



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 751 391**

⑮ Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014** **PCT/US2014/031171**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14153385**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014** **E 14768873 (3)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2976094**

④ Título: **Procedimientos de tratamiento de trastornos metabólicos**

⑩ Prioridad:

21.03.2013 US 201361804046 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.03.2020

⑦ Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
Office of Technology Transfer, 1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US

⑦ Inventor/es:

**LIN, JIANDIE y
WANG, GUOXIAO**

⑦ Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 391 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

Procedimientos de tratamiento de trastornos metabólicos

Campo de la invención

La invención se refiere a procedimientos para tratar afecciones caracterizadas por deficiencia de Neuregulina 4 (Nrg4), tales como trastornos metabólicos.

Antecedentes

El síndrome metabólico se ha convertido en una epidemia global que aumenta dramáticamente el riesgo de diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). La producción elevada de glucosa hepática y la secreción de lipoproteínas contribuyen a la patogenia de la hiperglucemia e hiperlipidemia en la resistencia a la insulina. La obesidad también se asocia con un exceso de acumulación de grasa en el hígado, una característica definitoria de la NAFLD que afecta tanto a adultos como a niños. Si bien la esteatosis hepática a menudo existe como una afección benigna sin efectos adversos aparentes en la función hepática, se observan lesión hepática progresiva, inflamación y fibrosis en el 20-30 % de los pacientes con NAFLD con esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NASH está emergiendo como un importante factor de riesgo para enfermedades hepáticas en etapa terminal. Las redes reguladoras que controlan la glucosa hepática y el metabolismo de los lípidos han sido el foco de la investigación en las últimas dos décadas. Estos estudios proporcionan información crítica sobre los mecanismos moleculares y fisiológicos que contribuyen a la homeostasis de la glucosa y los lípidos. Sin embargo, las señales hormonales que median la interacción entre diferentes tejidos, particularmente entre los tejidos adiposos y el hígado, permanecen mal definidos.

Las neuregulinas (NRG) son una familia de factores de crecimiento que contiene un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) conservado. Hasta la fecha, se han identificado cuatro genes de neuregulina (Nrg1-4) en mamíferos que generan una amplia gama de ligandos de señalización a través de un corte y empalme alternativo extenso. Los NRG se sintetizan típicamente como proteínas transmembrana que sufren escisión proteolítica para liberar los fragmentos extracelulares que contienen el dominio de tipo EGF. Los estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que los NRG emiten señales a través de la familia ErbB de receptores de tirosina quinasa y ejercen sus efectos biológicos en forma paracrina, autocrina y endocrina. El Nrg1 se ha caracterizado ampliamente en el desarrollo del sistema neuromuscular, particularmente la sinapsis neuromuscular y el nervio periférico. Además, el Nrg1 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cardíaca y el desarrollo del sistema nervioso central. Los polimorfismos genéticos de Nrg1 y Nrg3 se han asociado con el riesgo de esquizofrenia y enfermedad de Hirschsprung, respectivamente. Los NRG provocan una respuesta biológica sorprendentemente específica en las células diana. El Nrg4 se descubrió en función de su homología de secuencia con otros miembros NRG y se predijo que codificaría una proteína precursora de 115 aminoácidos. Los receptores celulares relevantes que median los efectos biológicos de Nrg4, particularmente en el metabolismo de la glucosa y los lípidos y la NAFLD, no se han establecido.

Las observaciones anteriores proporcionan evidencia de la continua necesidad de composiciones y formulaciones útiles en el tratamiento de enfermedades como la diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Los documentos US 2004/121326 A2 y WO 2010/138387 A2 desvelan la neuregulina-4 (Nrg-4) para su uso en el tratamiento de ciertas enfermedades y trastornos.

Sumario

Se ha identificado que la Nrg4 es un factor derivado de adipocitos que tiene como diana los hepatocitos en el hígado. La expresión de Nrg4 disminuyó notablemente en los tejidos adiposos en modelos de obesidad en ratones. Usando ratones defectivos para Nrg4, se determinó que la deficiencia de Nrg4 exacerba la hiperglucemia inducida por la dieta, la hiperlipidemia y la esteatosis hepática. Por el contrario, la expresión transgénica específica de grasa de Nrg4 mejoró significativamente estos parámetros metabólicos después de la alimentación con una dieta con alto contenido de grasa. Conjuntamente, estos estudios identificaron a Nrg4 como un nuevo objetivo para el desarrollo de productos biológicos terapéuticos para los tratamientos de la diabetes tipo 2, la hiperlipidemia y la NAFLD.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona una proteína Nrg4 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y cirrosis.

En algunas realizaciones, la proteína Nrg4, la variante de Nrg4 o un fragmento biológicamente activo de la misma se administran conjuntamente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente hipolipemiante. El agente hipolipemiante se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, ezetimiba, niacina, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo y fenofibrato.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es NAFLD. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es esteatohepatitis. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es cirrosis.

En algunas realizaciones, la variante de Nrg4 comprende al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de longitud completa expuesta en la SEQ ID NO:1.

5 En algunas realizaciones, el fragmento biológicamente activo comprende los restos 1-52 o 1-62 de la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, la proteína Nrg4 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar un trastorno metabólico o la susceptibilidad a un trastorno metabólico, en el que el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y cirrosis en un sujeto que comprende la etapa de determinar un nivel 10 de una proteína neuregulina 4 (Nrg4), que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o una variante de Nrg4 que comprende al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en una muestra del sujeto, en el que el nivel 15 que se reduce en el sujeto en comparación con el nivel en un sujeto normal sugiere el trastorno metabólico o indica susceptibilidad al trastorno metabólico, y en el que se sabe que el sujeto normal no sufre el trastorno metabólico.

En otro aspecto más, se proporciona un procedimiento para determinar la progresión de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y trastorno metabólico de cirrosis en un sujeto, que comprende la etapa de determinar el nivel de una proteína neuregulina 4 (Nrg4) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 20 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en muestras del sujeto en el tiempo, en el que una disminución en el nivel de la proteína Nrg4, variante, o el fragmento biológicamente activo de la misma a lo largo del tiempo, sugiere una progresión del trastorno metabólico.

25 En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es NAFLD.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es esteatohepatitis.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es cirrosis.

En otro aspecto más, se proporciona un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y trastorno metabólico por cirrosis en un sujeto, que comprende la etapa de determinar un nivel 30 de una proteína neuregulina 4 (Nrg4) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en muestras del sujeto en el tiempo, en el que un aumento 35 en el nivel de la proteína Nrg4, variante, o el fragmento biológico activo de la misma a lo largo del tiempo sugiere un tratamiento efectivo.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es NAFLD.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es esteatohepatitis.

En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es cirrosis.

40 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Alineación de las secuencias proteicas de Nrg4 humanas y de ratón. El dominio de tipo EGF se caracteriza por la presencia de tres puentes disulfuro conservados (barras que unen los restos de Cys). Se indican el sitio de glucosilación ligado a N (N³⁹YT), los sitios de escisión proteolítica (flechas) y el dominio transmembrana (TM) predicho. Cabe destacar que el dominio de tipo EGF (aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 52) de Nrg4 humana y de ratón está altamente conservado.

Figura 2: Expresión de Nrg4 en tejidos adiposos y en adipocitos cultivados. (A) Análisis PCR cuantitativa Taqman de ARNm de Nrg4 en diferentes tejidos. Nrg4 se expresa abundantemente en tejido adiposo marrón (BAT) y en tejido adiposo blanco (WAT). Se analizaron muestras de ARN agrupadas de tres ratones C57BL/6J macho. (B) La expresión de ARNm de Nrg4 se induce durante la diferenciación de los adipocitos marrones (arriba) y blancos (3T3-L1, abajo). UCP1 y PPAR γ se incluyeron como marcadores de diferenciación. Se muestran las medias \pm desviación estándar de los pocos por triplicado de un estudio representativo.

Figura 3: Los ratones con deficiencia de Nrg4 son tolerantes al frío y tienen una termogénesis inducida por el frío normal. (A) Temperatura rectal de ratones de tipo salvaje y defectivos en Nrg4 después de la exposición al frío.

5 Los ratones se transfirieron desde la temperatura ambiente a 4 °C durante un total de 4 horas con libre acceso a alimentos y agua. (B) Histología (H&E) de tejido adiposo marrón interescapular (barra de escala = 100 µm). (C) Análisis de qPCR de la expresión del gen BAT en ratones expuestos a temperatura ambiente (TA, SV = 5, DEF = 6) o temperatura fría (Frío, SV = 5, DEF = 7). (D) Concentraciones plasmáticas de triglicéridos(TG), cetona (β -hidroxibutirato) ácidos grasos no esterificados (NEFA) en ratones SV y defectivos en Nrg4 después de la exposición al frío.

10 Figura 4: El dominio de tipo EGF de Nrg4 se une a los hepatocitos. (A) Diagrama esquemático del control de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o la proteína de fusión SEAP-Nrg4 (aminoácidos 1-62). (B) SEAP-Nrg4^{N62} se une específicamente a los hepatocitos, pero no las células en el BAT, corazón, músculo y bazo. (C) El exceso de 15 proteína de fusión GST-Nrg4^{N62} compite por los sitios de unión a Nrg4 presentes en los hepatocitos. Las secciones de hígado se incubaron con SEAP-Nrg4^{N62} en presencia de proteínas recombinantes GST o GST-Nrg4 de 3,0 µg/ml.

20 Figura 5: Regulación de la expresión de Nrg4 adiposo por obesidad. (A) Análisis qPCR de los niveles de ARNm de Nrg4 en WAT y BAT de ratones delgados o con obesidad inducida por la dieta. Los ratones C57BL/6J macho de tipo salvaje se mantuvieron con alimentación estándar (n = 5) o dieta rica en grasas (n = 6) durante 3 meses. El ARN total se aisló de los tejidos adiposos para el análisis de qPCR. (B) Análisis qPCR de los niveles de ARNm de Nrg4 en tejidos adiposos de ratones WT (n = 5) o deficientes en receptores de leptina db/db (n = 6). Los datos en A-B son las medias \pm SEM. *p <0,05. (C) Análisis qPCR de los niveles de ARNm de Nrg4 en la fracción vascular del estroma (SVF) y la fracción de adipocitos aislada de WAT epididimario de ratones alimentados con comida estándar (n = 3) o dieta rica en grasas (n = 3). * p <0,01 pienso frente a HFD. (D) Expresión de Nrg4 en adipocitos 3T3-L1 maduros tratados con vehículo (-) o TNF α (10 ng/ml) durante el tiempo indicado. Se muestran las medias \pm desviación estándar de los pocillos por triplicado de un estudio representativo. *p <0,01 TNF α frente a vehículo.

25 Figura 6: Correlación entre los niveles de expresión de Nrg4 y los parámetros metabólicos. Un grupo de 54 ratones C57BL/6J macho de tipo salvaje fueron alimentados con una dieta rica en grasas durante dos meses. Se midió la expresión relativa de ARNm de Nrg4 en WAT epididimario y los parámetros metabólicos. (A-B) La expresión de ARNm de Nrg4 se correlaciona inversamente con el peso corporal (A) y el peso de la grasa blanca epididimaria (B). (C) Los niveles de expresión altos de Nrg4 (recuadro inferior) y bajos de Nrg4 (recuadro superior) están asociados con niveles de glucosa en sangre bajos y altos, respectivamente. (D) Los niveles de expresión de Nrg4 altos(recuadro inferior) y bajos de Nrg4 (recuadro superior) están asociados con un contenido de grasa hepática 30 bajo y alto, respectivamente.

35 Figura 7: La deficiencia de Nrg4 exacerbaba la resistencia a la insulina inducida por la dieta y la hiperlipidemia. (A) Peso corporal de ratones de tipo salvaje (lleno, n = 8) y defectivos en Nrg4 (gris, n = 9) alimentados con pienso o una dieta rica en grasas (HFD). Los niveles plasmáticos de leptina se midieron 8 semanas después de la alimentación con HFD. (B) Niveles de glucosa e insulina en plasma medidos en condiciones de alimentación y ayuno. (C) Concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol total y β -hidroxibutirato. Los datos representan la media \pm SEM. *p <0,05.

40 Figura 8: La deficiencia de Nrg4 exacerbaba la esteatosis hepática inducida por la dieta. (A) Contenido de triglicéridos hepáticos en ratones de tipo salvaje (lleno, n = 9) y defectivos en Nrg4 (gris, n = 8) alimentados con HFD durante 7 semanas. Los datos representan la media \pm SEM. *p <0,05. (B) Tinción con H&E de WAT epididimario y secciones de hígado de ratones WT y defectivos en Nrg4 7 semanas después de HFD. Barras de escala = 100 µm.

45 Figura 9: La expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos protege a los ratones de los trastornos metabólicos inducidos por la dieta. (A) Los ratones transgénicos Nrg4 (TG) específicos de grasa están protegidos de la obesidad inducida por la dieta. (B) Concentraciones de leptina en plasma en ratones WT (n = 10) y TG (n = 9) después de 8 semanas de alimentación rica en grasas. (C) Concentraciones plasmáticas de glucosa (con alimentación y en ayunas), colesterol total (con alimentación) y β -hidroxibutirato (en ayunas) en ratones WT y TG. Los datos en A-C representan la media \pm SEM. *p <0,05.

50 Figura 10: Los ratones transgénicos Nrg4 son más tolerantes a la glucosa, sensibles a la insulina y protegidos del hígado graso inducido por la dieta. (A) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones WT y TG después de 10 semanas de alimentación rica en grasas. (B) Prueba de tolerancia a la insulina en ratones WT y TG después de 12 semanas de alimentación rica en grasas. Los datos en A-B representan la media \pm SEM (n = 8-10). *p <0,05. (C) Contenido de triglicéridos hepáticos en ratones WT (gris, n = 9) y TG (lleno, n = 9) alimentados con HFD durante 11 semanas. Los datos representan la media \pm SEM. *p <0,05. (D) Tinción H&E de WAT epididimario y secciones de hígado.

55 Figura 11: Análisis qPCR de la expresión de genes hepáticos en ratones WT y TG después de 11 semanas de alimentación con HFD. Los datos representan la media \pm SEM. *p <0,05.

Figura 12: La Nrg4 recombinante reduce la glucosa en sangre en ratones con obesidad inducida por la dieta por la dieta. Se injectó a los ratones obesos alimentados con HFD por vía intraperitoneal GST o GST-Nrg4^{N62} dos veces (4 µg por gramo de peso corporal) durante un total de 6 horas. Cabe destacar que Nrg4 reduce los niveles de

glucosa en sangre no a través de la promoción de la secreción de insulina.

Figura 13: Modelo que representa Nrg4 como un potencial biológico terapéutico para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Nrg4 es una hormona derivada de adipocitos que actúa sobre el hígado disminuyendo la glucosa y los lípidos en la sangre y reduciendo el contenido de grasa hepática.

Figura 14: Mapeo de aminoácidos importantes para la liberación del fragmento extracelular de Nrg4. Los vectores de fusión SEAP-Nrg4 se construyeron entre el ADNc de SEAP y el Nrg4 de longitud completa, a.a.1-115 y se transfectaron transitoriamente en células HEK293. Las posiciones de los mutantes de alanina se indican encima de las inmunotransferencias. Los medios acondicionados y los lisados celulares totales se cosecharon y analizaron por inmunotransferencia con anticuerpo anti-SEAP. Cabe destacar que las mutaciones de los aminoácidos 53-54 o 53 redujeron notablemente la secreción de proteínas de fusión en los medios.

Figura 15: Expresión reducida de Nrg4 en tejidos adiposos marrones y blancos en modelos de obesidad en ratones. (A) Análisis qPCR de la expresión de ARNm de Nrg4 en grasa blanca epididimaria (eWAT) y BAT de ratones delgados (barras abiertas) u obesos (barras negras). Para DIO, los ratones WT macho fueron alimentados con comida estándar ($n = 5$) o HFD ($n = 6$) durante tres meses. Para la obesidad genética, se analizaron un grupo de WT ($n = 3$) y ob/ob ($n = 4$) y un grupo separado de ratones WT ($n = 5$) y db/db ($n = 6$). (B) Análisis qPCR de la expresión de ARNm de Nrg4 en la fracción vascular estromal (SVF) y la fracción de adipocitos (Ad) aislada de eWAT de ratones delgados ($n = 3$) o DIO ($n = 3$). Los datos en a-b representan la media \pm s.e.m. * $p < 0,05$. (C) Análisis qPCR de la expresión de ARNm de Nrg4 en adipocitos marrones o 3T3-L1 diferenciados después de tratamientos con vehículo (Veh), TNF α (10 ng/ml) o IL1 β (40 ng/ml) durante 6 h. Los datos representan la media \pm s.d. de un estudio representativo realizado por triplicado. * $p < 0,05$ frente al vehículo

Figura 16: La deficiencia de Nrg4 exacerbaba la obesidad inducida por la dieta y eleva los niveles de triglicéridos en plasma. (A) Peso corporal, adiposidad y porcentaje de masa corporal magra en ratones de tipo salvaje (lleno, $n = 8$) y defectivos en Nrg4 (gris, $n = 9$) alimentados con pienso normal o HFD. (B) Niveles de TAG en plasma en ratones WT y defectivos en Nrg4 en condiciones de alimentación y ayuno. (C) Concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Figura 17: La deficiencia de Nrg4 exacerbaba la esteatosis hepática inducida por la dieta. (A) Contenido de triglicéridos hepáticos en ratones de tipo salvaje (lleno, $n = 9$) y defectivos en Nrg4 (gris, $n = 8$) alimentados con HFD durante 7 semanas. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$. (B) Tinción H&E de BAT, secciones de hígado y WAT epididimario de ratones WT y defectivos en Nrg4 7 semanas después de HFD. Barras de escala = 100 μ m.

Figura 18: Los ratones nulos para Nrg4 desarrollaron intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina inducidas por la dieta rica en grasas más severas. (A) Niveles de glucosa en sangre con alimentación y en ayunas y niveles de insulina en plasma en ayunas en ratones WT y DEF alimentados con HFD. (B) Prueba de tolerancia a la glucosa en WT ($n = 7$, rombo relleno, línea negra) y defectivos en Nrg4 ($n = 7$, cuadrados abiertos, línea roja) después de 13 semanas con HFD. (C) Prueba de tolerancia a la insulina en ratones WT ($n = 7$) y defectivos en Nrg4 ($n = 9$) después de 15 semanas con HFD. Los datos representan la media \pm s.e.m. * $p < 0,05$, DEF frente a WT.

