximo corresponden a unas técnicas de rutina para el clínico.
- 10 Partiendo de los resultados ilustrados en los ejemplos, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP está comprendida entre 0,1 µg/día/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/día/kg de peso corporal. A pesar de que en algunos modos de realización, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP puede alcanzar más de 10 mg/kg, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP según la presente invención es generalmente inferior a 5 mg/kg de peso corporal, lo que incluye unas cantidades inferiores a 4,5 mg/kg, 4 mg/kg, 3,5 mg/kg, 3 mg/kg, 2,5 mg/kg o 2000 µg/kg. Más particularmente, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP según la presente invención comprende unas cantidades de al menos 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 50 µg/kg, 60 µg/kg, 70 µg/kg, 80 µg/kg, 90 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg o más frente al peso corporal.
- 15 Según unos modos particulares de realización, la proteína HIP/PAP se administra según una dosificación comprendida entre 10 y 5000 µg/kg, preferiblemente entre 100 y 2000 µg/kg.
- 20 En el ratón, una dosis eficaz típica determinada experimentalmente está comprendida entre 10 y 2000 µg/kg de peso corporal, más particularmente entre 150 y 1500 µg/kg de peso corporal. Las adaptaciones inter-especies de dosificación se pueden realizar según un método conocido por el estado de la técnica, por ejemplo como se describe en el artículo de Mordenti *et al.*, Pharmaceut. Res. 8, p. 1351 (1991). Clásicamente, en el ratón adulto de peso normal, la dosis eficaz está comprendida entre 1 y 100 µg/día.
- 25 Clásicamente, en el hombre, la dosis eficaz de la proteína HIP/PAP empieza a aproximadamente 3 mg en pacientes que pesan aproximadamente 70 kg, es decir aproximadamente 40 µg/kg de peso corporal.
- 30 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica o rectal, el principio activo (la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados) puede administrarse en forma unitaria de administración, en mezcla con unos excipientes farmacéuticos, tales como se han descrito anteriormente y/o clásicos de los animales y de los seres humanos para la prevención o el tratamiento de la insulino-resistencia.
- 35 Los modos de administración preferidos son las vías enteral, en particular oral, e intravenosa. A título de ejemplo, una composición de la invención se podrá administrar por vía intravenosa de forma continua o por bolus, o diariamente por vía oral.
- 40 Ventajosamente, un producto de combinación según la invención se administra por vía oral. Las formas apropiadas para la vía oral son, por ejemplo, los comprimidos, las cápsulas, las pastillas, los polvos, los granulados, los liofilizados, los solutos bebibles y los siropes. Los comprimidos, polvos, granulados, liofilizados, solutos bebibles y los siropes constituyen la forma farmacéutica o cosmética adaptada a la vía oral actualmente preferida. Los comprimidos o cápsulas pueden ser de naturaleza variada, de liberación inmediata, controlada o retrasada y eventualmente en forma efervescente u orodispersable. Se obtiene una preparación cápsula mezclando el ingrediente activo (i) o (ii) con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.
- 45 Las formas para la administración oral, tal como las cápsulas o comprimidos son un modo de realización de la invención ventajoso. Más particularmente, las formas unitarias de administración de la proteína HIP/PAP, como las cápsulas, los comprimidos, las bolsitas o ampollas para suspensión bebibles, comprenderán, típicamente, unas cantidades de proteína HIP/PAP o uno cualquiera de sus derivados que va de 0,1 a 200 mg y más particularmente de 50 a 100 mg.
- 50 Una preparación en forma de jarabe o de elixir puede, por ejemplo, contener HIP/PAP conjuntamente con un edulcorante, un antiséptico, un conservante, un agente que da sabor o un colorante apropiado.
- 55 Los polvos, liofilizados o gránulos dispersables en agua pueden contener HIP/PAP en mezcla con unos agentes de dispersión o unos agentes humectantes o unos agentes de puesta en suspensión, así como con unos correctores de sabor o unos edulcorantes.
- 60 Según la invención, la proteína HIP/PAP, en forma adecuada para la toma por vía oral, puede también destinarse a una utilización como complemento alimenticio. Tal preparación es particularmente adecuada para utilizaciones en el
- 65

ámbito de la prevención de la insulino-resistencia en sujetos de riesgo y/o en pacientes desnutridos, que presentan un estado hipercatabólico, o que presentan una sarcopenia. Tal preparación es también adecuada para una utilización de HIP/PAP que tiene como objetivo aumentar la proporción masa magra/masa grasa de los individuos.

5 La proteína HIP/PAP podrá esterilizarse previamente a la administración *in vivo*. La esterilización se podrá obtener por filtración sobre unas membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización o de la reconstitución. La proteína HIP/PAP administrada de manera sistémica podrá ventajosamente liofilizarse o almacenarse en solución. En forma liofilizada, la proteína HIP/PAP se formula generalmente en combinación con unos excipientes que permiten la reconstitución con un diluyente apropiado durante la utilización.

