

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 620**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2020** **PCT/US2020/041496**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2021** **WO21007473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2020** **E 20747295 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3914720**

54 Título: **VgII4 con elemento regulador CIS de UCP-1 y método de uso del mismo**

30 Prioridad:

10.07.2019 US 201962872624 P

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

14.09.2023

73 Titular/es:

**MASONIC MEDICAL RESEARCH LABORATORY
(100.0%)**

**2150 Bleeker St.
Utica, NY 13501, US**

72 Inventor/es:

LIN, ZHIQIANG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 948 620 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

Vgll4 con elemento regulador CIS de UCP-1 y método de uso del mismo

5 DECLARACIÓN DE DERECHOS DEL GOBIERNO

[0001] Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el número de subvención HL138454 otorgado por el National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 ANTECEDENTES

[0002] La obesidad es una epidemia mundial que asola a la sociedad humana, amenazando la salud tanto de adultos como de niños. Se necesitan con urgencia terapias farmacológicas eficaces para la obesidad. Las patologías relacionadas con la obesidad incluyen, entre otras, la diabetes y enfermedad hepática. El crecimiento excesivo de tejido adiposo es la raíz de la obesidad, con efectos nocivos para la salud. El tejido adiposo está compuesto por tejido adiposo blanco y marrón (BAT). El tejido adiposo blanco (WAT) almacena triglicéridos en los adipocitos, y el BAT quema triglicéridos y glucosa para generar calor. El desarrollo de la obesidad depende no solo del equilibrio entre la ingesta de alimentos y la utilización de calorías, sino también del equilibrio entre BAT y WAT. Un BAT más alto se correlaciona con la delgadez en los adultos y un mayor volumen muscular en los niños, lo que indica que el BAT funcional beneficia tanto la homeostasis energética como el crecimiento muscular. En humanos, el BAT es abundante en bebés y disminuye con la edad. Recientemente, el descubrimiento de BAT funcional en individuos adultos planteó la posibilidad de tratar la obesidad mediante la activación de BAT. Sin embargo, faltan composiciones y métodos para aumentar el BAT. La presente divulgación está dirigida a superar estas y otras deficiencias en la técnica.

[0003] La WO2018/215613, a nombre de la Univ Barcelona Autónoma, describe un constructo de expresión para expresar FG21 en tejido adiposo y el uso del mismo para tratar la obesidad reduciendo el tamaño de adipocitos blancos y volviendo marrón el tejido adiposo blanco. Este documento también describe un constructo de expresión para expresar FGF21 en tejido adiposo en donde una secuencia de nucleótidos que codifica FGF21 está bajo control del promotor mini/UCP1, que está compuesto del potenciador de UCP1 específico de adiposo y el promotor de UCP1 basal

SUMARIO

[0004] La siguiente divulgación incluye mejoras sobre tales deficiencias. Por consiguiente, se proporciona un polinucleótido que comprende un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial, en donde el elemento regulador cis comprende un potenciador un potenciador de proteína 1 y un promotor de proteína 1 de desacoplamiento. También se proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido de acuerdo con el primer aspecto.

[0005] En un ejemplo, el potenciador de proteína de desacoplamiento tiene por lo menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, y la SEQ ID NO: 7. En otro ejemplo, el potenciador de proteína 1 de desacoplamiento se selecciona de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, y la SEQ ID NO: 7. En otro ejemplo, el promotor de la proteína 1 de desacoplamiento tiene por lo menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 8. En otro ejemplo más, el promotor de la proteína 1 de desacoplamiento se selecciona de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 8. En otro ejemplo más, el elemento regulador cis tiene por lo menos un 90 % de homología con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 9. En un ejemplo adicional, el elemento regulador cis se selecciona de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 9.

[0006] En otro ejemplo, la proteína tipo 4 vestigial tiene por lo menos un 90% de homología con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial se selecciona de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33. En otro ejemplo más, la secuencia que codifica una proteína tipo 4 vestigial tiene por lo menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 32. En un ejemplo adicional, la secuencia que codifica una proteína tipo 4 vestigial se selecciona de la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 32.

[0007] En otro ejemplo, la proteína tipo 4 vestigial tiene de 0 a 3 sustituciones en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, y la SEQ ID NO: 21, en donde las sustituciones no están en un dominio TDU. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial tiene de 0 a 3

sustituciones en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33, en donde las sustituciones no están en un dominio TDU.