Figura 19: La deficiencia de Nrg4 promueve la activación aberrante del programa de genes hepáticos lipogénicos. (A) Análisis qPCR de la expresión de genes hepáticos en ratones *ad lib* WT y defectivos en Nrg4. Los datos representan la media \pm s.e.m. * $p < 0,05$, DEF frente a WT. (B) Se disecaron tejidos hepáticos de ratones WT y defectivos en Nrg4 alimentados con HFD y se procesaron para análisis qPCR e inmunotransferencia. Inmunotransferencias de lisados hepáticos totales usando los anticuerpos indicados (arriba); pSREBP1 denota la proteína precursora SREBP1. Inmunotransferencias de SREBP1 nuclear (nSREBP1) usando extractos nucleares de hígado (abajo). Se incluyó inmunotransferencia de lamina A/C como control de carga.

Figura 20: Nrg4 atenúa la inducción de la expresión del gen lipogénico por activación de LXR en hepatocitos primarios. Análisis qPCR de la expresión génica en hepatocitos primarios tratados con vehículo o T0901317 en presencia de medios acondicionados que contienen SEAP o SEAP-Nrg4N62. Los datos representan la media \pm s.d. * $p < 0,05$.

Figura 21: La expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos protege a los ratones de la obesidad inducida por la dieta. (A) Curva de crecimiento de ratones WT (barras sólidas, $n = 10$) y aP2-Nrg4 transgénico (Tg, barras abiertas, $n = 9$) antes y después de 12 semanas de alimentación con HFD. (B) Composición corporal. (C) Ingesta de alimentos y VO₂ en ratones WT y aP2-Nrg4 Tg después de 6 semanas de alimentación con HFD. Los valores de VO₂ se normalizaron con respecto al peso corporal (panel central) y la masa corporal magra (panel derecho).

Figura 22: Los ratones transgénicos Nrg4 están protegidos de los trastornos metabólicos inducidos por HFD. (A) Concentraciones de metabolitos en plasma en ratones WT (barras abiertas, $n = 9$) y Tg (barras sólidas, $n = 8$) después de 10 semanas de alimentación rica en grasas. (B) Glucosa en sangre con alimentación y en ayunas y niveles de insulina en plasma en ayunas en ratones WT alimentados con HFD (barras abiertas, $n = 9$) y Tg (barras sólidas, $n = 8$). Los datos representan la media \pm s.e.m. * $p < 0,05$, WT frente a Tg.

Figura 23: Los ratones transgénicos Nrg4 están protegidos de la intolerancia a la glucosa inducida por HFD y la resistencia a la insulina. (A) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones WT alimentados con HFD (abiertos, n = 9) y Tg (sólidos, n = 8). (B) Prueba de tolerancia a la insulina en ratones WT alimentados con HFD (abiertos, n = 9) y Tg (sólidos, n = 8). Los datos representan la media ± s.e.m. *p<0,05, WT frente a Tg.

Figura 24: Los ratones transgénicos Nrg4 están protegidos del hígado graso inducido por HFD a través de la atenuación de la lipogénesis hepática. (A) Tinción H&E de tejidos adiposos y secciones de hígado en ratones alimentados con HFD. Barras de escala = 100 µm. (B) Contenido de TAG en el hígado. (C) Immunotransferencias utilizando lisados hepáticos totales (arriba) y extractos nucleares de hígado (abajo). Cabe destacar que los niveles de precursor y SREBP1 nuclear se redujeron en el hígado de los ratones Tg. (D) Análisis qPCR de la expresión de genes hepáticos en ratones WT *ad lib* (abiertos) y Tg (sólidos). Los datos representan la media ± s.e.m. *p<0,05, WT frente a Tg.

Figura 25: Nrg4 recombinante reduce la glucosa en sangre y la insulina en ratones con obesidad inducida por la dieta por la dieta. Se inyectó a los ratones obesos alimentados con HFD por vía intraperitoneal GST o GST-N62 dos veces (4 µg por gramo de peso corporal) por día durante un total de 5 días. Cabe destacar que Nrg4 reduce los niveles de glucosa en sangre no a través de la promoción de la secreción de insulina.

Descripción detallada

DEFINICIONES

Tal como se usa en el presente documento, el término "Nrg4" (SEQ ID NO:1) se refiere a la proteína codificada por el gen *NRG4* humano. Nrg4 se descubrió en función de su homología de secuencia con otros miembros NRG y se predice que codifica una proteína precursora de 115 aminoácidos. Nrg4 está altamente conservada entre ratón y ser humano, con más del 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en el dominio de tipo EGF (aproximadamente AA 1-52, Fig.1). Por tanto, en algunas realizaciones, el término "Nrg4" se refiere a la SEQ ID NO:2, es decir, la proteína codificada por el gen *NRG4* de ratón.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de Nrg4, una variante de Nrg4, o un fragmento biológicamente activo de la misma para un paciente que lo necesite, como se describe en el presente documento para efectuar una alteración o mejora de la enfermedad o afección. El tratamiento en ciertos aspectos, requiere la administración de una dosis única o varias dosis a intervalos regulares para alterar el curso de la afección.

Tal como se usa en el presente documento, "administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un animal, incluyendo un paciente humano, e incluye, pero sin limitaciones, la administración por un profesional médico y la autoadministración.

Tal como se usa en el presente documento, el término "co-administración" se refiere a la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un animal, incluyendo un paciente humano. En determinados aspectos, los agentes farmacéuticos están en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. La coadministración incluye administrar cada agente farmacéutico a través de la misma o diferentes vías de administración. La co-administración abarca también la administración en paralelo o secuencial.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal, incluyendo un paciente humano.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de drogas, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabría un experto en la materia (Remington's, 1990).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno metabólico" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o interrupción de la función metabólica. "Metabólica/o" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo.

Las variantes de Nrg4 de la invención pueden comprender sustituciones conservadoras de aminoácidos nativos en restos concretos. Los restos de aminoácidos que comparten propiedades comunes de la cadena lateral y son apropiados para generar sustituciones conservadoras se agrupan de la siguiente manera.

(1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofilicos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromático: trp, tyr, phe.

Nrg4

5 La Neuregulina 4 (Nrg4), un miembro de la familia de ligandos de señalización de neuregulina, fue descubierto en el presente documento como una nueva hormona derivada de grasa que regula los niveles de glucosa y lípidos en plasma y el desarrollo de NAFLD. La expresión de Nrg4 está altamente enriquecida en tejidos adiposos y se induce durante la diferenciación de adipocitos marrones y blancos. Usando un ensayo de unión, se descubrió que Nrg4 se une exclusivamente a los hepatocitos a través de un supuesto receptor (o receptores) de manera saturable. Los niveles de expresión de Nrg4 en los adipocitos se reducen significativamente en modelos de obesidad en ratones inducida por la dieta y genética, lo que sugiere que la insuficiencia de Nrg4 puede contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos asociados con la obesidad. En apoyo de esto, los ratones nulos en Nrg4 desarrollaron hiperglucemia más grave, hiperlipidemia y esteatosis hepática después de una alimentación con alto contenido en grasas. Por el contrario, la expresión transgénica específica de grasa de Nrg4 disminuyó los niveles en sangre de glucosa y lípidos y redujo el contenido de grasa en el hígado. Los estudios descritos en el presente documento establecieron a Nrg4 como una nueva hormona derivada de la grasa que cumple una función beneficiosa en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Como tal, el direccionamiento terapéutico de Nrg4 proporciona una nueva vía para tratar, por ejemplo, la diabetes tipo 2, la hiperlipidemia y la NAFLD.

20 Los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen aquellos en los que la Nrg4 que se va a administrar es una variante de Nrg4 al menos 80 % idéntica, al menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica, al menos un 95 % idéntica, al menos un 96 % idéntica, al menos un 97 % idéntica, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

25 Las variantes de Nrg4 de la invención pueden comprender sustituciones conservadoras de aminoácidos nativos en restos concretos. Los restos de aminoácidos que comparten propiedades comunes de la cadena lateral y son apropiados para generar sustituciones conservadoras se agrupan de la siguiente manera.

(1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

30 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromático: trp, tyr, phe.

En esta divulgación también se prevén procedimientos que comprenden la administración de uno o más fragmentos fisiológicamente activos de Nrg4 para tratar una afección caracterizada por niveles o actividad insuficientes de Nrg4. Los fragmentos de Nrg4 incluyen, aunque no de forma limitativa, un fragmento de Nrg4 que carece de los primeros 4 restos de la SEQ ID NO:1, un fragmento que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 1 a 46, 1 a 55, 1 a 52, 1 a 53 o 1 a 62 de la SEQ ID NO:1. Un experto en la técnica puede detectar fácilmente fragmentos activos por cribado para determinar la actividad en un ensayo biológico relevante.

40 Una Nrg4, una variante de Nrg4 o un fragmento biológicamente activo de la misma para su uso en un procedimiento proporcionado deriva de cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la Nrg4, en un aspecto, deriva de las células que expresan Nrg4 endógena. Alternativamente, la fuente de la Nrg4, variante o fragmento de la misma deriva de células que se transforman con un vector de ácido nucleico que codifica Nrg4 o un precursor de la misma, y en varios aspectos son células de mamífero, células bacterianas, células de levadura, células de insectos, organismos completos u otras células que son una fuente útil de proteína recombinante.

45 El fragmento N-terminal de Nrg4 (aminoácido 1 a través aproximadamente del aminoácido 52 de Nrg4) contiene el dominio de tipo EGF y es capaz de unirse a sus receptores en los hepatocitos. Los péptidos sintéticos o Nrg4 recombinante producidos y purificados a partir de células de mamíferos (de ovario de hámster chino, CHO, por ejemplo) pueden usarse para reducir los niveles de glucosa en sangre. Los tratamientos crónicos con Nrg4 pueden disminuir el contenido de grasa hepática, similar a los efectos provocados por la expresión de Nrg4 transgénica. Los péptidos sintéticos pueden modificarse con acetilación en N-terminal, amidación en C-terminal, acilación, glicosilación y PEGilación, entre otros, para mejorar aún más los perfiles farmacocinéticos. Además, se pueden usar péptidos más pequeños que retienen las actividades biológicas de Nrg4.

Para la producción recombinante de una proteína Nrg4, se proporcionan ADN aislado y/o vectores recombinantes que codifican una proteína Nrg4 recombinante y secuencias de control que dirigen la expresión de proteínas en células

bacterianas, de mamífero o de insecto. En algunos casos, es deseable que la secuencia codificante de Nrg4 recombinante se fusione con una secuencia de aminoácidos adicional que puede, aunque no de forma limitativa, facilitar la purificación de proteínas recombinantes. Por ejemplo, en un aspecto, la proteína Nrg4 expresada se expresa como una proteína de fusión que incluye uno o más marcadores de histidina, secuencias de glutatión S-transferasa (GST), secuencias de proteína de unión a maltosa (MBP), Marcas secuencias y/o secuencias RGT marcadas de myc. Estas secuencias adicionales que ayudan en la purificación de la proteína recombinante se eliminan opcionalmente por escisión con proteasa.

Compuestos capaces de modular la actividad o expresión de Nrg4

Los compuestos que modulan la expresión de Nrg4 (es decir, los moduladores de Nrg4) también se consideran dentro del ámbito de la divulgación. Debido a que la expresión de Nrg4 está severamente deprimida en la obesidad, es probable que los compuestos o tratamientos que restauran la expresión de Nrg4 en los adipocitos puedan usarse para generar beneficios terapéuticos. En el presente documento se demuestra que la expresión de Nrg4 es inhibida por señales inflamatorias, tales como TNF α . Como tal, los compuestos antiinflamatorios que restauran los niveles de Nrg4 en los adipocitos se consideran dentro del ámbito de la divulgación.

Los compuestos que modulan la liberación/activación de Nrg4 (es decir, los moduladores de Nrg4) también se consideran dentro del ámbito de la divulgación. La Nrg4 se sintetiza como una proteína transmembrana precursora que sufre escisión proteolítica y desprendimiento, o liberación de Nrg4 soluble, dominio extracelular de la proteína unida a la membrana. La liberación de Nrg4 soluble en el tejido y la circulación es importante para activar Nrg4. La identidad de las proteasas exactas que escinden la Nrg4 sigue siendo desconocida. A pesar de esta incertidumbre, los compuestos que activan el evento de desprendimiento y aumentan la liberación de Nrg4 activa pueden seleccionarse y utilizarse para lograr beneficios metabólicos similares a los de la Nrg4 administrada.

Los compuestos que modulan el recambio de Nrg4 (es decir, los moduladores de Nrg4) también se consideran dentro del ámbito de la divulgación. Muchas hormonas experimentan un rápido recambio en la circulación. Los compuestos que bloquean la degradación proteolítica de Nrg4 pueden aumentar la concentración de Nrg4 en plasma y lograr beneficios metabólicos.

Los compuestos que modulan la unión y señalización del receptor de Nrg4 (es decir, los moduladores de Nrg4) también se consideran dentro del ámbito de la divulgación. Se pueden usar compuestos adicionales que mejoran la unión de Nrg4 a sus receptores y aumentan los eventos de señalización corriente abajo para prolongar y/o mejorar la acción de Nrg4 en las células diana.

Condiciones tratadas mediante administración de Nrg4

Los procedimientos proporcionados se utilizan para el tratamiento de un trastorno metabólico. La afección es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis o cirrosis.

En algunas realizaciones, la afección que puede aliviarse mediante la administración de Nrg4, una variante de Nrg4 o un fragmento biológicamente activo de la misma, se caracteriza por una expresión reducida de *NRG4* en tejido adiposo en comparación con la expresión de *NRG4* en tejido adiposo de un paciente sano. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón o tejido adiposo blanco.

"Expresión reducida de *NRG4*" indicativa de una afección tratable mediante la administración de Nrg4, una variante de Nrg4, o un fragmento biológicamente activo de la misma, puede definirse como el nivel disminuido de expresión de *NRG4* en muestras de individuos que se sabe que tienen la afección sobre la expresión de *NRG4* en muestras de individuos que se sabe que están libres de la afección. El nivel de expresión de *NRG4* puede ser, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,1 veces, 2,2 veces, 2,3 veces, 2,4 veces, 2,5 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3,0 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3 veces, 3,4 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, 4,0 veces, 4,1 veces, 4,2 veces, 4,3 veces, 4,4 veces, 4,5 veces, 4,6 veces, 4,7 veces, 4,8 veces, 4,9 veces, 5,0 veces, 5,1 veces, 5,2 veces, 5,3 veces, 5,4 veces, 5,5 veces, 5,6 veces, 5,7 veces, 5,8 veces, 5,9 veces o 6,0 veces más bajo en una muestra de un individuo con la afección.

En algunas realizaciones, la afección que puede aliviarse mediante la administración de Nrg4, una variante de Nrg4, o un fragmento biológicamente activo de la misma, es una comunicación aberrante entre los adipocitos y los tejidos corporales.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la Nrg4 administrada, la variante de Nrg4 el fragmento biológicamente activo de la misma regula negativamente la expresión de genes implicados en la lipogénesis *de novo*. Esta regulación corriente abajo de la lipogénesis hepática probablemente subyace a los efectos metabólicos beneficiosos de Nrg4.

Composiciones y formulaciones

La formulación óptima del modulador de Nrg4 o de Nrg4 será determinada por un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, la

tasa de liberación *in vivo* y la tasa de escisión *in vivo* de los agentes administrados.

Además de las formas de dosificación del modulador de Nrg4 o de Nrg4 representativas descritas en el presente documento, los expertos en la materia conocen generalmente excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables y, por lo tanto, se incluyen en la presente invención. Dichos excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden Nrg4 o un modulador de Nrg4 para su uso de acuerdo con la presente invención se formulan de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de una composición terapéutica en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Estas composiciones farmacéuticas se pueden fabricar de una manera que 10 se conoce por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, composición de grageas, levigación, emulsionantes, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

15 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de modulador de Nrg4 o de Nrg4, por ejemplo, por vía intradérmica, inyección cutánea o subcutánea, la composición está, en un aspecto, en forma de solución acuosa apirógena parenteralmente aceptable. La preparación de tales soluciones de proteínas o 20 polinucleótidos parenteralmente aceptables, en lo referente al pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está dentro de la habilidad en la técnica. Una composición contiene, opcionalmente, además de Nrg4, modulador de Nrg4 u otro principio activo de la presente invención, un vehículo isotónico, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactada u otros vehículos 25 que se conocen en la materia. La composición del modulador de Nrg4 o Nrg4, en otro aspecto, también contiene estabilizadores, conservantes, tampones, antioxidantes u otro aditivo conocido por los expertos en la materia. Los agentes de la invención están formulados en soluciones acuosas, preferentemente, en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la materia.

30 Las formulaciones del modulador de Nrg4 o Nrg4 están, en determinados aspectos, diseñadas para ser de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada o de liberación sostenida como se describe a continuación. Por tanto, un tipo de formulaciones farmacéuticas está formulado para liberación controlada o para liberación ralentizada. Las presentes composiciones de modulador de Nrg4 o Nrg4, en otros aspectos, comprenden, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en forma de liberación prolongada para proporcionar un efecto de almacenamiento y/o liberación prolongado. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas del modulador de Nrg4 o Nrg4 se comprimen, opcionalmente, en gránulos o cilindros y se implantan por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes como endoprótesis. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos, tales como siliconas y polímeros biodegradables.

35 Para administración oral, las composiciones pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, polvos, cápsulas, líquidos, soluciones, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar.

40 Para la administración por inhalación, las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado.

45 Las composiciones que comprenden Nrg4 o un modulador de Nrg4 para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de las composiciones en forma soluble en agua. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de las composiciones para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el principio activo puede encontrarse en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

50 Las composiciones también se pueden formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de suppositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular en forma de una preparación depot. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (p. ej. subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej. en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo, en forma de una sal muy poco soluble.

55 Las composiciones también pueden comprender vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o gel.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma de un complejo de a proteína o proteínas u otro principio activo de la presente invención junto con antígenos de proteína o péptido.

Las composiciones pueden incluir una matriz capaz de administrar la composición que contiene proteínas u otro principio activo al sitio de daño tisular, proporcionando una estructura para el desarrollo del hueso y el cartílago y es óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas. La elección del material de la matriz se basa en las propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, mecánicas, aspecto cosmético y de interfaz.

5 La composición puede contener además otros agentes que potencian la actividad de la proteína u otro principio activo o complementan su actividad o uso en el tratamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína u otro principio activo de la invención, o para minimizar los efectos secundarios.

10 Las técnicas para la formulación y administración de las composiciones terapéuticas de la presente solicitud se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a dicho principio solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que resultan en el efecto terapéutico, ya sea administradas en combinación, en serie o de forma simultánea.