10 La proteína HIP/PAP podrá administrarse diariamente en una toma o de manera fraccionada (por ejemplo de 2 a 3 veces por día) hasta obtener el efecto terapéutico deseado. Podrá también administrarse de manera crónica, para prevenir o limitar el desarrollo de la resistencia a la insulina, por ejemplo en sujetos de riesgo, que presentan unas condiciones fisiológicas y/o patológicas favorables para el desarrollo de una insulino-resistencia.

15 La proteína HIP/PAP podrá también administrarse en forma de tratamiento, por ejemplos tratamientos que van de 15 días hasta 3 meses, eventualmente repetidos de 1 a 6 veces a dosis e intervalos de tiempo determinados. Estos modos de administración estarán particularmente indicados en el ámbito de la prevención de la insulino-resistencia en sujetos de riesgo y/o en pacientes desnutridos, que presentan un estado hiper-catabólico, o que presentan una sarcopenia.

20 La proteína HIP/PAP según la invención podrá también combinarse en el ámbito de una poli-terapia con otros compuestos para el tratamiento de la insulino-resistencia o de condiciones asociadas, como las dislipidemias o la aterosclerosis.

25 La proteína HIP/PAP según la invención podrá también administrarse en combinación con medidas higieno-dietéticas, como un régimen hipocalórico y/o hipolipídico y un aumento de la actividad física.

30 Utilización según la invención:

La presente invención se refiere también a la utilización de la proteína HIP/PAP o de uno de sus derivados, tales como se han descrito anteriormente, para tratar, reducir, limitar o prevenir el desarrollo de la insulino-resistencia, en los sujetos no insulino-requirientes, tales como se definen en los diferentes modos de realización descritos anteriormente.

35 Según unos modos de realización particulares de la invención, la proteína HIP/PAP se utilizará en los sujetos tales como los descritos anteriormente.

40 En algunos modos de realización de la invención, el derivado de la proteína HIP/PAP se caracterizará por que comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 o 2.

Figuras

45 Figura 1: Efecto del tratamiento ALF5755 (■) frente a placebo (●) sobre la resistencia a la insulina. Fig. 1A: evolución de la glucemia (mg/dl) durante el ensayo de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones ob/ob después de 2 semanas de tratamiento. Fig. 1B-C: evolución de la insulinemia (ng/ml) durante OGTT (B), y del índice HOMA-IR (C) en los ratones HFD después de 4 semanas de tratamiento.

50 Fig.1D: captación muscular de la glucosa en los ratones tratados 4 semanas por ALF5755 (barra blanca) o placebo (barra negra).

Figura 2. A: Efecto del tratamiento ALF5755 frente a placebo sobre la masa magra (Fig. 2B y 2D) y la masa grasa (Fig. 2A y 2C), habiendo seguido los ratones un régimen HFD (2A, 2C) y control (2B, 2D). Fig. 2E-F: relación [masa grasa / masa magra] en los ratones que han seguido un régimen HFD (2E) o control (2F).

Figura 3. Efecto del tratamiento ALF5755 (barra blanca) frente a placebo (barra negra) sobre el perfil lipídico sérico en los ratones que han seguido un régimen HFD (3A) o control (3B). Fig.3C: resultado hepático sérico en los ratones que han seguido un régimen HFD.

60

Ejemplos

Materiales y métodos:

65 Modelos animales

Se han utilizado 2 modelos distintos de insulino-resistencia y de diabetes, el modelo ob/ y el modelo High Fat Diet (HFD).

El modelo ob/ob es un modelo genético de la diabetes de tipo II debido a una mutación no-sentido en el gen de la leptina que resulta de una ausencia de leptina en estos animales. Este ratón presenta un síndrome de insulino-resistencia con hiperinsulinemia, obesidad, hiperglucemia e hiperlipidemia (Pelleycounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science 1995; 269: 540-3). Los ratones ob/ob presentan una hiperglucemia (248 ± 14 mg/dl) así como una hiperinsulinemia mayor ($9,5 \pm 0,9$ ng/ml), como se describe clásicamente.

El modelo HDF es un modelo de diabetes de tipo II debido a un enriquecimiento en lípidos del régimen alimenticio. En un régimen clásico (control diet = CTD) la aportación calórica es de 3200 kcal/kg (un 21,4% de proteínas, un 5,1% de lípidos, un 47,1% de carbohidratos). Para el régimen HFD, la aportación calórica es de 4655 kcal/kg (un 17% de proteínas, un 27,5% de lípidos, un 37,5% de carbohidratos). El peso de los animales HDF aumenta gradualmente para volverse significativamente diferente del de los animales sometidos al régimen control a partir de 4 semanas. Después de 10 semanas de HDF, el peso medio de los animales es superior a aproximadamente un 30% del de los animales bajo régimen control. Los ratones HDF presentan un síndrome de insulino-resistencia con hiperinsulinemia, obesidad, hiperglucemia e hiperlipidemia (Migrenne S, Lacombe A, Lefèvre AL, Pruniaux MP, Guillot E, Galzin AM, Magnan C. Adiponectin is required to mediate rimonabant-induced improvement of insulin sensitivity but not body weight loss in diet-induced obese mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009 296(4):929-35.).