[0008] Otro ejemplo incluye además un intrón entre el elemento regulador cis y la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En otro ejemplo, el intrón tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 34. En otro ejemplo más, el intrón es la SEQ ID NO: 34.

[0009] Otro ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 35. Un ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 35. Otro ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 36. Un ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 36.

[0010] Otro ejemplo incluye además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína indicadora. En otro ejemplo, la proteína indicadora se selecciona de una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente azul, una proteína luciferasa, una proteína beta-galactosidasa, una proteína glutatión S-transferasa, una proteína cloranfenicol acetiltransferasa, y cualquier combinación de dos o más de las anteriores. En otro ejemplo más, la proteína indicadora incluye una proteína fluorescente verde. En otro ejemplo más, la proteína indicadora incluye la SEQ ID NO: 37. En un ejemplo adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína indicadora incluye la SEQ ID NO: 38.

[0011] Otro ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 39. Un ejemplo incluye la SEQ ID NO: 39. Otro ejemplo incluye una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 40. Un ejemplo incluye la SEQ ID NO: 40.

[0012] En otro aspecto, se proporciona un vector viral que incluye cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En un ejemplo, el vector viral incluye un vector asociado con un adenovirus.

[0013] La divulgación también describe una célula transfectada con cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En un ejemplo, la célula se puso en contacto con cualquiera de los ejemplos anteriores de un vector viral que incluye cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial.

[0014] La divulgación también describe un organismo transfectado con cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de tipo 4 vestigial. En un ejemplo, el organismo se puso en contacto con cualquiera de los ejemplos anteriores de un vector viral.

[0015] La divulgación también describe un método. En un ejemplo, el método incluye transfectar una célula con cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En otro ejemplo, la transfección incluye poner en contacto la célula con cualquiera de los ejemplos anteriores de un vector viral que incluye cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En otro ejemplo más se incluye transfectar un organismo con cualquiera de los ejemplos anteriores de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial. En otro ejemplo más, la transfección incluye poner en contacto el organismo con cualquiera de los ejemplos anteriores de un vector viral que incluyen cualquiera de los ejemplos anterior de un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial.

[0016] En otro ejemplo, el organismo es un mamífero. En otro ejemplo más, el organismo es un humano.

[0017] En un ejemplo del método, la proteína tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF a AA en un dominio TDU de la proteína tipo 4 vestigial y la transfección incluye aumentar la proporción de un volumen de tejido adiposo marrón a un volumen de tejido adiposo blanco en el organismo. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU de la proteína tipo 4 vestigial y la transfección incluye aumentar el volumen de tejido adiposo marrón en el organismo, disminuir el volumen de tejido adiposo blanco en el organismo, o ambos. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial no comprende una sustitución de HF por AA en un dominio TDU y la transfección incluye reducir una proporción de un volumen de tejido adiposo a un volumen de tejido no adiposo en el organismo.

[0018] En un ejemplo adicional, la proteína tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y el organismo es obeso o está en riesgo de desarrollar obesidad. En un ejemplo adicional más, la proteína tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y la transfección incluye la prevención de la obesidad en el organismo. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y la transfección incluye el tratamiento de la obesidad en el organismo. En otro ejemplo, la proteína

tipo 4 vestigial no incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y la transfección incluye reducir la obesidad en el organismo.

[0019] En un ejemplo del método, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, en donde la transfección incluye reducir un volumen de tejido adiposo del organismo. En otro ejemplo, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y la transfección incluye la reducción de un volumen de tejido adiposo marrón del organismo. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y el organismo es obeso o está en riesgo de desarrollar obesidad. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y la transfección incluye prevenir la obesidad en el organismo. En un ejemplo adicional, la transfección incluye tratar la obesidad en el organismo. En un ejemplo adicional más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y la transfección incluye reducir la obesidad en el organismo.

[0020] En un ejemplo del método, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y la transfección incluye reducir la síntesis de ácidos grasos en el organismo. En otro ejemplo, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en un dominio TDU, y el organismo tiene esteatosis hepática o está en riesgo de desarrollar esteatosis hepática. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y la transfección incluye prevenir la esteatosis hepática en el organismo. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y la transfección incluye tratar la esteatosis hepática en el organismo. En un ejemplo adicional, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y la transfección incluye reducir la esteatosis hepática en el organismo.