Administración

20 La administración de Nrg4 o un modulador de Nrg4 de acuerdo con los procedimientos proporcionados se realizará a través de cualquier vía. Se contemplan las vías de administración convencionales, por ejemplo, parenteral, subcutánea, intravenosa, por vía intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar, instilación intratraqueal, instilación bronquial, aerosol, sublingual, oral, nasal, anal, vaginal o transdérmica, o mediante implantación quirúrgica en un sitio particular. Se contemplan específicamente procedimientos que incluyen la administración intravenosa.

25 El tratamiento en un procedimiento proporcionado, en diversos aspectos, consiste en una dosis única o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo. La administración de Nrg4 o un modulador de Nrg4 es sistémica o local, y puede comprender una inyección o infusión en un solo sitio de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de la proteína Nrg4. Alternativamente, se contempla que la composición terapéutica del modulador de Nrg4 o Nrg4 se administra al paciente en múltiples sitios. Se administran múltiples administraciones simultáneamente o se administran durante un período de tiempo. También se contempla la terapia adicional en la que se administra Nrg4 o un modulador de Nrg4 por períodos, por ejemplo, diariamente, semanalmente o mensualmente.

30 En determinadas realizaciones, la administración parenteral de los compuestos terapéuticos se lleva a cabo con un bolo inicial seguido de una infusión continua para mantener los niveles circulantes terapéuticos del producto farmacológico. Los expertos en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones y regímenes de administración según lo determinado por la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual. Los procedimientos proporcionados incluyen aquellos en los que la Nrg4 se administra por vía oral y por inyección. En procedimientos en los que se inyecta el modulador de Nrg4 o Nrg4, la inyección es intravenosa o subcutánea. En determinados aspectos, la inyección es con una composición de formación de depósito y en realizaciones que incluyen la formación de depósito, la composición de formación de depósito se administra implantando un dispositivo de administración adecuado en el paciente. En un aspecto, el dispositivo de administración se implanta por vía subcutánea y, en ciertos aspectos, el dispositivo de administración es una bomba.

40 La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del Nrg4 y las vías de administración. Dependiendo de la vía de administración, se calcula una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, las áreas de superficie corporal o el tamaño del órgano. La disponibilidad de modelos animales es particularmente útil para facilitar la determinación de las dosis apropiadas de un determinado agente terapéutico.

45 El perfeccionamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis de tratamiento apropiada se realiza rutinariamente por los expertos en la técnica sin experimentación excesiva. El régimen de dosificación final será determinado por el médico encargado del tratamiento, considerando factores que modifican la acción del modulador de Nrg4 o Nrg4, por ejemplo, la actividad específica, la capacidad de respuesta del paciente, la edad, la afección, el peso corporal, sexo y dieta del paciente;, la gravedad de cualquier afección, el tiempo de administración, el tipo de tratamiento concurrente, en caso de haberla, la frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado, y otros factores clínicos. A medida que se realizan los estudios, surgirá más información sobre los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para enfermedades y afecciones específicas.

55 En determinadas realizaciones, el modulador de Nrg4 o Nrg4 se administra solo, en otras realizaciones, el modulador de Nrg4 o Nrg4 se administra junto con otras terapias dirigidas a la afección objetivo o dirigidas a otros síntomas de la misma. Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,01 mg a 30 mg por kilogramo de peso corporal al día, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg a 10 mg/kg.

También se proporcionan dosis unitarias de un modulador de Nrg4 o Nrg4. La "dosis unitaria" se define como una cantidad discreta de una composición terapéutica dispersa en un vehículo adecuado.

Se apreciará que el modulador de Nrg4 o Nrg4 y los procedimientos de tratamiento proporcionados son útiles en los campos de la medicina humana y la medicina veterinaria. Por tanto, el sujeto que se va a tratar es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal mamífero. Para fines veterinarios, los sujetos incluyen, por ejemplo, animales de granja incluyendo vacas, oveja, cerdos, caballos y cabras, los animales de compañía, tales como perros y gatos, animales exóticos y/o zoológicos, animales de laboratorio, incluidos ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres; y aves de corral, tales como pollos, pavos, patos y gansos. El paciente que se está tratando tiene cualquier edad, por ejemplo, entre las edades de 10-50 años, 20 años o menos, o 10 años o menos.

Además, se contempla que el modulador de Nrg4 o Nrg4 de la presente invención se use en combinación con cualquier tratamiento presente para la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis o cirrosis. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se contempla que los procedimientos de la invención son útiles en combinación con un tratamiento conocido para el trastorno metabólico, el trastorno cardiovascular y/o trastorno de niveles elevados de lípidos. Las composiciones que comprenden Nrg4, una variante, o un fragmento, o el modulador de Nrg4 se administran antes, después o durante dicha terapia.

Terapia de combinación

Para aumentar la efectividad de un tratamiento con las composiciones de modulador de Nrg4 o Nrg4 proporcionadas, es deseable en un aspecto combinar estas composiciones con otras terapias efectivas en el tratamiento de enfermedades o afecciones específicas.

En algunos casos, las composiciones de la presente invención preceden o siguen al otro tratamiento del agente por intervalos que varían de minutos a semanas. Se contempla que uno administre ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí o dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, es deseable extender significativamente el período de tiempo para el tratamiento, donde transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

En ciertos casos específicos, las composiciones de modulador de Nrg4 o Nrg4 se administran en combinación con un segundo agente para prevenir o tratar un trastorno metabólico o para prevenir o tratar una enfermedad cardiovascular. Como ejemplos, los agentes que son útiles en terapias combinadas incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes reductores del azúcar en sangre (es decir, agentes que reducen el azúcar en sangre) o agentes reductores de lípidos (es decir, agentes que reducen los niveles de lípidos).

Agentes hipoglucemiantes

En la actualidad, existen varios enfoques farmacológicos para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Actúan a través de diferentes modos de acción: 1) sulfonilureas (por ejemplo, glimepirida, glisentida, sulfonilurea, AY31637) esencialmente estimulan la secreción de insulina; 2) las biguanidas (por ejemplo, metformina) actúan promoviendo la utilización de glucosa, reduciendo la producción de glucosa hepática y disminuyendo la producción de glucosa intestinal; 3) los inhibidores de la alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbose, miglitol) ralentizan la digestión de carbohidratos y, en consecuencia, la absorción intestinal, y reducen la hiperglucemía posprandial; 4) las tiazolidinedionas (por ejemplo, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, glipizida, balaglitazona, rivoglitazona, netoglitazona, troglitazona, englitazona, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, ciglitazona, adaglitazona, CLX 0921, darglitazona, CP 92768, BM 152054) mejoran la acción de la insulina, promoviendo así la utilización de glucosa en tejidos periféricos; 5) los péptidos y agonistas similares a glucagón (por ejemplo, exendina) o estabilizadores de los mismos (por ejemplo, inhibidores de DPP4, tales como sitagliptina) potencian la secreción de insulina estimulada por glucosa; y 6) la insulina o sus análogos (por ejemplo, LANTUS®) estimulan la utilización de glucosa en los tejidos e inhiben la producción de glucosa hepática. Los enfoques farmacológicos mencionados anteriormente pueden utilizarse individualmente o en terapia combinada.

Agentes hipolipemiantes

La expresión “agente hipolipemiente” se refiere a un agente farmacéutico proporcionado a un individuo para alcanzar una disminución de los niveles de lípidos en el individuo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se proporciona un agente hipolipemiente a un individuo para reducir uno o más de LDL-C, ApoB, VLDL-C, IDL-C, no HDL-C, Lp (a), triglicéridos séricos, triglicéridos hepáticos, Ox-LDL-C, pequeñas partículas de LDL, VLDL pequeñas, fosfolípidos y fosfolípidos oxidados. Idealmente, la administración de un agente hipolipemiente conduce a una reducción de uno o más lípidos séricos en un individuo con el tiempo.

En determinadas de dichas realizaciones, los agentes farmacéuticos hipolipemiantes que pueden administrarse conjuntamente con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitaciones, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina, pravastatina, fluvastatina, ezetimiba, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo y fenofibrato. En determinadas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiente se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiente se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiente se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiente coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiente se

administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiantre coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiantre se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiantre coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiantre se administrara solo.

5 **Kits**

La presente invención también contempla kits para su uso en el tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento. Dichos kits incluyen al menos una primera composición estéril que comprende una Nrg4 (SEQ ID NO: 1), una variante de Nrg4 o un fragmento biológicamente activo de la misma descrito anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otro componente es opcionalmente un segundo agente terapéutico para el tratamiento 10 del trastorno junto con un recipiente y vehículos adecuados para la administración de las composiciones terapéuticas. Los kits opcionalmente comprenden soluciones o tampones para suspender, diluir o efectuar la administración de la primera y segunda composiciones. Los kits también comprenden, opcionalmente, catéteres, jeringas u otros dispositivos de administración para la administración de una o más de las composiciones utilizadas en los 15 procedimientos de la invención. En otro aspecto, los kits comprenden, opcionalmente, además instrucciones que contienen protocolos de administración para los regímenes terapéuticos.

Procedimientos para diagnosticar afecciones caracterizadas por deficiencia de Nrg4

La presente divulgación también contempla procedimientos para diagnosticar un trastorno metabólico seleccionado 20 del grupo que consiste en enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y cirrosis en un paciente que comprende determinar los niveles de Nrg4 en una muestra del paciente sospechoso de padecer la afección.

Se apreciará que la determinación del nivel de Nrg4 en una muestra de paciente será útil para determinar cómo manejar la afección en el paciente. Por ejemplo, dado que los niveles reducidos de Nrg4 están asociados con 25 trastornos metabólicos y enfermedades hepáticas, el clínico puede usar la información sobre los niveles de Nrg4 para facilitar la toma de decisiones con respecto al tratamiento del paciente. Por tanto, si el nivel de Nrg4 es indicativo de una etapa temprana de una de las afecciones mencionadas anteriormente, se pueden prescribir regímenes de tratamiento adecuados.

El nivel de Nrg4 que es indicativo del trastorno metabólico puede definirse como el nivel disminuido de Nrg4 presente 30 en muestras de individuos que se sabe que tienen el trastorno sobre el nivel de Nrg4 en muestras de individuos que se sabe que están libres del trastorno. El nivel de Nrg4 puede ser, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,1 veces, 2,2 veces, 2,3 veces, 2,4 veces, 2,5 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3,0 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3 veces, 3,4 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, 4,0 veces, 4,1 veces, 4,2 veces, 4,3 veces, 4,4 veces, 4,5 veces, 4,6 veces, 4,7 veces, 4,8 veces, 4,9 veces, 5,0 veces, 5,1 veces, 5,2 veces, 5,3 veces, 5,4 veces, 5,5 veces, 5,6 veces, 5,7 veces, 5,8 veces, 5,9 veces o 6,0 veces más bajo en una muestra de un individuo con el trastorno.

35 Se apreciará que los procedimientos de la invención incluyen procedimientos que ayudan al diagnóstico y procedimientos de pronóstico. También se apreciará que los procedimientos de la invención son útiles para el médico a la hora de determinar un curso de tratamiento o tratamiento del paciente.

Los marcadores de *NRG4* identificados utilizando los procedimientos proporcionados, en un aspecto, se utilizan para 40 evaluar la eficacia del tratamiento (por ejemplo, mejora de uno o más síntomas de una patología). Cuando la mejora de una afección relacionada con la deficiencia de Nrg4 puede estar relacionada con un aumento en los niveles de Nrg4, Los niveles de Nrg4 en una muestra tomada del paciente se miden antes (para el fondo) y durante o después 45 (por ejemplo, en un momento designado, periódicamente o al azar) el curso del tratamiento. Debido a que un aumento en los niveles de Nrg4 puede ser transitorio, el procedimiento, en un aspecto, se realiza a intervalos regulares, (por ejemplo, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 18 horas, cada 24 horas, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada 8 días, cada 9 días, cada 10 días, cada 11 días, cada 12 días, cada 13 días, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 2 meses, 50 cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses, cada 7 meses, cada 8 meses, cada 9 meses, cada 10 meses, cada 11 meses, cada año, o más) estrechamente antes y después de cada tratamiento. Dependiendo del curso del tratamiento y otras variables clínicas, los clínicos con conocimientos ordinarios en la materia podrán determinar una pauta apropiada para realizar el ensayo con fines de diagnóstico o control de enfermedades/tratamientos.

En diversas realizaciones, la proteína Nrg4 se detecta y/o cuantifica en la muestra utilizando cualquiera de varios 55 ensayos de unión inmuno lógica bien reconocidos (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Para una revisión de inmunoensayos generales, véase también Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); "Basic and Clinical Immunology" (7^a Edición), Stites y Terr, eds. (1991).

En otra realización, se usa análisis de inmunotransferencia (transferencia Western) para detectar y cuantificar la presencia de Nrg4 en la muestra. La técnica generalmente comprende la separación de proteínas de muestra por

electroforesis en gel en función del peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado, (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon o un filtro de nylon derivado) e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente a Nrg4. Los anticuerpos anti-Nrg4 se unen específicamente a Nrg4 en el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o alternativamente pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-ratón de oveja marcados) que se unen específicamente al anticuerpo anti-Nrg4.

En otra realización, se considera que los ensayos cuantitativos de Nrg4 muestran un resultado positivo, por ejemplo, nivel de Nrg4 elevado o disminuido, cuando el nivel medido de Nrg4 es mayor o menor que el nivel medido o conocido para una muestra de control (por ejemplo, un nivel conocido o medido para un individuo sano normal o un nivel de "basal/de referencia" determinado en un momento diferente para el mismo individuo). En una realización particularmente preferida, se considera que el ensayo muestra un resultado positivo cuando la diferencia entre la muestra y el "control" es estadísticamente significativa (por ejemplo, al 85 % o más, preferentemente al 90 % o más, más preferentemente al 95 % o más y lo más preferentemente al 98 % o más de nivel de confianza).

En una realización de la divulgación, los anticuerpos immunoprecipitan las proteínas Nrg4 de la solución y reaccionan con la proteína Nrg4 en Western o inmunotransferencias de geles de poliacrilamida. En otra realización, los anticuerpos detectan proteínas Nrg4 en muestras de suero almacenadas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no limitan en modo alguno el ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Nrg4 es un factor derivado de adipocitos cuya diana son los hepatocitos

En este ejemplo, se demuestra usando un ensayo de unión hormonal, que Nrg4 se une a los hepatocitos y reduce las concentraciones de glucosa en sangre después de inyecciones i.p. Los estudios metabólicos en ratones nulos para Nrg4 también demostraron que la deficiencia de Nrg4 exacerbó el desarrollo de hiperglucemia e hiperlipidemia después de la alimentación con HFD. Además, los ratones que carecen de Nrg4 desarrollaron hígado graso más grave. Estos hallazgos subrayan un papel importante de Nrg4 en la regulación de la glucosa de todo el cuerpo y el metabolismo de los lípidos.

Materiales y procedimientos

Generación de ratones transgénicos de Nrg4

El ADNc de Nrg4 de ratón (incluyendo 5'UTR y 3'UTR parcial) se clonó con TA en el vector pCR2.1 TOPO. El promotor AP2 se insertó entre HindIII y KpnI en el vector, mientras que la hormona de crecimiento humano poliA se insertó entre EcoRV y XbaI. Todo el vector se linealizó mediante doble digestión con HindIII y Apal para liberar el casete transgénico para la microinyección en huevos de ratón C57BL/6J para generar cachorros transgénicos AP2-Nrg4.

Los ratones defectivos en Nrg4 se adquirieron en el Centro de Recursos Regionales de Ratones Mutantes (MMRRC).

Diferenciación de adipocitos y tratamientos

Se cultivaron preadipocitos marrones inmortalizados con antígeno T-SV40 grandes en DMEM con suero bovino fetal al 10 % (FBS) hasta 2 días después de la confluencia (contar como día 0). La diferenciación se indujo añadiendo un cóctel que contenía IBMX 0,5 mM, indometacina 125 μ M, dexametasona 1 μ M a un DMEM de mantenimiento de diferenciación que contiene 10 % de FBS, insulina 20 nM e InM T3. Dos o tres días después de la inducción, las células se cultivaron solo en los medios de mantenimiento. El ARN total se aisló en diferentes días durante la diferenciación de adipocitos marrones para el análisis de la expresión génica.

Los preadipocitos 3T3-L1 se cultivaron en DMEM con suero de crecimiento bovino (BGS) al 10 % hasta 2 días después de la confluencia (contar como día 0). La diferenciación se indujo añadiendo un cóctel que contenía IBMX 0,5 mM, dexametasona 1 μ M e insulina 1 μ g/ml a DMEM suplementado con FBS al 10 %. Tres días después de la inducción, las células se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 % más 1 μ g/ml de insulina durante otros 2 días, seguido de mantenimiento en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Para el tratamiento con TNF α , se añadieron 10 ng/ml de TNF α a adipocitos maduros (día 8) 3T3-L1 cultivados en DMEM con FBS al 10 % durante seis horas respectivamente antes del aislamiento de ARN. Para el tratamiento con IL-1 β , se añadieron 40 ng/ml de IL-1 β a adipocitos maduros (día 8) 3T3-L1 cultivados en DMEM con FBS al 10 % durante seis horas antes del aislamiento de ARN.

Ensayo de unión a Nrg4

Las células 293T se transfecionaron con vectores que expresan SEAP o SEAP-Nrg4^{N62}. 24 horas después de la transfección, las células se cambiaron a medios sin suero durante 2 días adicionales antes de que los medios se recogieran y se concentraran usando Centricon. En resumen, las láminas de tejido congeladas se incubaron con medios acondicionados SEAP o SEAP-Nrg4^{N62} durante 45 minutos a temperatura ambiente antes de lavarlas cuatro veces en Tween-20 al 0,1 % que contenía PBS y fijarlas en una solución que contenía HEPES 20 mM (pH 7,4), 60 %

de acetona y 3 % de formaldehído. Después de inactivar la fosfatasa alcalina endógena a 65 °C durante 30 minutos, la actividad enzimática derivada de la proteína de fusión se detectó utilizando sustrato NBT/BCIP. Para la unión competitiva, las láminas de tejido congeladas se preincubaron con 4 µg/µl de GST o GST-Nrg4^{N62} durante 30 minutos, antes de la coincubación con los medios acondicionados de SEAP-Nrg4^{N62} durante otra hora.

5 Resultados

Nrg4 es un miembro de la familia de neuregulina de ligandos de señalización extracelular que también incluye Nrg1, Nrg2 y Nrg3. Se predice que la principal isoforma de codificación de Nrg4 codifica una proteína de 115 aa, que contiene un solo dominio de tipo EGF con tres enlaces disulfuro característicos entre Cys9-Cys23, Cys17-Cys34 y Cys36-Cys45, un supuesto sitio de glicosilación unido a N y un dominio transmembrana (Fig. 1). Al igual que otras neuregulinas, Nrg4 se sintetiza como una proteína transmembrana y sufre una escisión proteolítica que libera el péptido extracelular tipo EGF para la unión al receptor y la transducción de señales. La identidad de las proteasas responsables del desprendimiento de Nrg4 es actualmente desconocida, pero es probable que sean metaloproteasas de matriz. Nrg4 está altamente conservada entre ratón y ser humano con más del 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en el dominio de tipo EGF (aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 52 de Nrg4, Fig. 1).