Diez semanas de régimen HDF provocan un aumento significativo de la glucemia basal ($220,6 \pm 3,7$ mg/dl; one-tailed t-test $P = 0,0001$, ****) y de la insulínemia basal ($0,51 \pm 0,06$ ng/ml; One-tailed t-test $P = 0,0069$, **) comparadas con el régimen control.

Los ratones sometidos a un régimen normal de control presentan una glucemia ($190,4 \pm 6,9$ mg/dl) y una insulínemia ($0,29 \pm 0,04$ ng/ml) basales y durante el ensayo OGTT que son normales, y que no se ven afectadas por la administración de ALF-5755 entre las semanas 10 y 14. Para todos los experimentos, los ratones se aclimataron en el animalario respetando un ciclo noche-día que comprende 12h de iluminación (7h-19h).

Tratamientos

Modelo Ob/Ob:

Se han repartido 29 animales en 3 grupos: 10 animales han recibido placebo (suero fisiológico), 9 animales han recibido una bomba que suministra $9 \mu\text{g/día}$ de ALF5755 y 10 animales han recibido $43 \mu\text{g/día}$ de ALF5755, durante 4 semanas. El suministro se hace por difusión a partir de una bomba Alzet (Alzet #2004) implantada subcutáneamente en el lomo del animal y que suministra un volumen constante de forma subcutánea con un caudal de $0,25 \mu\text{l/hora}$. El tratamiento pasa a la circulación sanguínea y permite obtener una concentración sérica media de ALF5755 (hipemia) nula para el grupo placebo, de $102,7 \pm 28,6$ ng/ml para el grupo que recibe $9 \mu\text{g/día}$ de ALF5755 y de $229,5 \pm 44,9$ ng/ml para el grupo que recibe $43 \mu\text{g/día}$ de ALF5755. Para los 3 animales del grupo ALF5755, $9 \mu\text{g/día}$ y 3 animales del grupo $43 \mu\text{g/día}$ el suministro de ALF5755 no se realizó y la hipemia fue nula al final del tratamiento. Estos animales se han excluido de los análisis. Fallecieron dos animales durante el experimento, un ratón del grupo control y un ratón del grupo ALF5755 $43 \mu\text{g/día}$. Los efectivos seleccionados para cada grupo son por lo tanto: placebo, $n = 9$; ALF5755 $9 \mu\text{g/día}$, $n = 6$; ALF5755 $43 \mu\text{g/día}$, $n = 6$.

Modelo HDF

Los animales bajo HDF y bajo régimen control se tratan por un placebo (suero fisiológico, $n = 5$ para el grupo CTD, $n = 9$ para el grupo HFD) o ALF5755 a $43 \mu\text{g/día}$ ($n = 5$ para el grupo CTD, $n = 9$ para el grupo HFD) durante 4 semanas. El suministro se hace a partir de una bomba Alzet (Alzet #2004) implantada subcutáneamente en el lomo del animal y que suministra un volumen en subcutáneo con el caudal de $0,25 \mu\text{l/hora}$. El tratamiento pasa a la circulación sanguínea y permite obtener una concentración sérica media de ALF5755 (hipemia) nula para el grupo placebo y de 309 ng/ml a D17 para los 2 grupos que reciben $43 \mu\text{g/día}$ de ALF5755. A D27 (último día de suministro por la bomba) las hipemias son $369,3$ ng/ml para los animales del grupo CTD y $334,8$ ng/ml para el grupo HFD, lo que confirma así el buen suministro de ALF5755 durante todo el tratamiento.

Modelo HDF para sensibilidad tisular (glucosa marcada con carbono 14)

Los animales bajo HDF y bajo régimen control se tratan mediante un placebo (suero fisiológico, $n = 4$ para el grupo CTD, $n = 6$ para el grupo HFD) o ALF5755 a $43 \mu\text{g/día}$ ($n = 4$ para el grupo CD, $n = 6$ para el grupo HFD) durante 4 semanas, según el mismo tratamiento que el descrito anteriormente. La concentración sérica media de ALF5755 (hipemia) es nula para el grupo placebo, de 673 ng/ml para los animales del grupo CTD y 784 ng/ml para el grupo HFD, lo que confirma el buen suministro de ALF5755 durante todo el tratamiento.

VARIABLES ESTUDIADAS

Peso

- 5 Los animales del experimento HDF se pesan cada semana durante la elaboración del modelo, después también durante las 4 semanas de tratamiento para validar el aumento de peso relacionado con el régimen y evaluar un eventual efecto de ALF5755 sobre esta variable.
- 10 Los animales ob/ob se pesan, por su parte, aproximadamente 1 vez por semana durante las 4 semanas de tratamiento.

Toma alimenticia para el experimento HDF

- 15 La toma alimenticia se mide por pesaje de la aportación y del resto 3 veces por semana. Se vuelve después a una toma diaria (en g/día).

Aportación calórica para el experimento HFD

- 20 El aporte calórico se calcula directamente a partir de la cantidad de comida ingerida, en g, y del valor energético por gramo de croqueta según el régimen.