15 Se ha informado de la expresión de Nrg4 en el páncreas, células epiteliales mamarias, cánceres de próstata y líneas celulares de linfoma. Sin embargo, el transcripto de pre-ARNm de Nrg4 sufre un corte y empalme complejo alternativo y genera una serie de isoformas de corte y empalme que parecen carecer de potencial codificador de proteínas. Además, la especificidad de los anticuerpos frente a Nrg4 utilizados en estudios inmunohistoquímicos previos sigue siendo incierta. Como tal, el perfil exacto de la expresión de Nrg4 y su regulación no se han establecido de manera concluyente. En el presente documento se desarrolló un procedimiento de PCR cuantitativa Taqman (qPCR) que detecta específicamente la isoforma de codificación de Nrg4. Se descubrió que el ARNm de Nrg4 se expresa abundantemente en tejido adiposo marrón (BAT) y tejido adiposo blanco (WAT), pero no en otros tejidos examinados, incluyendo riñón, músculo esquelético, cerebro, testículo, intestino delgado, hígado, corazón, bazo, pulmón y páncreas (Fig. 2A). La restricción de la expresión de Nrg4 a los tejidos adiposos sugiere que, en condiciones fisiológicas normales, Nrg4 puede servir como un ligando que media la comunicación entre los adipocitos y otros tejidos del cuerpo. La expresión de Nrg4 también se examinó para determinar si está regulada durante la diferenciación de adipocitos marrones y blancos. Similar a UCP1, un marcador para adipocitos marrones, la expresión de ARNm de Nrg4 es altamente inducida durante la diferenciación de adipocitos marrones (Fig. 2B). Los niveles de ARNm de Nrg4 también aumentaron significativamente durante la diferenciación de los adipocitos blancos 3T3-L1 (Fig. 2B).

20 30

25 35

40

La grasa parda desempeña un papel importante en la termogénesis adaptativa en respuesta a la exposición al frío en roedores. Como Nrg4 se expresa altamente en el tejido adiposo marrón, se evaluó su papel potencial en la termogénesis inducida por el frío. Los ratones de tipo salvaje y deficientes en Nrg4 se expusieron a temperatura fría (4 °C) y la temperatura rectal se midió en diferentes puntos de tiempo. La temperatura corporal central en estos dos grupos de ratones fue casi indistinguible durante la exposición al frío, lo que sugiere que Nrg4 no es necesaria para la defensa contra el estrés por frío agudo (Fig. 3A). El aspecto histológico de la grasa parda fue similar entre los grupos SV y DEF (Fig. 3B). Expresión inducible por frío de genes de grasa parda, tales como UCP1 y desyodinasa 2 (DIO2), también fue similar (Fig. 3C). Curiosamente, la concentración plasmática de triglicéridos (TG) fue mayor, mientras que los niveles plasmáticos de ácidos grasos no esterificados y cetonas (β-hidroxibutirato) fueron más bajos en ratones con deficiencia de Nrg4 (Fig. 3D). Estas observaciones sugieren que, a pesar de su expresión específica de tejido adiposo, Nrg4 probablemente tiene como diana otros tipos de células en el cuerpo.

45 50

Para identificar objetivos de tejido para la unión y acción de Nrg4, se generó una proteína de fusión entre la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y los 62 aminoácidos N-terminales de Nrg4 (SEAP-Nrg4^{N62}) y los ensayos de unión se realizaron como se ha descrito previamente. Este fragmento de Nrg4 contiene el dominio de tipo EGF y se predice que será competente para iniciar la transducción de señales. Los medios acondicionados se recogieron de células HEK 293T transfectadas transitoriamente con plásmidos SEAP o SEAP-Nrg4^{N62} y se concentraron usando una columna de centrifugación Centricon. Los ensayos de unión se realizaron en secciones de tejido seguido de un lavado extenso, fijación, inactivación por calor e incubación con sustratos de fosfatasa alcalina (BCIP/NBT). Solo se detectaron señales de fondo en la grasa parda, corazón, músculo esquelético y bazo, tanto para SEAP como para SEAP-Nrg4^{N62} (Fig. 4A). Por el contrario, se observó una fuerte unión de SEAP-Nrg4^{N62} a los hepatocitos (Fig. 4B). Además, la presencia de exceso de GST-Nrg4^{N62}, pero no GST, abolió la unión de SEAP-Nrg4^{N62} a los hepatocitos, lo que sugiere que los supuestos sitios de unión a Nrg4 en los hepatocitos son limitados y saturables (Fig. 4C).

Ejemplo 2: La expresión de Nrg4 en adipocitos está regulada negativamente en la obesidad

En este ejemplo, utilizando un ensayo de PCR cuantitativa Taqman altamente sensible y específico, se descubrió que Nrg4 se expresaba abundantemente en tejidos adiposos marrones y blancos. Se detectó muy poca expresión de ARNm en otros tejidos. La expresión de Nrg4 fue altamente inducible durante la diferenciación de adipocitos. Este perfil de expresión sugiere que Nrg4 puede desempeñar un papel valioso en la mediación de la interacción entre los tejidos adiposos y otros tejidos metabólicos. La expresión de ARNm de Nrg4 se redujo notablemente en tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida por dieta y genética. Como tal, la obesidad está asociada con un déficit potencial de expresión y acción de Nrg4.

Materiales y procedimientos

Mediciones metabólicas

Las concentraciones plasmáticas de glicerol/triglicéridos, cetona/colesterol y ácidos grasos no esterificados se midieron usando kits de ensayo comerciales (Sigma, Stanbio Laboratory, Wako Diagnostics, respectivamente).

5 Análisis de la expresión génica

El ARN total del tejido adiposo blanco se extrajo usando un kit comercial de Invitrogen. Los ARN de otros tejidos y células cultivadas se extrajeron usando el procedimiento TRIzol. Para el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (qPCR), se transcribió inversamente una cantidad igual de ARN usando MMLV-RT, seguido de reacciones de PCR cuantitativas usando SYBR Green (Life Technologies). La abundancia relativa de ARNm se normalizó a la proteína ribosómica 36B4.

Para detectar la isoforma de codificación de Nrg4 utilizando Taqman PCR, se generaron un cebador de sentido que abarca la unión del exón 3 y el exón 6 (5' CCCAGCCCATTCTGTAGGTG 3' (SEQ ID NO: 3)), un cebador antisentido en el exón 6 (5' ACCACGAAAGCTG-CCGACAG 3' (SEQ ID NO: 4)), y una sonda taqman en el exón 6, pero entre los cebadores sentido y antisentido (5' 6-FAM-CGGAGCACGCTGCGAAGAGGTT-BHQ 3' (SEQ ID NO: 5)). Se realizó PCR Taqman utilizando el sistema Taqman Universal PCR Master Mix de ABI, la abundancia relativa de la isoforma codificante de Nrg4 se normalizó a la proteína ribosómica 36B4.

Resultados

Para determinar si la expresión de Nrg4 tiene una regulación alterada en la obesidad, se realizaron análisis de qPCR sobre ARN total aislado de tejidos adiposos de ratones alimentados con pienso estándar (magra) o una dieta rica en grasas (HFD) que contenía un 60 % de calorías derivadas de grasa (obesas). Como cabía esperar, la expresión de TNF α , una citocina inflamatoria, se elevó en grasa blanca epididimaria de ratones alimentados con HFD (Fig. 5A). Mientras que la expresión de Nrg4 en la grasa parda fue similar entre dos grupos, sus niveles de ARNm se redujeron notablemente en la grasa blanca epididimaria en ratones con obesidad inducida por la dieta (Fig. 5A y Fig. 15A). Análogamente, la expresión de Nrg4 también se redujo significativamente tanto en la grasa blanca epididimaria como en la grasa parda de ratones con leptina o con deficiencia del receptor de leptina (ob/ob o db/db), dos modelos genéticos de obesidad más grave (Fig. 5B y Fig. 15A). La regulación por disminución de la expresión de Nrg4 se produjo específicamente en adipocitos (Fig.5C y Fig.15B). De hecho, el nivel de ARNm de Nrg4 fue muy bajo en la fracción vascular estromal de la grasa blanca epididimaria. Por el contrario, la fracción adipocítica madura expresó abundante Nrg4, que se redujo drásticamente en la obesidad. Debido a que las citocinas proinflamatorias se han asociado con la resistencia a la insulina del tejido adiposo y la regulación metabólica alterada, se realizaron experimentos para determinar si la señalización de citocinas proinflamatorias modula la expresión de Nrg4 en adipocitos cultivados. Los adipocitos pardos y 3T3-L1 completamente diferenciados se trataron con vehículo (PBS), TNF α o IL-1 β durante diferentes períodos de tiempo antes de que se aislara el ARN total de las células tratadas para el análisis de expresión génica. En comparación con el vehículo, el tratamiento con TNF α e IL-1 β disminuyó drásticamente la expresión del ARNm de Nrg4 en adipocitos pardos y blancos (Fig.5D y Fig. 15C).

La relación entre la expresión de Nrg4 en las grasas y la gravedad de la obesidad se examinó más a fondo. Un grupo de ratones C57BL/6J macho de tipo salvaje fue alimentado con una dieta rica en grasas durante aproximadamente dos meses para inducir obesidad. Los ratones alimentados con HFD desarrollaron obesidad de diversa gravedad y tenían un peso corporal que oscilaba entre 30,7 y 51,9 gramos. Los parámetros metabólicos se midieron en estos ratones y se examinó su asociación con la expresión de Nrg4 en grasas viscerales. La expresión de ARNm de Nrg4 se correlacionó inversamente con el peso corporal ($R^2 = 0,632$) y el peso de la grasa blanca epididimaria ($R^2 = 0,726$) (Fig. 6A y B). Además, los ratones con baja expresión de Nrg4 tendieron a desarrollar hiperglucemia más severa y a tener un mayor contenido de grasa en el hígado. Por el contrario, la alta expresión de Nrg4 en la grasa blanca se asoció con una menor glucemia y acumulación de grasa hepática (Fig. 6C y D). Conjuntamente, estos estudios demuestran que la expresión de Nrg4 se reduce severamente en la obesidad y sugieren fuertemente que su insuficiencia puede estar relacionada con el desarrollo de trastornos metabólicos asociados con la obesidad, tales como hiperglucemia e hígado graso.

Ejemplo 3: La pérdida de Nrg4 exacerba la resistencia a la insulina inducida por la dieta, esteatosis hepática e hipertrigliceridemia

Para proporcionar evidencia de prueba de concepto de que elevar los niveles de Nrg4 puede conferir beneficios metabólicos, se generaron ratones transgénicos de Nrg4 específicos de grasa para rescatar la disminución en la expresión de Nrg4 en la obesidad en este ejemplo. En marcado contraste con la deficiencia de Nrg4, los ratones transgénicos Nrg4 tenían concentraciones de glucosa y lípidos significativamente reducidas y acumulación reducida de grasa en el hígado. Como tal, se prevé que el aumento de la señalización hormonal de Nrg4 mejore el desarrollo de trastornos metabólicos asociados con la obesidad.

Para definir en qué medida la insuficiencia de Nrg4 contribuye a la patogenia de los trastornos metabólicos, se midieron los parámetros metabólicos en ratones de tipo salvaje (WT) y defectivos en Nrg4 (KO) después de alimentación con

HFD. Los ratones defectivos en Nrg4 son viables, crecen normalmente y son indistinguibles de los compañeros de camada SV cuando se les alimenta con comida estándar. Después de la alimentación con HFD, los ratones nulos para Nrg4 ganaron un poco más de peso corporal que el control (Fig. 7A). Además, los niveles de glucosa en sangre fueron más altos en ratones nulos para Nrg4 (Fig. 7B). Las concentraciones de insulina en plasma también se elevaron en ratones que carecen de Nrg4 (Fig. 7B), lo que sugiere que Nrg4 puede desempeñar un papel protector en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, particularmente en estados de estrés metabólico como la obesidad. Los niveles de triglicéridos en plasma fueron más altos en ratones nulos para nrg4, mientras que las concentraciones de β -hidroxibutirato, un componente principal de los cuerpos cetónicos, fueron inferiores en el grupo nulo (Fig. 7C). Debido a que los cuerpos cetónicos son productos de la β -oxidación de los ácidos grasos hepáticos, estos resultados son consistentes con la unión de Nrg4 a los hepatocitos y un papel potencial de este factor en la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos. Para probar más esta posibilidad, Se midió el contenido de grasa hepática. En comparación con el control, los ratones nulos para nrg4 tienen una deposición elevada de triglicéridos en el hígado después de la alimentación con HFD (Fig. 8A). La tinción histológica indicó que hubo un marcado aumento de la acumulación de lípidos en los hepatocitos defectivos en Nrg4. Por el contrario, la apariencia histológica de los tejidos adiposos se mantuvo similar entre dos grupos (Fig. 8B).

Se puede concluir de estos estudios que la pérdida de señalización de Nrg4 exacerbía la regulación metabólica alterada inducida por la dieta, particularmente el control glucémico, la progresión del hígado graso y la homeostasis de triglicéridos plasmáticos.

Ejemplo 4: La expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos mejora la regulación metabólica alterada inducida por la dieta

Este ejemplo demuestra que a nivel mecanista, la Nrg4 señala a través de la modulación de la expresión génica metabólica. La Nrg4 regula negativamente la expresión de genes implicados en la lipogénesis *de novo*. Esta regulación corriente abajo de la lipogénesis hepática probablemente subyace a los efectos metabólicos beneficiosos de Nrg4.

Resultados

Como se ha descrito anteriormente, la expresión de Nrg4 en adipocitos disminuyó significativamente en la obesidad inducida por la dieta y genética en ratones (Fig. 5A y B). Como tal, la sobreexpresión transgénica de Nrg4 en los tejidos adiposos puede normalizar o rescatar el deterioro de la homeostasis metabólica inducida por la obesidad. Además, La administración de la proteína Nrg4 recombinante puede proporcionar beneficios terapéuticos en el tratamiento de la hiperglucemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico e hiperlipidemia. Para probar estas posibilidades, Se generaron ratones transgénicos de Nrg4 específicos de grasa bajo el control del promotor/potenciador aP2, que ha sido ampliamente utilizado en la dirección de la expresión transgénica de genes en adipocitos. Se generaron cinco fundadores transgénicos independientes con varios niveles de expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos marrones y blancos. Se eligió la línea 111 para estudios adicionales porque el transgén Nrg4 se expresó específicamente en tejidos adiposos a niveles ligeramente superiores a su expresión en ratones delgados. Los ratones transgénicos AP2-Nrg4 no se distinguían de los compañeros de camada no transgénicos con respecto al crecimiento posnatal, el aspecto físico y las características generales de comportamiento.

Para determinar si la expresión transgénica de Nrg4 protege a los ratones de los trastornos metabólicos inducidos por la dieta, se alimentó a ratones control y transgénicos con una dieta rica en grasas. El grupo transgénico ganó un poco menos de peso que el control después de 11 semanas de alimentación con HFD (Fig. 9A). Las mediciones metabólicas indican que los ratones transgénicos AP2-Nrg4 tenían glucosa en sangre más baja en condiciones de alimentación y ayuno (Fig. 9C). En contraste con los ratones nulos para nrg4, que tenían niveles de cetona en plasma más bajos, los ratones transgénicos tenían niveles elevados de cetonas después no comer durante la noche (Fig. 9C), lo que sugiere que la oxidación de ácidos grasos hepáticos y la cetogénesis podrían mejorarse mediante la expresión transgénica de Nrg4. Las concentraciones de triglicéridos en plasma fueron más bajas en el grupo transgénico. Las pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina indican que los ratones transgénicos AP2-Nrg4 eran más tolerantes a la glucosa y sensibles a la insulina (Fig. 10A-B). Además de mejorar el perfil metabólico en plasma, la acumulación de grasa en el hígado se redujo significativamente en ratones transgénicos (Fig.10C-D). Sistématicamente, el análisis de la expresión génica mostró que el hígado de los ratones transgénicos tenía una menor expresión de los principales genes lipogénicos. La expresión de genes asociados a gotas de lípidos como FSP27 y s3-12 también fue significativamente menor en el hígado transgénico (Fig. 11). Tomados en conjunto, estos estudios proporcionan evidencia genética de que elevar los niveles de Nrg4 puede tener efectos deseables sobre el control glucémico y lograr una protección significativa contra la enfermedad del hígado graso.

Se realizaron estudios de prueba de principio para evaluar los posibles efectos terapéuticos de la proteína Nrg4 recombinante. La proteína de fusión GST y GST-Nrg4^{N62} se expresó y purificó a partir de bacterias que contenían vectores de expresión relevantes. Se administraron dos dosis de GST o GST-Nrg4^{N62} por vía intraperitoneal a ratones con obesidad inducida por la dieta con tres horas de diferencia. Se recogieron muestras de plasma y tejido tres horas después de la segunda dosis para las mediciones de metabolitos y el análisis de expresión génica. La concentración de glucosa en plasma fue significativamente menor en ratones tratados con GST-Nrg4^{N62} que en el control. Los niveles de insulina también tendieron a disminuir tras los tratamientos con GST-Nrg4^{N62} (Fig. 12), lo que sugiere que la capacidad de GST-Nrg4^{N62} para reducir la glucosa en la sangre estuvo mediada por mecanismos distintos de funcionar

como secretagogo de insulina. En este experimento a corto plazo, no se observaron efectos significativos de GST-Nrg4^{N62} en lípidos plasmáticos y hepáticos. Curiosamente, la expresión de las enzimas implicadas en la lipogénesis *de novo* se redujo significativamente por GST-Nrg4^{N62}, incluyendo SREBP1c y SCD1.

Ejemplo 5: Péptidos sintéticos de Nrg4

5 Para evaluar el potencial terapéutico de Nrg4 administrada exógenamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la enfermedad del hígado graso no alcohólico, se sintetiza el péptido Nrg4 correspondiente al dominio de tipo EGF (aa 1-52) de Nrg4. Se introduce la acetilación en N-terminal y la amidación en C-terminal para mejorar la estabilidad del péptido en circulación. La actividad biológica de este péptido se evalúa en células cultivadas y los estudios *in vivo* se realizan en condiciones de tratamiento agudo y crónico. Para experimentos agudos, el péptido se administra mediante
10 inyección i.p. a diferentes dosis y las concentraciones de metabolitos plasmáticos y hepáticos se miden después de las inyecciones. Estos estudios se realizan en modelos de ratones con obesidad inducida por dieta y genética. La expresión de genes hepáticos se analiza para investigar las vías metabólicas diana implicadas. Para tratamientos crónicos, el péptido se administra mediante inyecciones i.p. o sistema de bomba osmótica para lograr una administración constante y controlada. Los análisis metabólicos se realizan en diferentes puntos de tiempo después
15 del inicio de los tratamientos. Las propiedades farmacocinéticas se alteran para superar el aclaramiento rápido y/o la inactivación. Con este fin, se generan péptidos Nrg4 con modificación química de grupos acilo grasos (por ejemplo, palmitilación). Se ha demostrado que los péptidos acilados se asocian con la albúmina sérica y han mejorado mucho la semivida en circulación y la biodisponibilidad. También se generan modificaciones químicas adicionales, tales como PEGilación y glicosilación.

20 **Ejemplo 6: Nrg4 recombinante producida en células de mamífero**

Muchas terapias biológicas actualmente en uso clínico son proteínas recombinantes purificadas de líneas celulares de mamífero modificadas. Se construye un plásmido que produce Nrg4 como una proteína secretada marcada con polihistidina (His-Nrg4). Se generan líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de manera estable que secretan His-Nrg4 y purifican la Nrg4 recombinante usando una matriz de afinidad. Se espera que esta proteína recombinante contenga enlaces de glicosilación y disulfuro adecuados y tenga perfiles farmacocinéticos similares a los de la Nrg4 nativa. Las actividades biológicas de Nrg4 recombinante se evalúan en ratones. Además, se establece un protocolo para purificar la Nrg4 no marcada de las células CHO para la evaluación *in vivo* de sus efectos terapéuticos en la reducción de la glucosa en sangre y el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

30 **Ejemplo 7: Mapeo de aminoácidos importantes para la liberación del fragmento extracelular de Nrg4**

Para mapear los sitios de escisión extracelular de Nrg4, se generó un panel de mutantes de alanina en los aminoácidos 51-61, que se encuentran entre los dominios de tipo EGF y transmembrana. Para facilitar la detección, las proteínas Nrg4 de longitud completa de tipo salvaje y mutantes se fusionaron con el extremo C-terminal de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP). La escisión y la secreción de Nrg4 madura se detectan por la presencia de la proteína de fusión SEAP-Nrg4 en medios condicionados (CM) de células HEK293 transfectadas transitoriamente. El análisis de inmunotransferencia indicó que se había producido la proteína SEAP-Nrg4, administrado y era fácilmente detectable en CM a partir de células transfectadas (Fig. 14), indicativo de desprendimiento del dominio extracelular de Nrg4. Los mutantes con aa 53-54 (53-2A) o aa 53 (53-A) reemplazados por Alanina habían reducido notablemente los niveles de proteína de fusión SEAP-Nrg4 detectable en CM, a pesar de la expresión similar de proteínas precursoras en los lisados celulares totales. Por el contrario, los mutantes de alanina en los aminoácidos 51-52, 54, 55-57, 55-58, 58-59 o 60-61 tuvieron efectos modestos en la liberación de SEAP-Nrg4 en los medios de cultivo. Estos resultados ilustran que el aa 53 es crítico para la escisión de Nrg4 por las proteasas y su liberación al espacio extracelular.

Ejemplo 8: La deficiencia de Nrg4 produce obesidad severa, resistencia a la insulina, acumulación de grasa hepática e hiperlipidemia después de comer una dieta rica en grasas

45 Se llevaron a cabo estudios adicionales para determinar los efectos de una dieta rica en grasas en un sujeto con deficiencia de Nrg4.

Materiales y procedimientos

Estudios de composición corporal y jaula metabólica

50 Los ratones de tipo salvaje y defectivos en Nrg4 se alimentaron con comida estándar o dieta rica en grasas. La grasa corporal y la masa magra se midieron usando un analizador de RMN (Minispec LF90II, Bruker Optics). El consumo de oxígeno (VO₂), la actividad motora espontánea y la ingesta de alimentos se midieron utilizando el Comprehensive Laboratory Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments), un calorímetro de circuito abierto integrado equipado con un dispositivo de control de actividad del haz óptico. Los ratones se colocaron individualmente en las cámaras selladas (7,9" x 4" x 5") con libre acceso a alimentos y agua. El estudio se realizó en una sala de experimentación a 20-23 °C con ciclos de luz oscura de 12-12 horas (6:00 PM ~ 6:00 AM). Las mediciones se llevaron a cabo continuamente durante 72 horas. Durante este tiempo, a los animales se les proporcionó comida y agua a través de los dispositivos equipados de alimentación y bebida ubicados dentro de la cámara. La cantidad de alimento de cada

animal se controló a través de una balanza de precisión unida debajo de la cámara. El VO₂ en cada cámara se muestreó secuencialmente durante 5 segundos en intervalos de 10 minutos y la actividad motora se registró cada segundo en las dimensiones X y Z.

Mediciones metabólicas

5 Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Sigma) y ácido graso no esterificado (Wako Diagnostics) se midieron utilizando kits de análisis comerciales. El triglicérido hepático se extrajo y se midió como se ha descrito previamente. La insulina en plasma se midió usando un kit de ensayo ELISA (CrystalChem). Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa y la insulina.

10 Para definir en qué medida la insuficiencia de Nrg4 contribuye a la patogenia de los trastornos metabólicos, se midieron los parámetros metabólicos en ratones nulos de tipo salvaje (WT) y Nrg4 después de la alimentación con HFD (Research Diets, D 12492). Los ratones defectivos en Nrg4 nacieron con la proporción mendeliana esperada. Los ratones defectivos en Nrg2 demostraron similares ingesta de alimentos, nivel de actividad física y tasa de consumo de oxígeno, y ganó un peso corporal similar al del control cuando se alimentó con comida estándar (Fig. 16A). Después de la alimentación con HFD, los ratones nulos para nrg4 aumentaron un poco más de peso, acompañado de un aumento significativo de la adiposidad y un porcentaje reducido de masa corporal magra. Los niveles de triglicéridos plasmáticos (TAG) fueron mayores en ratones nulos para Nrg4 (Fig. 16B), mientras que las concentraciones de β -hidroxibutirato, un componente principal de los cuerpos cetónicos, fueron menores en el grupo de nulos (Fig. 16C). Debido a que los cuerpos cetónicos son productos de la β -oxidación de los ácidos grasos hepáticos, estos resultados son consistentes con la unión de Nrg4 a los hepatocitos. Estos resultados también demuestran un papel para la Nrg4 en la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos.

20 El contenido de grasa hepática se midió en ratones salvajes y defectivos para Nrg4 KN. Se descubrió que los ratones nrg4 nulos tenían una deposición elevada de triglicéridos en el hígado después de la alimentación con HFD (Fig. 17A). El contenido de grasa aumentó aproximadamente un 60 % en hígados de ratón nulos para nrg4. La evaluación histológica (tinción con H&E) reveló que los ratones nulos para Nrg4 desarrollaron esteatosis hepática más grave que el grupo de control después de la alimentación con HFD, mientras que la histología de los tejidos adiposos marrones y blancos parecía similar (Fig. 17B).

25 En comparación con el control, los niveles de glucosa en sangre en ayunas y de insulina en plasma con alimentación se elevaron en el grupo defectivo (Fig. 18A). Además, la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) y la prueba de tolerancia a la insulina (ITT) revelaron que los ratones nulos para Nrg4 desarrollaron intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina más graves que los ratones control (Fig. 18B y C). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que Nrg4 desempeña un papel protector en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, particularmente en estados de estrés metabólico, tal como la obesidad inducida por alto contenido de grasa.

30 Estos estudios demuestran que la pérdida de señalización de Nrg4 exacerba la regulación alterada metabólica inducida por la dieta, particularmente el control glucémico, la progresión del hígado graso y la homeostasis de triglicéridos plasmáticos.

Ejemplo 9: Nrg4 inhibe la inducción de un programa de genes lipogénicos en el hígado

Este ejemplo demuestra que Nrg4 señala a través de la atenuación de la expresión de genes lipogénicos en el hígado. Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que esta regulación negativa de la lipogénesis hepática probablemente subyace a los efectos metabólicos beneficiosos de Nrg4.

40 Materiales y procedimientos

Análisis de inmunotransferencia

45 Los lisados hepáticos totales se prepararon homogeneizando hígados en un tampón de lisis que contenía Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, NaF 5 mM, β -glicerofosfato 25 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, glicerol al 10 %, TritonX-100 al 1 %, ditiotreitol (DTT) 1 mM e inhibidores de proteasa recién añadidos. También se prepararon extractos nucleares de hígado. En resumen, los hígados congelados se homogeneizaron usando un homogeneizador Dounce en tampón de homogeneización helado que contenía 0,6 % de NP40, NaCl 150 mM, HEPES 10 mM (pH= 7,9), EDTA 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa. Los homogeneizados se centrifugaron brevemente a 450 rpm a 4 °C para eliminar los restos de tejido. La suspensión se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El núcleo del sedimento se lavó con tampón de homogeneización y se resuspendió en un tampón bajo en sal que contenía Tris 20 mM (pH = 7,5), glicerol al 25 %, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 200 μ M, KCl 20 mM e inhibidores de proteasa. Las proteínas nucleares se extrajeron después de la adición de un tampón con niveles altos de sal (volumen \ominus) que contenía Tris 20 mM (pH = 7,5), MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 200 μ M, KCl 1,2M e inhibidores de proteasa a 4 °C durante 2 horas. Los experimentos de inmunotransferencia se realizaron utilizando anticuerpos específicos contra SREBP1 y ChrebP (Santa Cruz Biotechnology), tubulina (Sigma) y Lamina A/C, fosfo-ErbB4 y ErbB4 total, fosfo-AKT (S473) y AKT total, fósforo-AMPK (Thr172) y AMPK total (señalización celular).

Aislamiento y tratamiento de hepatocitos

5 Los hepatocitos primarios se aislaron utilizando colagenasa de tipo II (Invitrogen, Carlsbad, CA) de ratones C57BL/6J. Los hepatocitos se mantuvieron en medio DMEM que contenía BGS al 10 % a 37 °C y CO₂ al 5 %. La infección por adenovirus se realizó el mismo día de aislamiento. Después de 24 horas, las células se trataron con GST y GST-Nrg4Ex (10 µg/ml) con vehículo (DMSO) o T0901317 (5 µmol/l) durante 24 horas. Para señalizar, las células se cambiaron a DMEM suplementado con 0,1 % de BSA durante 12 horas antes del tratamiento con GST y GST-Nrg4Ex. Los adenovirus recombinantes se generaron usando el vector adenoviral AdEasy (Stratagene, Santa Clara, CA) como se ha descrito anteriormente (Li y col., Cell Metabolism 8: 105-117, 2008).

Resultados

10 Habiendo establecido que el hígado es un tejido metabólico principal dirigido por Nrg4, se llevaron a cabo experimentos para determinar los mecanismos a través de los cuales Nrg4 modula el metabolismo hepático. El análisis de expresión génica indicó que los niveles de ARNm de varios reguladores transcripcionales del metabolismo hepático, incluyendo PGC-1, PGC-1, ChREBP y SREBP2, fueron similares entre el control y los hígados defectivos (Fig.19A). Por el contrario, la expresión de ARNm de SREBP1c, un regulador clave de la lipogénesis *de novo* y la síntesis de triglicéridos, se indujo significativamente en hígados de ratón defectivos en Nrg4. De manera importante, los niveles 15 de proteína del SREBP1 precursor (pSREBP1) y la isoforma de SREBP1 escindida y transcripcionalmente activa en el núcleo (nSREBP1) también se elevaron (Fig. 19B). Los niveles de fosfo-AMPK y fosfo-AKT (S473), un sustrato del complejo mTOR 2, fueron similares entre los hígados SV y DEF.

20 Los análisis cuantitativos de PCR indicaron que la expresión de ARNm de varios genes diana SREBP1 conocidos implicados en la lipogénesis, incluyendo glucosa quinasa (Gck), acetil-CoA carboxilasa 1 (Acc1), enzima mérica citosólica (Me1), ácido graso sintasa (Fasn), estearoil-CoA desaturasa 1 (Scd1) y glicerol quinasa (Gyk), fue significativamente mayor en los hígados de ratones nulos para Nrg4 que en los ratones control (Fig. 19A). La expresión de Fsp27, una proteína de gota lipídica asociada con esteatosis hepática, también fue elevada. Por el contrario, la expresión de genes implicados en la oxidación β-oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y el metabolismo 25 oxidativo mitocondrial fueron comparables entre dos grupos.

25 25 Sin quedar ligados a teoría alguna, la activación aberrante de la lipogénesis en hígados de ratón nulos para nrg4 puede ser el resultado de los efectos directos de la señalización de nrg4 en el programa del gen lipogénico. Alternativamente, es posible que la adiposidad aumentada, aunque moderada, puede contribuir a la alteración del metabolismo de los lípidos hepáticos en ratones nulos para nrg4. Para distinguir estas dos posibilidades, se examinaron los efectos de Nrg4 sobre la expresión de genes lipogénicos en hepatocitos primarios. Los hepatocitos cultivados se trataron con vehículo (DMSO) o T0901317, un agonista para el receptor X del hígado que estimula de manera potente la expresión 30 de genes lipogénicos y Srebp1c, en presencia de CM que contiene SEAP o SEAP-Nrg4N62. Mientras que la expresión basal de Srebp1c, Fasn y Scd1 fue comparable, su inducción en respuesta a la activación de LXR disminuyó significativamente por SEAP-Nrg4N62 (Fig. 20).

35 **Ejemplo 10: La expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos mejora la regulación metabólica alterada inducida por la dieta**

Este ejemplo demuestra que elevar los niveles de Nrg4 proporciona efectos beneficiosos para la regulación de la glucosa en sangre y reduce la gravedad de la enfermedad del hígado graso.

40 Como se ha descrito anteriormente, la expresión de adipocitos Nrg4 disminuyó significativamente en la obesidad inducida por la dieta y genética en ratones. Como tal, la sobreexpresión transgénica de Nrg4 en los tejidos adiposos puede normalizar o rescatar el deterioro de la homeostasis metabólica inducida por la obesidad. Además, La administración de la proteína Nrg4 recombinante puede proporcionar beneficios terapéuticos en el tratamiento de la hiperglucemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico e hiperlipidemia. Para probar estas posibilidades, se generaron ratones transgénicos con Nrg4 específico de grasa bajo el control del promotor/potenciador aP2, que ha sido ampliamente utilizado en la dirección de la expresión transgénica de genes en adipocitos. Se generaron cinco 45 fundadores transgénicos independientes con varios niveles de expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos marrones y blancos. Se eligió una línea particular (designada internamente como n.º 111) para estudios adicionales porque el transgén Nrg4 se expresó específicamente en tejidos adiposos a niveles ligeramente superiores a la expresión de Nrg4 en ratones delgados. Los ratones transgénicos AP2-Nrg4 no se distinguían de los compañeros de camada no transgénicos con respecto al crecimiento posnatal, el aspecto físico y las características generales de comportamiento.

50 Para determinar si la expresión transgénica de Nrg4 protege a los ratones de los trastornos metabólicos inducidos por la dieta, ratones control y transgénicos fueron alimentados con una HFD. El grupo transgénico ganó un poco menos de peso que el grupo de control después de 11 semanas de alimentación con HFD (Fig. 21A). Los análisis de composición corporal revelaron que el porcentaje de masa grasa se redujo en el grupo transgénico, mientras que el porcentaje de masa magra se mantuvo en gran medida similar (Fig. 21B). El metabolismo energético de todo el cuerpo se midió después utilizando un Sistema Integral de Control de Animales de Laboratorio (CLAMS). Mientras que los ratones control y transgénicos tenían una ingesta de alimentos similar, los ratones transgénicos exhibieron una tasa 55 de consumo de oxígeno (VO₂) significativamente elevada como normalizada al peso corporal o la masa corporal magra (Fig. 21C). Los ratones transgénicos también parecían haber aumentado los niveles de actividad locomotora

según lo monitorizado por un dispositivo de rotura de microesferas infrarrojo. Los ratones transgénicos tenían concentraciones plasmáticas de TAG más bajas y niveles más altos de cetonas después del hambre durante la noche (Fig. 22A), lo que sugiere que la oxidación hepática de ácidos grasos y la cetogénesis podrían aumentarse mediante la expresión transgénica de Nrg4. Los niveles de colesterol total también fueron más bajos en el grupo transgénico.

- 5 En contraste con la deficiencia de Nrg4, los ratones transgénicos Nrg4 tenían niveles de glucosa en sangre más bajos que el control en condiciones de alimentación y ayuno (Fig. 22B). El nivel de insulina en plasma en ayunas también fue menor en el grupo transgénico. La prueba de tolerancia a la glucosa indica que los ratones transgénicos Nrg4 habían mejorado la tolerancia a la glucosa después de la exposición intraperitoneal de glucosa (2 mg/kg) (Fig. 23A). De acuerdo con el metabolismo de glucosa mejorado, los ratones transgénicos fueron más sensibles a la insulina en las pruebas de tolerancia a la insulina (Fig. 23B). Los análisis histológicos indicaron que los ratones transgénicos desarrollaron esteatosis hepática menos grave (Fig. 24A), mientras que la histología del tejido adiposo fue similar entre dos grupos. Sistemáticamente, el contenido de triglicéridos en el hígado se redujo en el grupo transgénico (Fig. 24B).
- 10

15 Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo para investigar las vías metabólicas posteriores que respondieron a la elevación transgénica de Nrg4. Los niveles de ARNm y proteína SREBP1c disminuyeron significativamente en los hígados de ratones transgénicos (Fig. 24C y D). Los niveles de expresión de genes hepáticos lipogénicos, incluyendo Gck, Acl, Acc1, Me1, Fasn y Scd1, en consecuencia se atenuaron en respuesta a la expresión transgénica de Nrg4 en tejidos adiposos. La expresión de ARNm de Fsp27 también se redujo notablemente. Tomados en conjunto, estos estudios proporcionan evidencia genética de que elevar los niveles de Nrg4 produce efectos deseables sobre los niveles de glucosa y lípidos en la sangre, y proporciona evidencia de que la sobreexpresión de Nrg4 puede ser beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

20

Ejemplo 11: Fragmentos recombinantes de Nrg4

Para evaluar el potencial terapéutico de Nrg4 administrada exógenamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la enfermedad del hígado graso no alcohólico, se generó un vector que expresa la proteína Nrg4 recombinante (GST-Nrg4) usando un huésped bacteriano. Se realizaron estudios de prueba de principio para evaluar los posibles efectos terapéuticos de la proteína Nrg4 recombinante. La proteína de fusión GST-Nrg4 y GST se expresaron y purificaron a partir de bacterias que contenían vectores de expresión relevantes. Se administraron dos dosis de GST o GST-Nrg4 al día por vía intraperitoneal a ratones con obesidad inducida por la dieta durante 5 días consecutivos. Se recogieron muestras de plasma y tejido dos horas después de la última inyección para mediciones de metabolitos y análisis de expresión génica. Las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina fueron más bajas en ratones tratados con GST-Nrg4 que en el control (Fig. 25). Sin quedar ligados a teoría alguna, estos resultados indican que la capacidad de GST-Nrg4 para reducir la glucosa en la sangre está mediada por mecanismos distintos de funcionar como secretagogo de insulina. La expresión de las enzimas implicadas en la lipogénesis *de novo* se redujo significativamente por GST-Nrg4, incluyendo enzima málica 1 (ME1) y estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1).