Glucemia basal

- 25 Los animales se ponen en ayunas 18 horas antes de las diferentes mediciones. La glucemia basal se mide con la ayuda de un lector y de tiras reactivas para la medición de la glucemia en la sangre (lector Glucofix® mio y tiras Glucofix® sensor, A. Menarini diagnostics). Una gota de sangre es suficiente para esta medición, se obtiene por extracción de sangre de la punta de la cola. La glucemia basal se toma antes de la implantación de las bombas, después de aproximadamente 2 semanas de tratamiento y después al final de tratamiento.

- 30 Insulinemia basal
- Después de la medición de la glucemia basal, se efectúa una extracción de 75 µl de sangre máximo con la ayuda de capilares para hematocrito heparinados con sodio 3,75 UI/capilar (Hirschmann Laborgeräte) a fin de evaluar la insulinemia basal. Los tubos de sangre se centrifugan durante 3 minutos a 14000 rpm, después se extrae el sobrenadante y se almacena a -20°C para la evaluación de insulina por ELISA (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit, Crystal Chem Inc, #90080) según las recomendaciones de uso del fabricante.

Ensayo de tolerancia a la glucosa administrada por vía oral: OGTT

- 40 Después de 18 horas de ayuno, los animales se pesan, después se miden la glucemia y la insulinemia basales. Se administra después una solución de glucosa al 30% (CDM Lavoisier, frasco inyectable de 1l) por alimentación con sonda intra-gástrica a razón de 2 g/kg de ratón.

- 45 La glucemia se mide durante una cinética definida (entre 5 y 90 o 120 minutos después de la alimentación con sonda de la glucosa) de la misma manera que la glucemia basal.

- 50 Se recogen también 75 µl de sangre a 15 y 30 minutos a fin de evaluar la insulinemia con un procedimiento idéntico al utilizado para la evaluación de la insulinemia basal.

- Se efectúa un cálculo del índice HOMA-IR a partir de los valores de glucemia y de insulinemia a T0 previamente a la administración de glucosa, 15 minutos después y 30 minutos después. El índice HOMA-IR se calcula según la fórmula siguiente:

- 55 $[(\text{Insulinemia}_{(mU/l)} \times \text{Glucemia})/22,5]$ si la glucemia se expresa en unidad de molaridad (mmol/l) o $[(\text{Insulinemia}_{(mU/l)} \times \text{Glucemia})/405]$ si la glucemia se expresa en unidad de masa (mg/dl).

Ensayo de tolerancia a la insulina administrada de forma subcutánea: ITT

- 60 Se ponen los ratones ob/ob en ayunas durante 18 horas.
- Se inyecta por vía subcutánea una solución de insulina diluida con 0,15 UI/ml en un suero fisiológico, a partir de una solución madre de 100 UI/ml (Novorapid Flexpen 100 UI/ml, NovoNordisk A/S) a razón de 0,75 UI/kg de ratón.
- 65 La glucemia se mide durante una cinética definida (entre 5 y 120 minutos después de la inyección de insulina) de la misma manera que la descrita anteriormente.

Sensibilidad tisular a la glucosa

A fin de conocer el impacto de ALF5755 sobre la sensibilidad a la insulina de diferentes tejidos, se inyectan 8 μCi de 2-desoxiglucosa ^{14}C (2DG ^{14}C), por vía intraperitoneal. Se trata de un análogo de la glucosa que no está metabolizado (sufre sólo la etapa de fosforilación por la glucoquinasa) lo que le permite acumularse en los tejidos. Veinticinco μl de sangre se extraen a t_0 , y después cada 10 minutos durante 60 minutos mínimo, a fin de estimar el decrecimiento de 2DG en la sangre. Los ratones se sacrifican por inyección letal de pentobarbital y después los tejidos se extraen para recuento de la radioactividad de 2DG ^{14}C capturado.

Los tejidos se digieren en sosa a 60°C durante 16h, después se neutraliza la solución. Las muestras sufren varias etapas de cuantificación con el objetivo de conocer, por un lado, la cantidad de 2DG no fosforilado y, por otro lado, la cantidad total de 2DG. Por sustracción de estas dos variables (2DG total – 2DG no fosforilado) se calcula la cantidad de 2DG que ha penetrado efectivamente en el tejido.

Este valor, llevado al peso del tejido, se divide después por la integral de la actividad específica de ^{14}C en la sangre a lo largo del tiempo (en cpm/mg de glucosa) a fin de tener en cuenta la cantidad que circula en la sangre.

Este método permite poner en evidencia el efecto específico de la insulina sobre el transporte de glucosa en un órgano, reflejo de la sensibilidad a la insulina de este tejido.

IRM para la determinación de la masa grasa/masa magra:

El escaneo IRM consiste en pesar el ratón, después introducirlo en un tubo y mantener una compresión apretada con la ayuda de un empujador. El tubo se inserta en el escáner EchoMRI, previamente calibrado con un tubo control específico que contiene un volumen definido por el proveedor. En 3 minutos, se cuantifica la masa grasa, la masa magra, los líquidos biológicos y el agua libre del cuerpo.

Resultado hepático (ALAT, ASAT, Creatinina, Bilirrubina total):

Los resultados hepáticos séricos se realizan por ensayo de coloración fotométrica con la ayuda del autómata Olympus AU 400.

Resultado lipídico (Colesterol, Colesterol éster, Triglicéridos, Lípidos neutros):

Los resultados lipídicos sérico y hepático se realizan por cromatografía HPLC.

Resultados:

Efecto de la proteína HIP/PAP sobre la homeostasis glucídica:

La administración de HIP/PAP disminuye significativamente la glucemia basal (después de 18 horas de ayuno) en el ratón HDF (disminución del 15% aproximadamente al día 25 de tratamiento; $188,9 \pm 10,8$ en el ratón tratado frente a $222,4 \pm 8,5$ en el ratón placebo, $P < 0,001$, **; ANOVA bidireccional, efecto del tratamiento: $F_{(16,1)} = 12,76$, $P = 0,0025$, **) y en el ratón ob/ob, frente a ratones placebo (disminución del 28% aproximadamente en el día 25 de tratamiento; $228,2 \pm 14,7$ en el ratón tratado, frente a $316,3 \pm 32,2$ en el ratón placebo, $P < 0,05$, *).

Asimismo, el tratamiento con la proteína HIP/PAP permite también reducir la hiperglucemia durante el ensayo OGTT, de manera significativa para el modelo ob/ob a partir de las 2 semanas (ANOVA bidireccional, efecto del tratamiento: $F_{(133,1)}=13,09$, $P = 0,0018$, **) y mantenida a 4 semanas (ANOVA bidireccional, efecto del tratamiento: $F_{(133,1)}=5,78$, $P = 0,027$, *). Para los ratones sometidos al régimen HFD y tratados con HIP/PAP, se observa una tendencia a la mejora, que lleva la curva de hiperglucemia a un nivel comparable con el observado en los ratones que han seguido el régimen control.

El tratamiento con la proteína HIP/PAP permite también reducir la hiperglucemia durante el ensayo ITT, de manera significativa para el modelo ob/ob a 2 semanas (ANOVA bidireccional, efecto del tratamiento: $F_{(133,1)}=4,71$, $P = 0,043$, *, véase la figura 1A) con una tendencia mantenida a 4 semanas, lo que se traduce en una mejora significativa y específica de la sensibilidad a la insulina. En efecto, el ensayo ITT consiste en hacer disminuir la glucemia inyectando insulina exógena. Para una misma dosis de insulina, cuanto más baja sea la glucemia en respuesta, más elevada será la sensibilidad a la insulina (y por oposición, más baja será la resistencia a la insulina). Como se ilustra en la figura 1A, la inyección de insulina no disminuye casi nada la glucemia (al menos durante los 30 primeros minutos) en los ratones ob/ob que han recibido el tratamiento placebo. Tal efecto se traduce en una resistencia mayor a la insulina. A la inversa, en los ratones ob/ob tratados con ALF5755, la inyección de insulina provoca una bajada importante de la glucemia, traduciéndose así en una disminución importante de la resistencia a la insulina (por ejemplo: una mejora de la sensibilidad a la insulina).

Efecto de la proteína HIP/PAP sobre la insulinemia y el índice HOMA-IR después de 1 mes de tratamiento:

Se observa una disminución de la hiper-insulinemia durante el ensayo OGTT en los ratones HDF tratados por ALF-5755 con respecto a los ratones que han recibido el tratamiento placebo (disminución del pico de hiper-insulinemia a 15 minutos: 3,75 veces el índice basal en el ratón tratado, frente a 7,61 veces en el ratón placebo, $P < 0,0001$, ****, y a 30 minutos: 2,31 veces el índice basal en el ratón tratado, frente a 3,7 veces en el ratón placebo, $P < 0,05$, *); estas modificaciones se acompañan de una normalización del índice HOMA-IR en el modelo HFD: ANOVA bidireccional, efecto de tratamiento: $F_{(32,1)}=16,77$, $P = 0,0003$, ***, véase la figura 1B-C;

En el ratón ob/ob se observa también una mejora de la hiper-insulinemia durante el OGTT: ANOVA bidireccional, efecto del tratamiento: $F_{(34,1)}=5,84$, $P = 0,027$, *. Estas modificaciones se acompañan de una tendencia a la normalización del índice HOMA-IR: disminución no estadísticamente significativa del índice a 15 y 30 minutos.

El conjunto de estos datos confirma que la normalización de la glucemia basal y del recorrido glucémico durante el ensayo OGTT por el tratamiento por ALF5755 resulta de la reducción de la insulino-resistencia y no de un efecto insulino-secretagogo.

Efecto de la proteína HIP/PAP sobre la insulino-resistencia tisular:

La modulación de la captación de glucosa por los diferentes tejidos insulino-sensibles (hígado, músculos y tejidos adiposos) después del tratamiento por ALF-5755 se ha medido en el modelo HFD por captación de 2DG marcado con carbono 14. La figura 1D ilustra que el tratamiento con ALF5755 provoca un aumento de la captación de glucosa por el músculo (músculo tibialis; $21,7\mu\text{M} \pm 6,3$ frente a $51,9\mu\text{M} \pm 12,8$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,04$, *). No se ha observado ningún aumento en el hígado o en el tejido adiposo.