Referencias:

- 35 Cohen, J.C., Horton, J.D. y Hobbs, H.H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519-1523 (2011).
- James, O. y Day, C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 353, 1634-1636 (1999).
- 40 Jornayaz, F.R., Samuel, V.T. y Shulman, G.I. The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr* 30, 273-290 (2010).
- Szczepaniak, L.S., y col. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E462-468 (2005).
- Browning, J.D., y col. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387-1395 (2004).
- 45 Loomba, R., Sirlin, C.B., Schwimmer, J.B. y Lavine, J.E. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 50, 1282-1293 (2009).
- Chitturi, S., y col. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35, 373-379 (2002).
- 50 Schneider, M.R. y Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology* 218, 460-466 (2009).
- Burgess, A.W. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth factors* 26, 263-274 (2008).
- Falls, D.L. Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *Journal of neurocytology* 32, 619-647 (2003).

- Reiss, K. y Saftig, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 126-137 (2009).
- 5 Blobel, C.P., Carpenter, G. y Freeman, M. The role of protease activity in ErbB biology. *Experimental cell research* 315, 671-682 (2009).
- Tang, C.S., y col. Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3. *genética* 8, e1002687 (2012).
- 10 Stefansson, H., y col. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics* 71, 877-892 (2002).
- Hayes, N.V., Newsam, R. J., Baines, A.J. y Gullick, W.J. Characterization of the cell membrane-associated products of the Neuregulin 4 gene. *Oncogene* 27, 715-720 (2008).
- 15 Harari, D., y col. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681-2689 (1999).
- Falls, D.L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental cell research* 284, 14-30 (2003).
- Dunn, M., y col. Co-expression of neuregulins 1,2, 3 and 4 in human breast cancer. *The Journal of pathology* 203, 672-680 (2004).
- 15 Hayes, N.V., y col. Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 3147-3155 (2007).
- Ebi, M., y col. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma. *Molecular medicine reports* 4, 1151-1155 (2011).
- 20 Muller, H., Dai, G. y Soares, M.J. Placental lactogen-I (PL-I) target tissues identified with an alkaline phosphatase-PL-I fusion protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 46, 737-743 (1998).
- Lin, J. y Linzer, D.I. Induction of megakaryocyte differentiation by a novel pregnancy-specific hormone. *The Journal of biological chemistry* 274, 21485-21489 (1999).
- 25 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> LIN, y col.
- <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE TRASTORNOS METABÓLICOS
- <130> 30275/46768A
- <140> 61/804,046
- 30 <141> 21/03/2013
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 115
- 35 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 751 391 T3

Met Pro Thr Asp His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe
1 5 10 15

Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro
20 25 30

Phe Cys Arg Cys Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val
35 40 45

Phe Leu Pro Gly Ser Ser Ile Gln Thr Lys Ser Asn Leu Phe Glu Ala
50 55 60

Phe Val Ala Leu Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Ile Gly Ala Phe Tyr
65 70 75 80

Phe Leu Cys Arg Lys Gly His Phe Gln Arg Ala Ser Ser Val Gln Tyr
85 90 95

Asp Ile Asn Leu Val Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ala His His Ser His
100 105 110

Glu Gln His
115

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Pro Thr Asp His Glu Gln Pro Cys Gly Pro Arg His Arg Ser Phe
 1 5 10 15

Cys Leu Asn Gly Gly Ile Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro
 20 25 30

Phe Cys Arg Cys Ile Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val
 35 40 45

Phe Leu Pro Ser Ser Ser Ile Pro Ser Glu Ser Asn Leu Ser Ala Ala
 50 55 60

Phe Val Val Leu Ala Val Leu Leu Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Cys
 65 70 75 80

Phe Leu Cys Arg Lys Gly His Leu Gln Arg Ala Ser Ser Val Gln Cys
 85 90 95

Glu Ile Ser Leu Val Glu Thr Asn Asn Thr Arg Thr Arg His Ser His
 100 105 110

Arg Glu His
 115

5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

15 <400> 3
 cccagcccat tctgttaggtg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

25 <400> 4
 accacgaaag ctgccgacag 20
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> 5' 6-FAM

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

5 <223> 3' BHQ

<400> 5

cgagcacgc tgcgaaggagg tt

22

REIVINDICACIONES

1. Una proteína Neuregulina (Nrg4) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1-62 de la SEQ ID NO:1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y cirrosis.
2. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína Nrg4, la variante de Nrg4 o el fragmento biológicamente activo de la misma, se administra conjuntamente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente hipolipemiante.
3. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente hipolipemiante se selecciona del grupo que consiste en atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, ezetimiba, niacina, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo y fenofibrato.
4. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicho trastorno metabólico es NAFLD.
5. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicho trastorno metabólico es esteatohepatitis.
6. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicho trastorno metabólico es cirrosis.
7. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicha variante de Nrg4 comprende al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de longitud completa expuesta en la SEQ ID NO:1.
8. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicho fragmento biológicamente activo comprende los restos 1-52 o 1-62 de la SEQ ID NO:1.
9. La proteína Nrg4, variante de Nrg4 o fragmento biológicamente activo de la misma como se define en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que dicha proteína Nrg4 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1.
10. Un procedimiento para diagnosticar un trastorno metabólico o la susceptibilidad a un trastorno metabólico, en el que el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y cirrosis en un sujeto que comprende la etapa de determinar un nivel de una proteína neuregulina 4 (Nrg4), que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o una variante de Nrg4 que comprende al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en una muestra del sujeto, en el que el nivel que se reduce en el sujeto en comparación con el nivel en un sujeto normal sugiere el trastorno metabólico o indica susceptibilidad al trastorno metabólico, y en el que se sabe que el sujeto normal no sufre el trastorno metabólico.
11. Un procedimiento para determinar la progresión de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y trastorno metabólico por cirrosis en un sujeto que comprende la etapa de determinar el nivel de una proteína neuregulina 4 (Nrg4) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en muestras del sujeto en el tiempo, en el que una disminución en el nivel de la proteína Nrg4, variante, o el fragmento biológicamente activo de la misma a lo largo del tiempo, sugiere la progresión del trastorno metabólico.
12. Un procedimiento para monitorizar la efectividad del tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis y trastorno metabólico por cirrosis en un sujeto que comprende la etapa de determinar el nivel de una proteína neuregulina 4 (Nrg4) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, una variante de Nrg4 que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológico activo de la misma que comprende los restos 1-46, 1-55, 1-52, 1-53 o 1 -62 de la SEQ ID NO:1 en muestras del sujeto en el tiempo, en el que un aumento en el nivel de la proteína Nrg4, variante o el fragmento biológico activo de la misma a lo largo del tiempo sugiere un tratamiento efectivo.

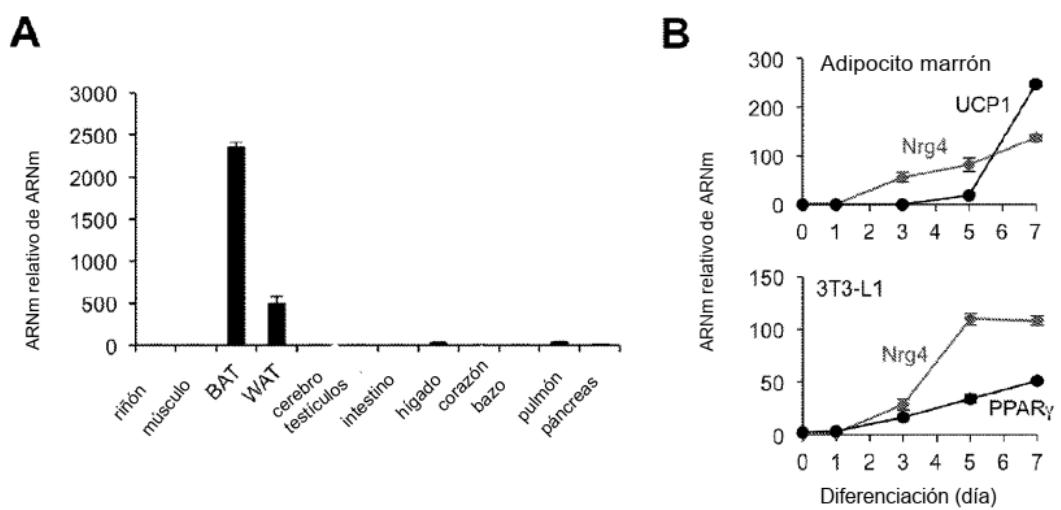
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el trastorno metabólico es NAFLD.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el trastorno metabólico es esteatohepatitis.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dicho trastorno metabólico es cirrosis.

ES 2 751 391 T3

		9-23	17-34	36-45	
humano	1	MPTDHEEPCGSPHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCEEVFLPGSSIOTKSN			60
		NPTDHE+PCGP H+SFCLNGG+CYVIPTIPSPFCRC+ENYTGARCEEVFLP SSI ++SN			
ratón	1	MPTDHEQPCGPRHRSFCLNGGICYVIPTIPSPFCRCIENYTGARCEEVFLPSSSIPSESN			60
humano	61	LFEAFVALAVLVTLLIIGAFYFLCRKGHQRASSVQYDINLVETSSSAHHHSHEQH			115
		L AFV LAVL+TL I A FLCRKGH QRASSVQ +I+LVET++T HSH +H			
ratón	61	LSAAFVVLAVLLTIAALCFLCRKGHLQRASSVQCEISLVETNNTRHSHREH			115
		TM			

NYT: Sitio de glicosilación unida a N predicho
C-C: Puentes disulfuro predichos

FIGURA 1

**FIGURA 2**

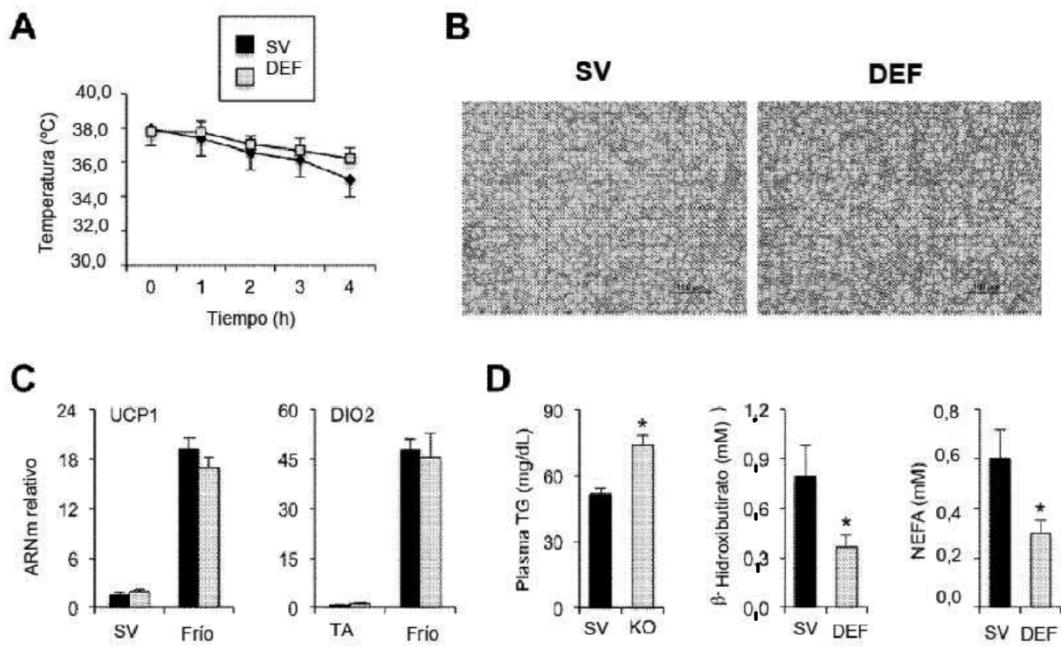
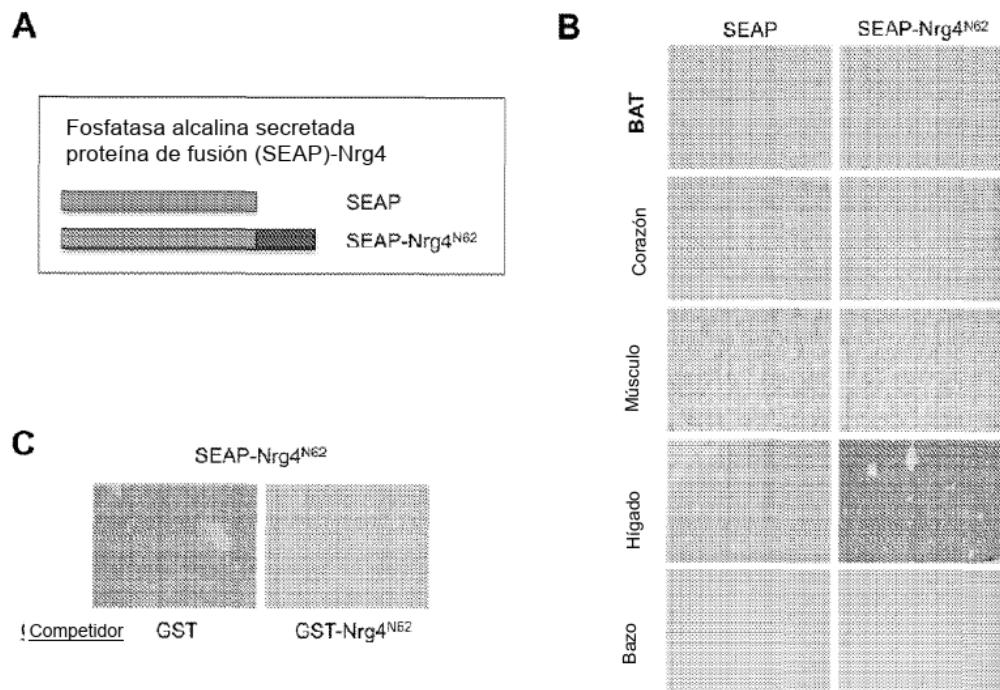
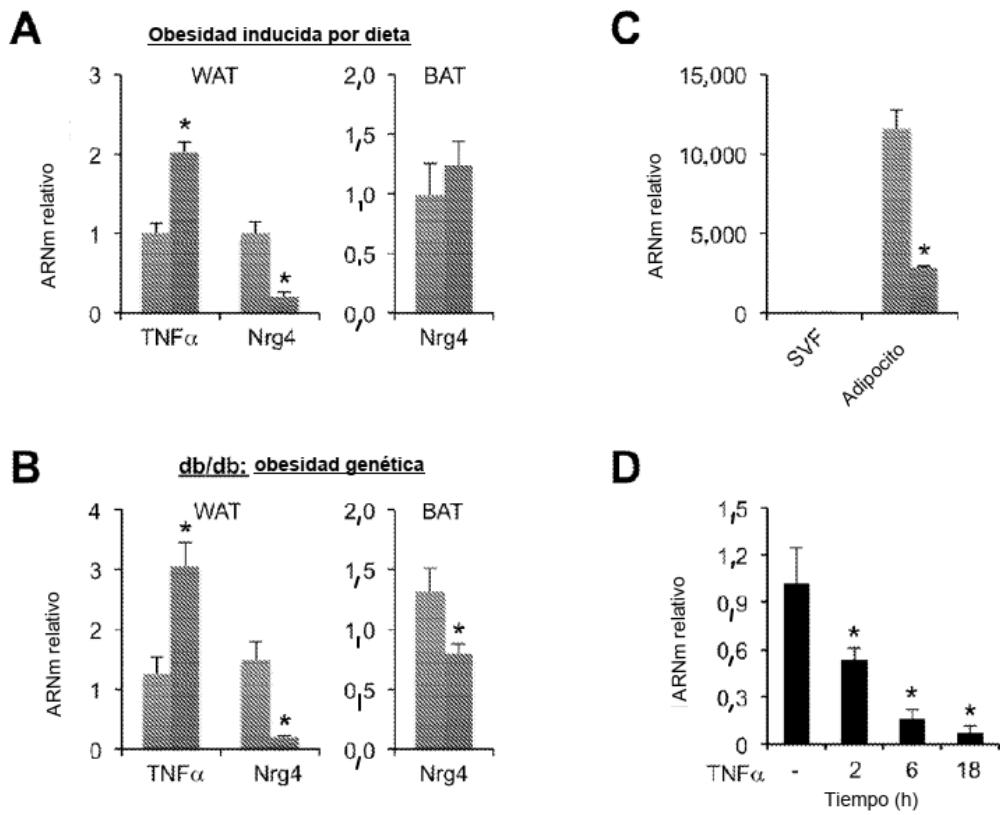


FIGURA 3

**FIGURA 4**

**FIGURA 5**

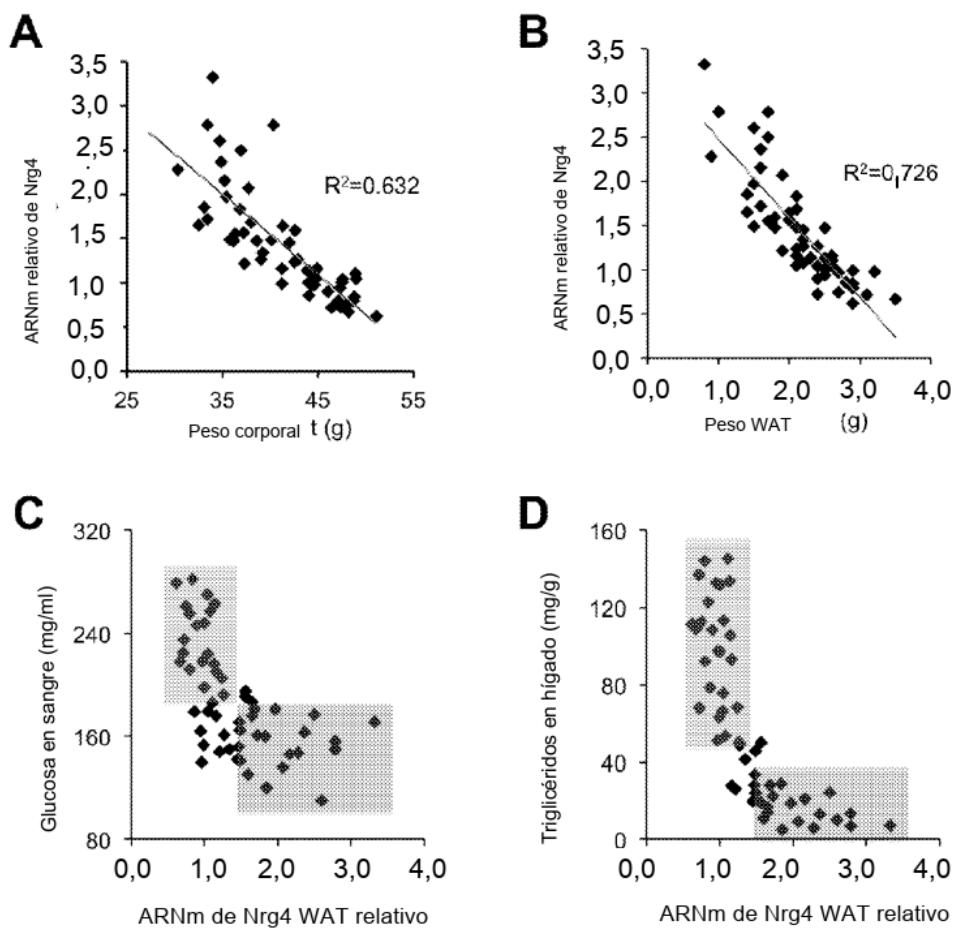


FIGURA 6

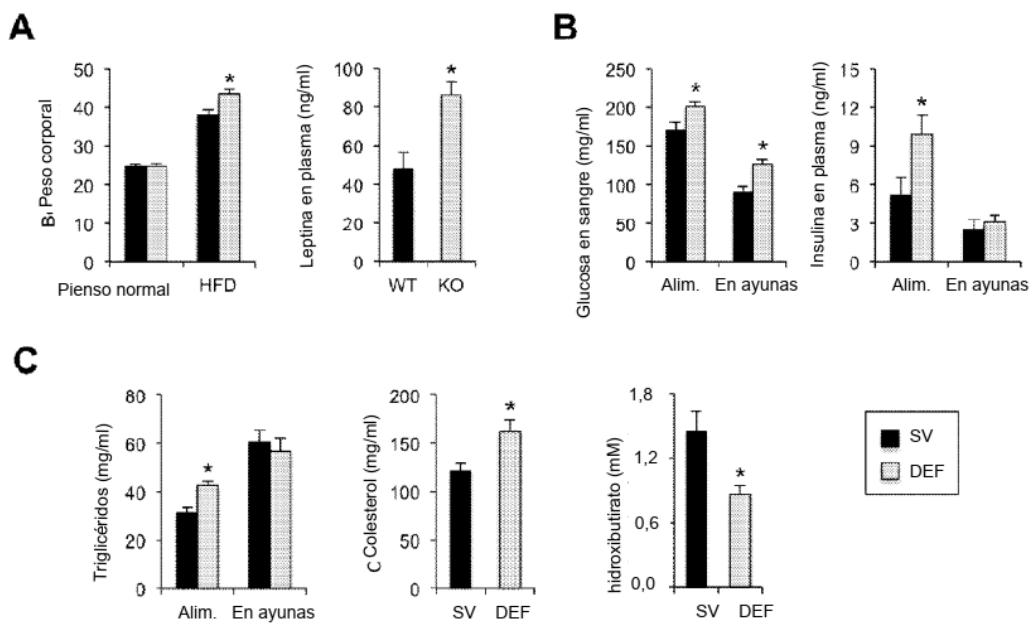


FIGURA 7

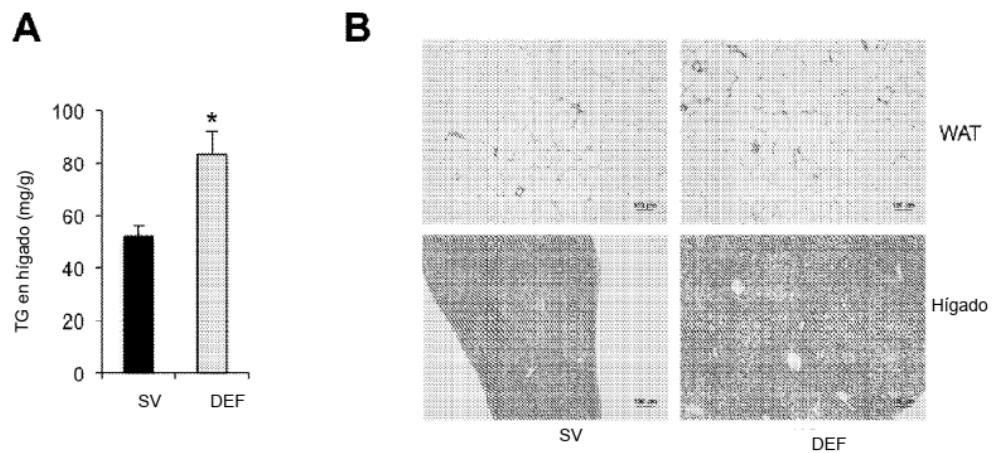


FIGURA 8

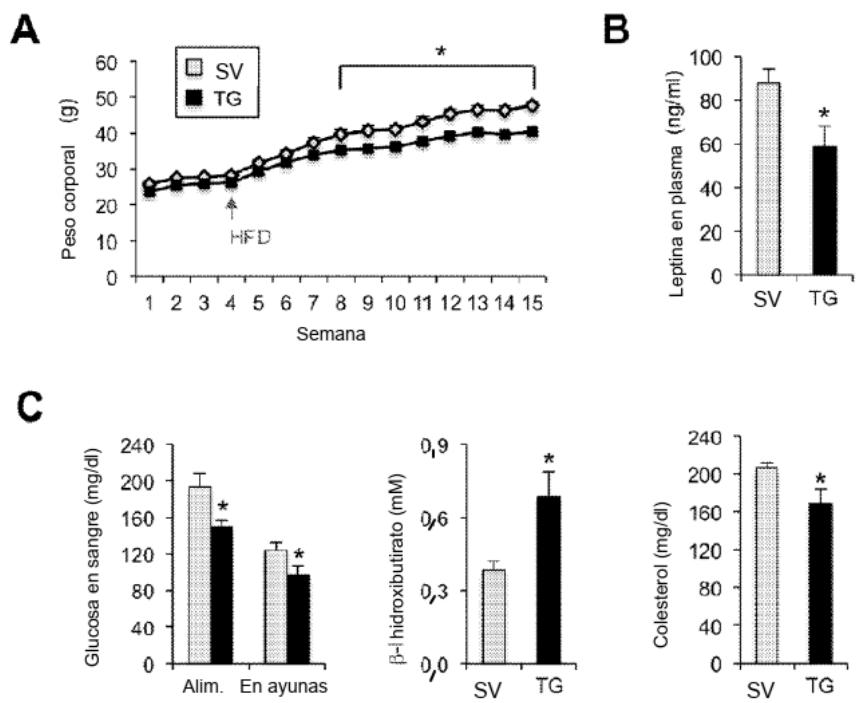
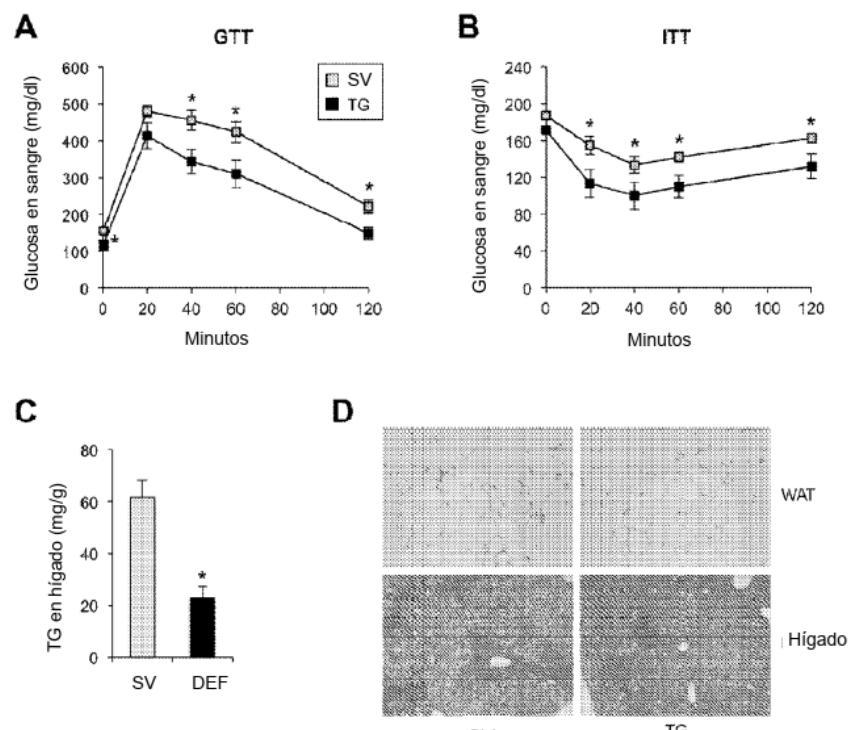
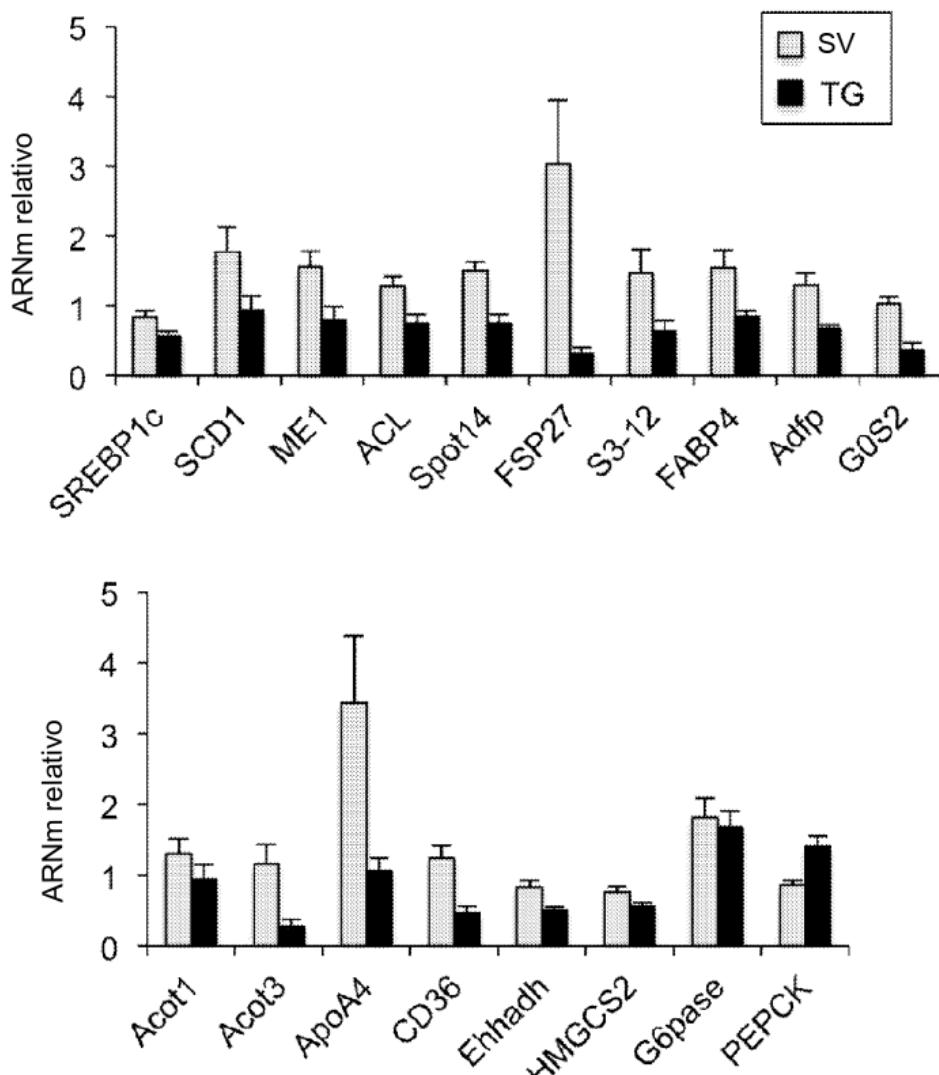