Efecto de la proteína HIP/PAP sobre los porcentajes de masa grasa y masa magra:

Las 14 semanas de régimen HFD inducen a un aumento importante del porcentaje de masa grasa (Figuras 2A y C: un 32% frente a un 15% en el régimen control para los grupos placebo). El tratamiento con ALF-5755 disminuye de manera significativa el aumento de masa grasa observada en los animales sometidos a HFD (Figura 2A: un $32,1\% \pm 1,7\%$ frente a un $26,7\% \pm 2,0\%$; Prueba de Mann-Whitney de una cola: $P = 0,039$, *). Se observa una tendencia comparable para los ratones sometidos al régimen control. De manera similar, se observa una disminución de la masa magra en el grupo de animales bajo HFD con respecto al régimen control (Figuras 2B y D: un 49,8% frente a un 61,2% en el régimen control para los grupos placebo). El tratamiento con ALF-5755 aumenta de manera significativa el porcentaje de masa magra observada en los animales sometidos a CTD (Figura 2D: un $61,2\% \pm 0,4\%$ frente a un $63,5\% \pm 0,6\%$; Prueba de Mann-Whitney de una cola: $P = 0,008$, **). Se observa una tendencia comparable para los ratones sometidos al régimen HFD. El análisis de la relación masa grasa/masa magra muestra que el tratamiento con ALF-5755 provoca una disminución significativa de al menos un 20% (21%) de esta proporción en los ratones que han seguido el régimen HFD (Prueba de Mann-Whitney de una cola, $P = 0,047$) así como una tendencia a la disminución de al menos un 10% (10,1%) en los ratones sometidos al régimen control, frente a ratones que han recibido un tratamiento placebo.

Efecto de la proteína HIP/PAP sobre los perfiles lipídicos séricos y hepáticos:

En los grupos de animales HFD (véase la figura 3A) se observa que ALF-5755 provoca una disminución estadísticamente significativa del nivel de colesterol ($913,0\mu\text{M} \pm 28,2$ frente a $647,1\mu\text{M} \pm 32,9$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P < 0,0001$, ****), del nivel de colesterol ésteres ($1760,6\mu\text{M} \pm 65,8$ frente a $1390,3\mu\text{M} \pm 96,7$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,011$, *), del nivel de lípidos neutros total ($2834,9\mu\text{M} \pm 95,9$ frente a $2168,6\mu\text{M} \pm 118,5$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,0005$, ***) y una tendencia a la disminución del nivel de triglicéridos ($161,3\mu\text{M} \pm 15,0$ frente a $131,2\mu\text{M} \pm 24,1$).

Se observan unos efectos comparables y estadísticamente significativos con el tratamiento por ALF-5755 en el régimen control (figura 3B) para el colesterol ($526,6\mu\text{M} \pm 35,9$ frente a $376,9\mu\text{M} \pm 43,9$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,032$, *), y para los triglicéridos ($323,2\mu\text{M} \pm 72,6$ frente a $143,0\mu\text{M} \pm 31,5$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,016$, *).

En el modelo ob/ob (figura 3C) ALF-5755 disminuye el colesterol ($763,0\mu\text{M} \pm 58,5$ frente a $532,5\mu\text{M} \pm 29,0$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,002$, **), y se observa una tendencia a la disminución del nivel de triglicéridos ($651,7\mu\text{M} \pm 168,6$ frente a $271,8\mu\text{M} \pm 44,6$).

Se observa también una tendencia a la disminución de los ASAT y una disminución estadísticamente significativa de los ALAT en los ratones HFD tratados por ALF-5755 ($132,7\mu\text{M} \pm 19,3$ frente a $77,2\mu\text{M} \pm 12,7$; prueba de Mann-Whitney de dos colas, $P = 0,032$, *, véase la figura 3C). Además, se observan unas tendencias comparables en el régimen control y en el modelo de ratón ob/ob.

Listado de secuencias

<110> ALFACT INNOVATION

5 <120> Composición que comprende la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados para el tratamiento de la resistencia a la insulina

<130> Y543 FR Alfact Innovation

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

10

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Glu Glu Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro Lys
1 5 10 15

Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro
20 25 30

Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly
35 40 45

Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser
50 55 60

Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu
65 70 75 80

His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu Trp
85 90 95

Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro Ser
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala
115 120 125

Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val
130 135 140

Cys Lys Phe Thr Asp
145

<210> 2

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

20

ES 2 755 177 T3

Ile Arg Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln
20 25 30

Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly
35 40 45

Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr
50 55 60

Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
65 70 75 80

Glu Gly Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp
85 90 95

Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu
100 105 110

Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val
115 120 125

Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp
130 135

<210> 3

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Glu Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro
1 5 10 15

Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser
35 40 45

Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser
50 55 60

ES 2 755 177 T3

Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly
65 70 75 80

Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu
85 90 95

Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro
100 105 110

Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr
115 120 125

Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr
130 135 140

Val Cys Lys Phe Thr Asp
145 150

<210> 4

<211> 175

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu Pro Gln Arg Glu
20 25 30

Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly
35 40 45

Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala
50 55 60

Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly
85 90 95

Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly
100 105 110

Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met
115 120 125

Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly
130 135 140

His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp
165 170 175

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización para el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina en sujetos no insulino-requirientes,
 5 caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.
- 10 2. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que los sujetos presentan un valor HOMA B, superior o igual al 60% y/o un índice HOMA-IR inferior a 6.
- 15 3. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que los sujetos presentan una glucemia en ayunas inferior a 125 mg/dl, y más particularmente inferior a 110 mg/dl en ayunas.
- 20 4. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que los sujetos presentan una glucemia, 2 h después de un ensayo de tolerancia oral a la glucosa, inferior a 200 mg/dl, y más particularmente inferior a 140 mg/dl.
- 25 5. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que los sujetos tienen una tolerancia glucídica normal.
- 30 6. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que los sujetos son normo-glucémicos en ayunas.
- 35 7. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que los sujetos presentan al menos uno de los trastornos seleccionados entre el grupo constituido por: el sobrepeso visceral, la obesidad, la hiperandrogenia, un trastorno de la alimentación, la sarcopenia, el hipercatabolismo, la desnutrición.
- 40 8. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de la insulino-resistencia asociada al envejecimiento.
- 45 9. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para aumentar el desarrollo muscular, estimular la toma de masa magra y prevenir o limitar el catabolismo muscular y la desnutrición proteica,
 50 caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.
- 55 10. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para prevenir o tratar la dislipidemia y en particular la hipercolesterolemia
 60 caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.
- 60 11. Proteína HIP/PAP, o uno de sus derivados, para su utilización en sujetos no insulino-requirientes, para prevenir o tratar la aterosclerosis y en particular la enfermedad coronaria y la arteriopatía de los miembros inferiores,
 65 caracterizada por que dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con el polipéptido constituido de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias SEQ ID nº 1 a 4.
- 60 12. Composición que comprende una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP o uno de sus derivados, tales como se han definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en mezcla con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, para su utilización para tratar o prevenir la insulino-resistencia en el sujeto no insulino-requiriente.