FIGURA 9

**FIGURA 10**



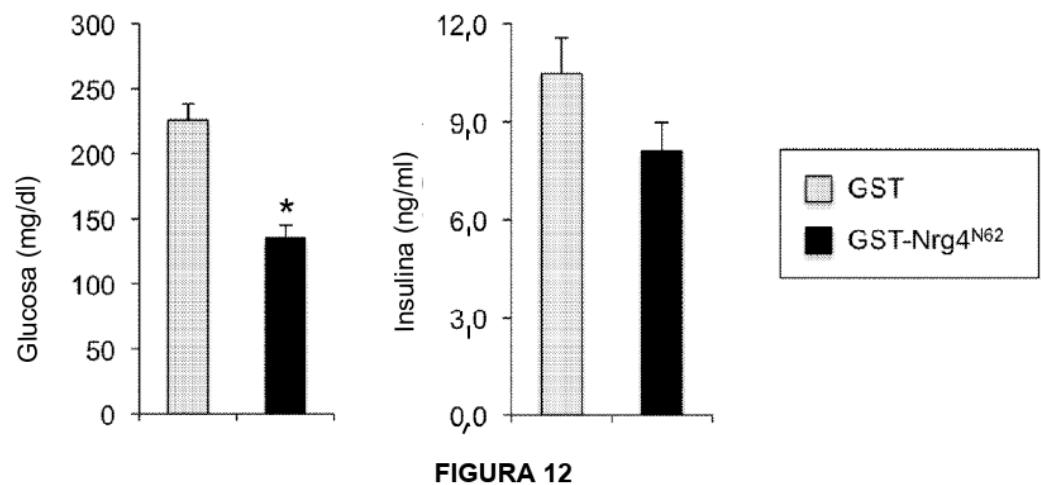


FIGURA 12

Tejidos adiposos

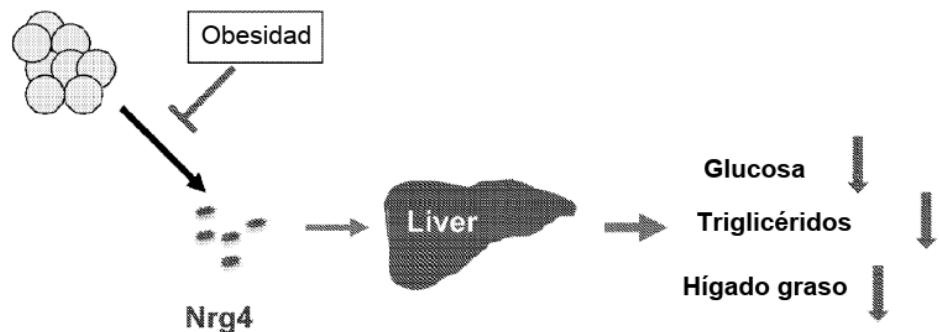


FIGURA 13

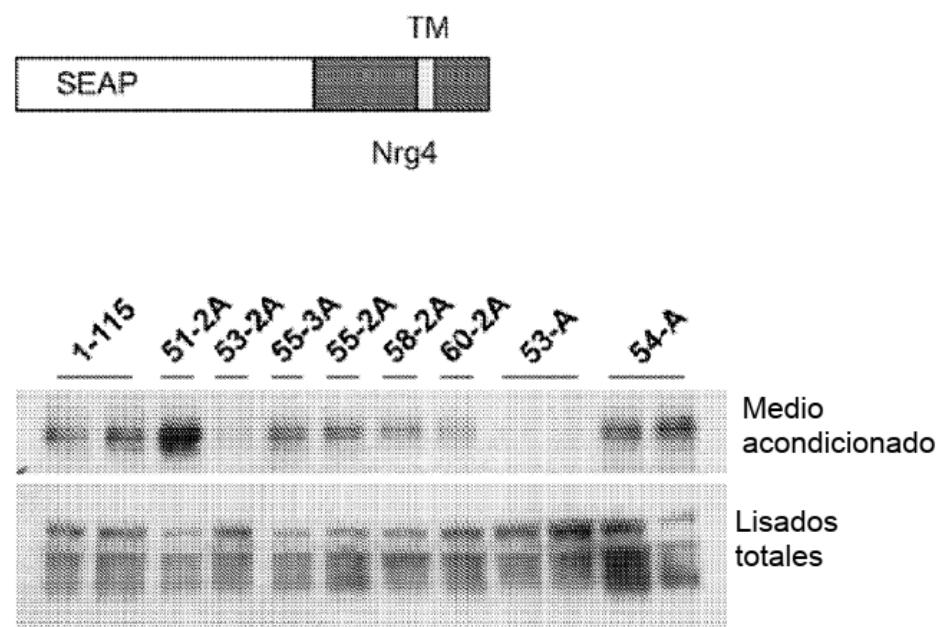


FIGURA 14

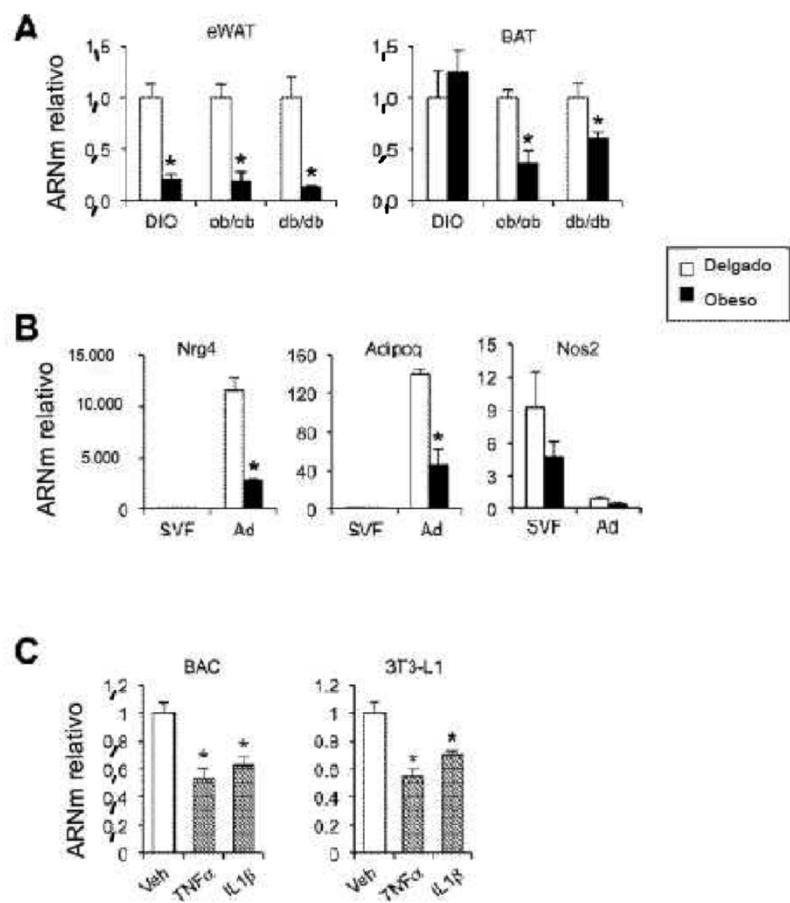


FIGURA 15

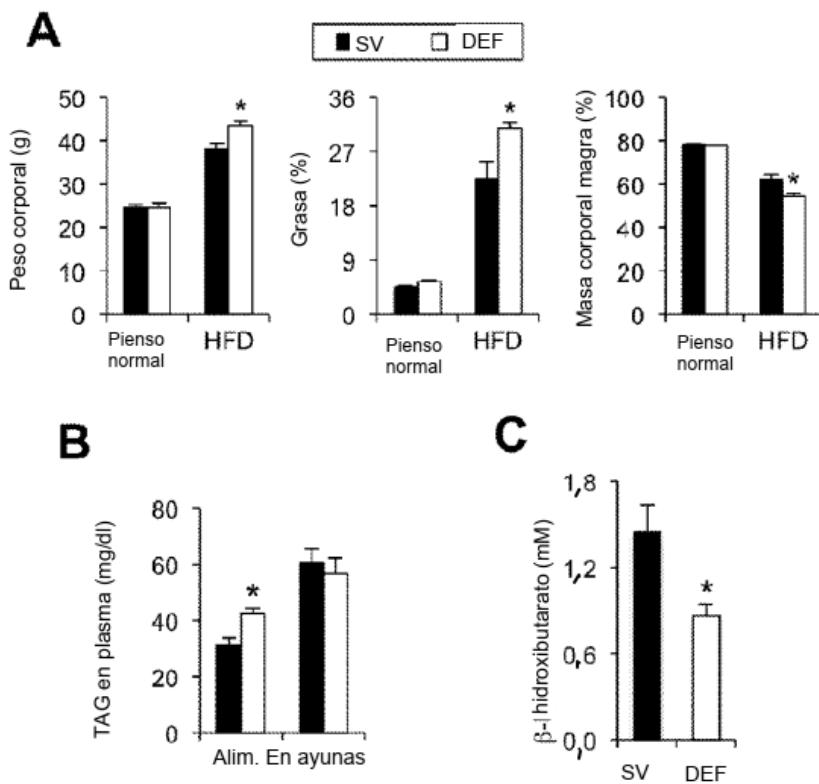


FIGURA 16

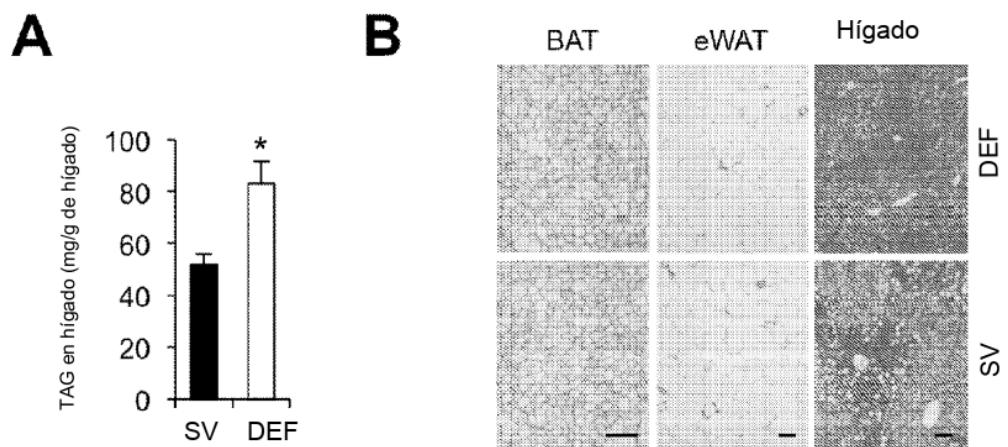


FIGURA 17

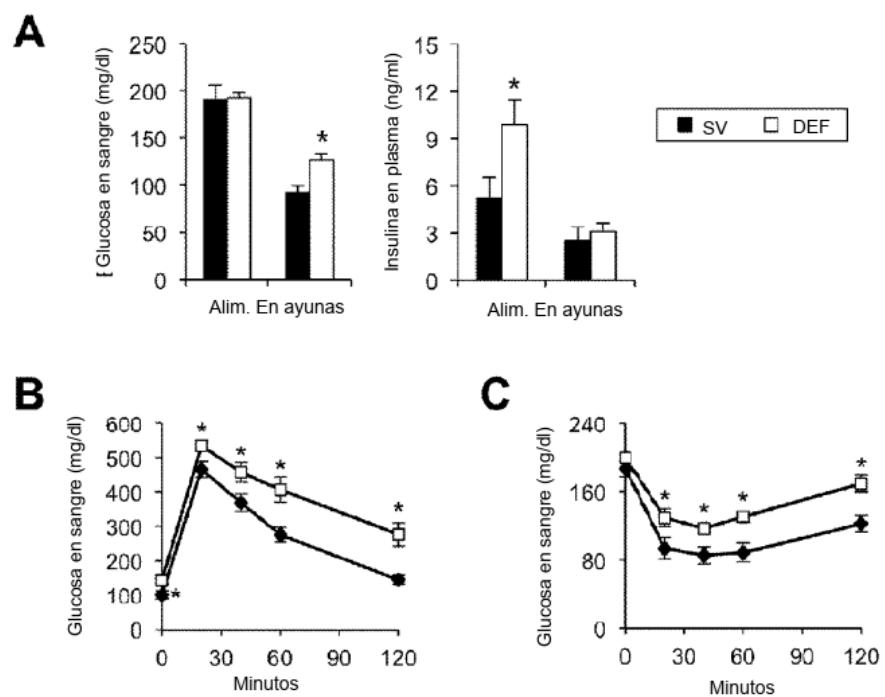


FIGURA 18

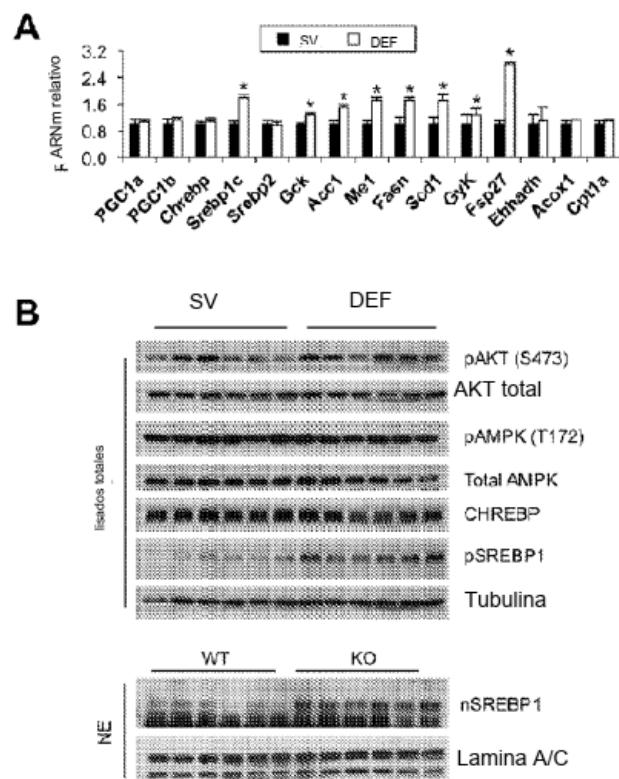
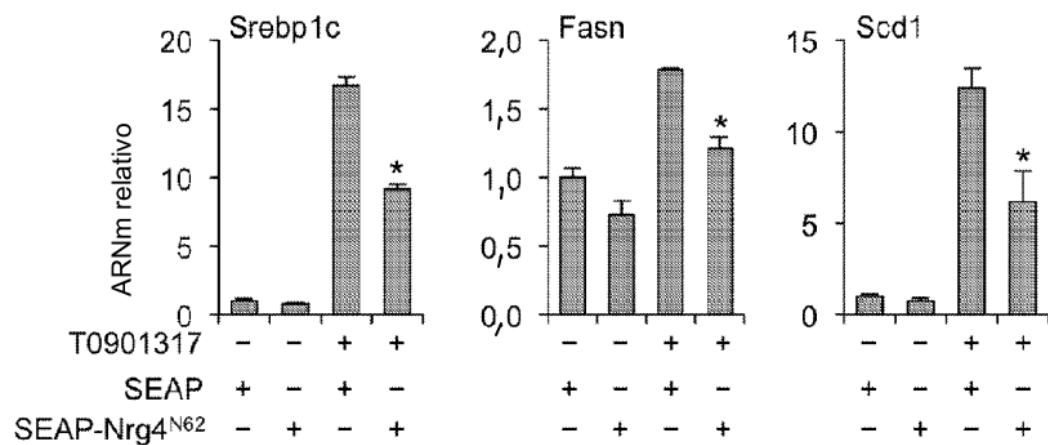


FIGURA 19



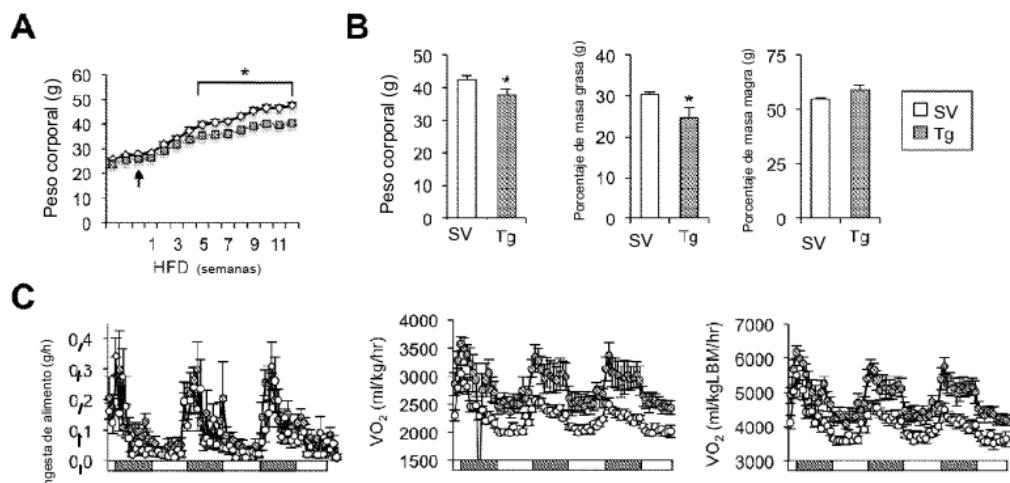


FIGURA 21

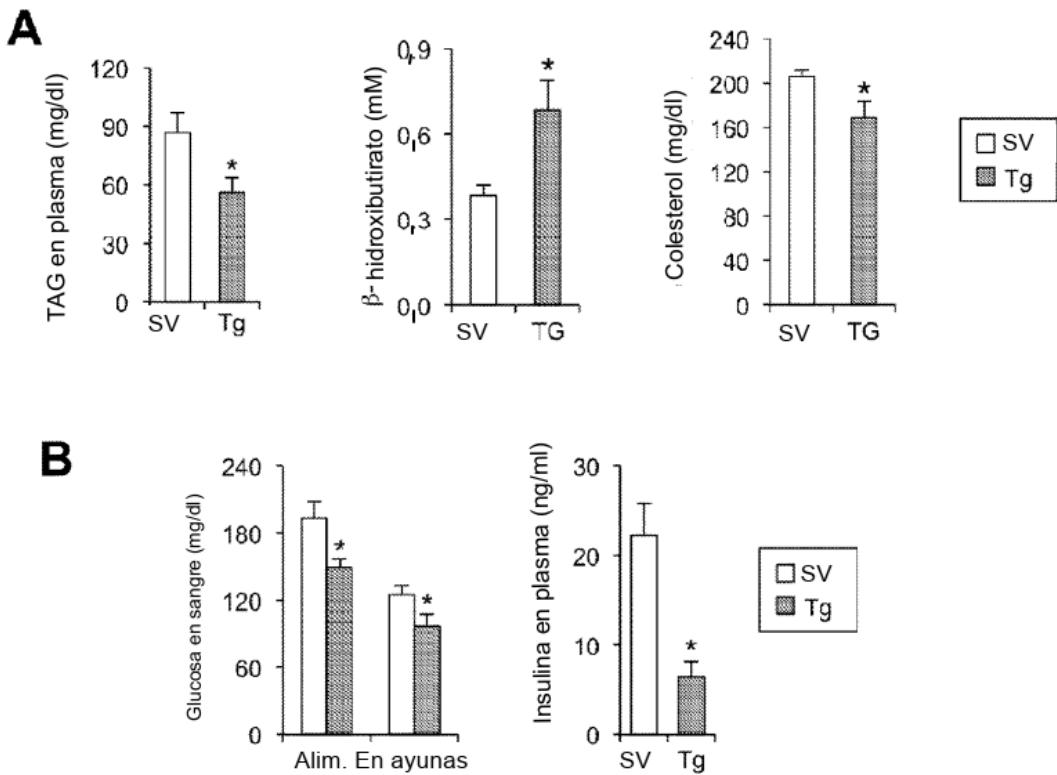


FIGURA 22

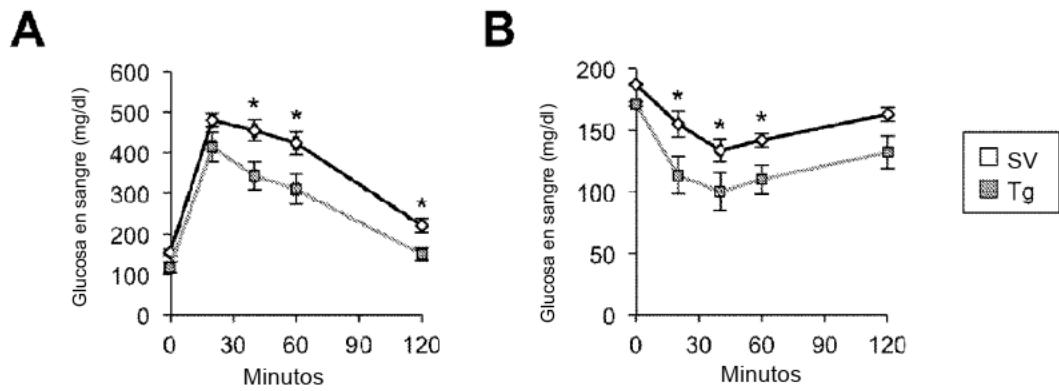


FIGURA 23

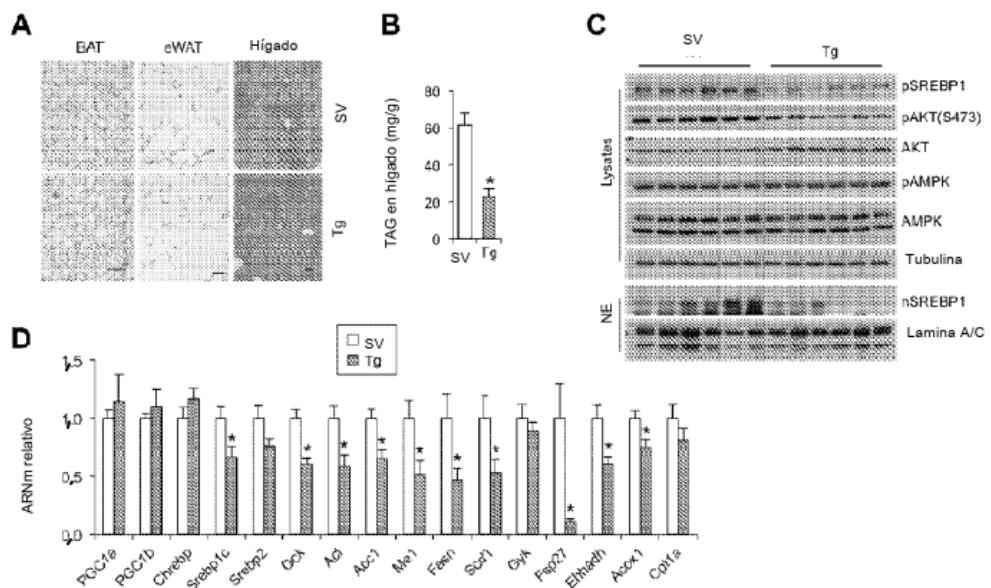


FIGURA 24

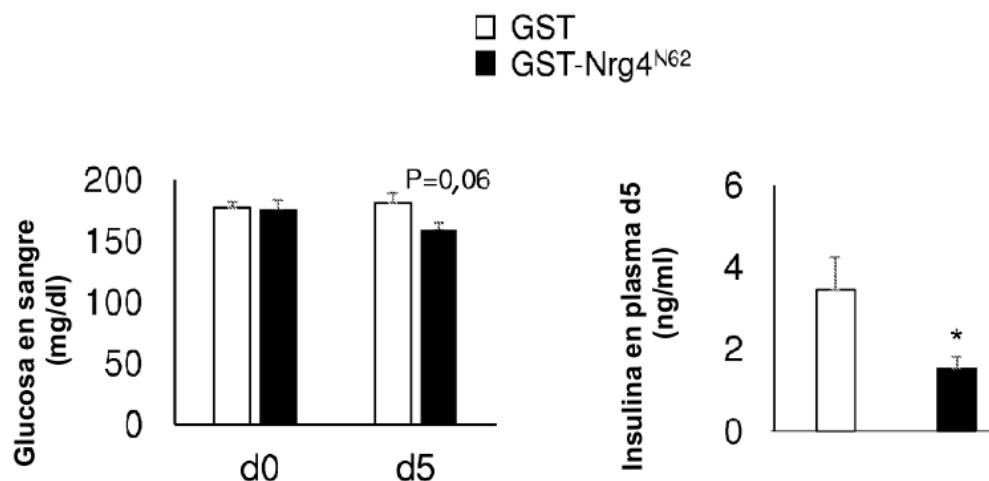


FIGURA 25