Figura 1

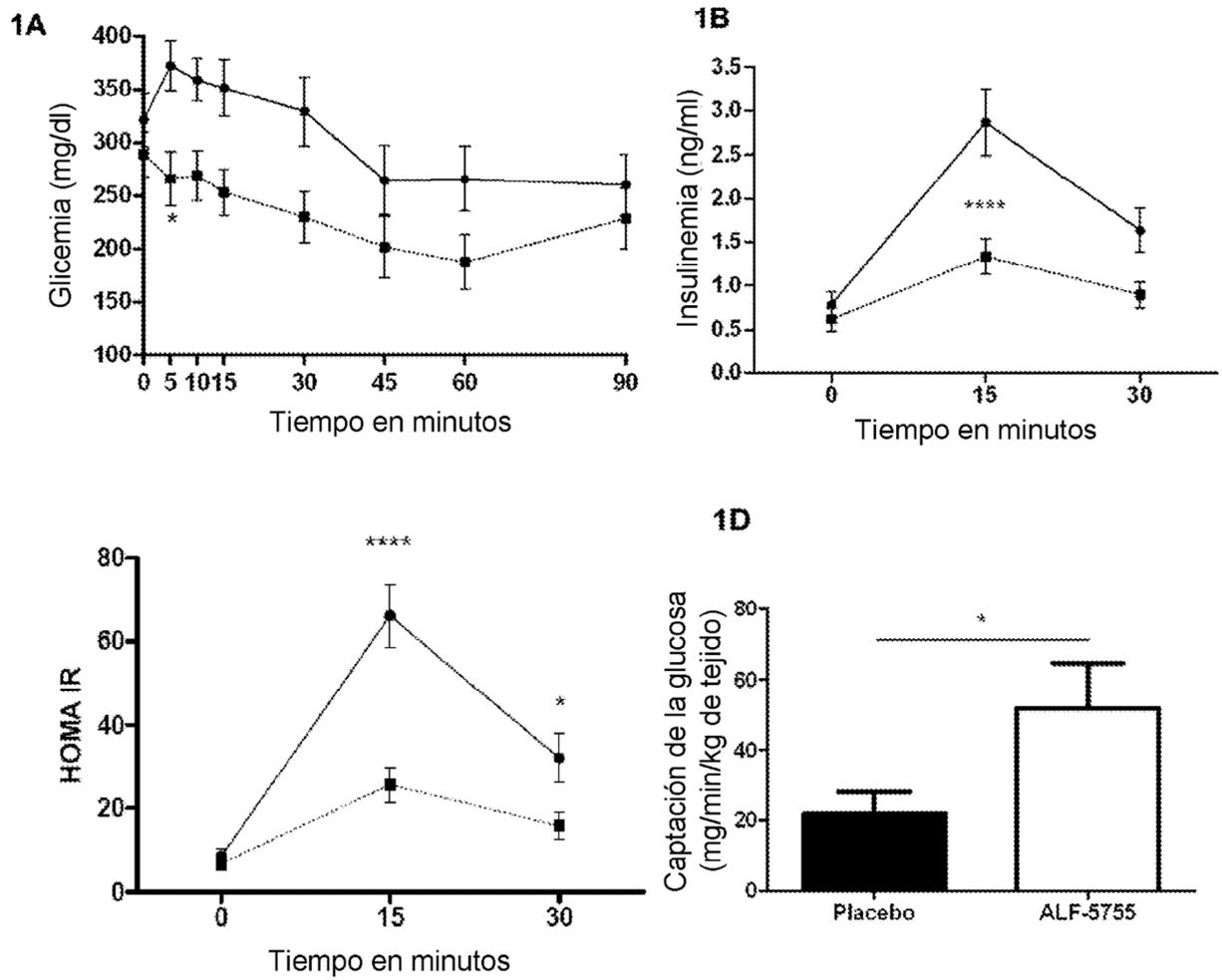


Figura 2

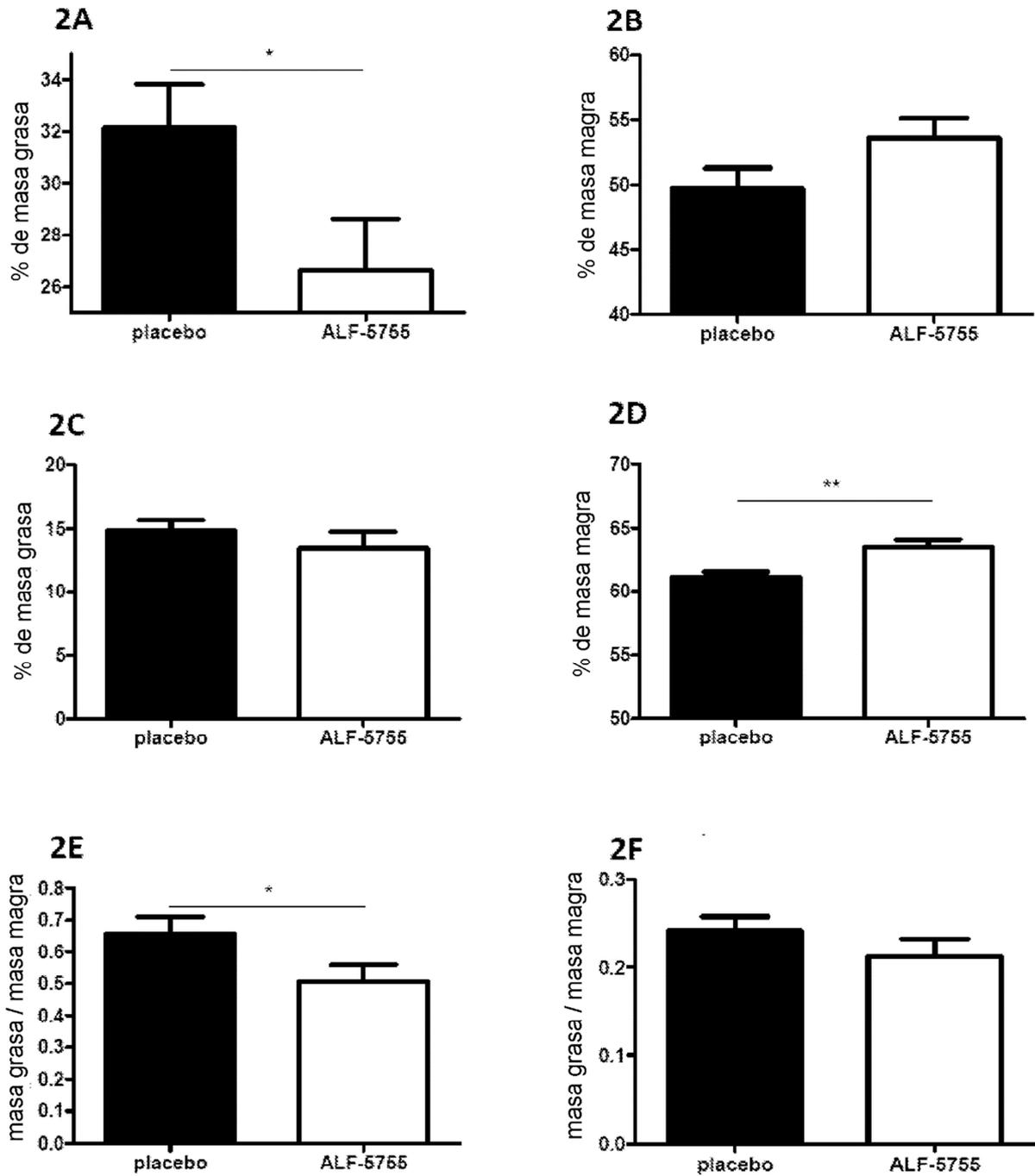


Figura 3