[0021] En un ejemplo del método, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, y el organismo tiene diabetes o está en riesgo de desarrollar diabetes. En otro ejemplo, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, en donde la transfección incluye prevenir la diabetes en el organismo. En otro ejemplo más, la proteína tipo 4 vestigial incluye una sustitución de HF por AA en cada uno de los dos dominios TDU, en donde la transfección incluye tratar la diabetes en el organismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente divulgación se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La FIG. 1 muestra una vista esquemática de constructos de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 2 muestra la cadencia de la administración del vector y la medición de la expresión de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 3 muestra imágenes de bioluminiscencia representativas de una vista dorsal de ratones a los que se les administró un vector viral de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 4 muestra imágenes de bioluminiscencia representativas de una vista ventral de ratones a los que se les administró un vector viral de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 5 muestra el origen de la señal de bioluminiscencia después de la administración del vector viral de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 6 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia de BAT interescapular después de la administración del vector viral de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 7 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia de BAT y WAT interescapular después de la administración del vector viral de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 8 muestra una vista esquemática de un constructo de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 9 muestra la cadencia de la administración del vector y la medición de BAT y WAT de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 10 muestra la expresión relativa de BAT y WAT después del tratamiento con un vector viral de control de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 11 muestra la expresión relativa de BAT y WAT después del tratamiento con un vector viral que incluye un elemento regulador cis de UCP-1 y una secuencia codificante de Vgll4 de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 12 muestra un efecto del tratamiento con un vector viral que incluye un elemento regulador cis de UCP-1 y una secuencia codificante de Vgll4 en el volumen de BAT de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 13 muestra un efecto del tratamiento con un vector viral que incluye un elemento regulador cis de UCP-1 y una secuencia codificante de Vgll4 en el volumen WAT de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 14 muestra un efecto del tratamiento con un vector viral que incluye un elemento regulador cis de UCP-1 y una secuencia codificante de Vgll4 en la proporción entre el volumen WAT y el volumen BAT de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 15 muestra la expresión bioluminiscente de una proteína indicadora, la luciferasa, en ratones de 6 semanas de edad a los que se les administraron vectores virales que incluían elementos reguladores cis de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 16 muestra la cuantificación de la actividad de luciferasa en tejido adiposo marrón (BAT).

La FIG. 17 muestra la cuantificación de la actividad de luciferasa en el hígado.

La FIG. 18 muestra la cuantificación de las copias del genoma del vector viral en BAT e hígado según lo evaluado por PCR en tiempo real.

La FIG. 19 es una ilustración de la cascada de señalización Hippo/YAP y el papel inhibitorio de Vgll4 en las interacciones YAP/TEAD.

La FIG. 20 muestra las mutaciones realizadas en dos dominios TONDU (TDU_1 y TDU_2) de las isoformas de Vgll4. Las isoformas A a F de Vgll4 incluyen dos dominios TDU, TDU_1 y TDU_2, con las secuencias indicadas (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42). Los mutantes de Vgll4-HF4A de las isoformas Vgll4 divulgadas en la presente incluyen dos sustituciones de alanina por cuatro aminoácidos, dos en TDU_1 (una histidina por alanina y una fenilalanina por alanina) y dos en TDU_2 (una histidina por alanina y una fenilalanina por alanina). Vgll4-HF4A tiene los dominios TDU doblemente sustituidos SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 (en lugar de SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente).

La FIG. 21 es una ilustración que muestra que mientras Vgll4 altera un complejo YAP/TEAD1, los mutantes de Vgll4-HF4A no lo hacen.

La FIG. 22 muestra una ilustración esquemática de la generación de ratones knockout Tead1 específicos de adipocitos marrones.

La FIG. 23 es una transferencia western que muestra la confirmación de la expresión reducida de TEAD1 en tejido adiposo marrón de los ratones knockout TEAD1 condicionales, con GADPH como control.

La FIG. 24 muestra una vista de montaje completo del tejido adiposo marrón interescapular (iBAT) recogido de ratones macho de 1 mes de edad. Barra = 5 mm.

La FIG. 25 muestra la parte entre iBAT y la relación de peso corporal (*P<0.05).

La FIG. 26 muestra la medición de qRT-PCR de varios niveles de transcripción de ARNm en BAT, normalizados a 36B4.

La FIG. 27 es una vista genómica del sitio de unión de TEAD1 en la región promotora de Fgf21.

La FIG. 28 es una ilustración del diseño experimental para inyectar a ratones adultos alimentados con una dieta rica en grasas un vector viral de acuerdo con la presente divulgación. GTT es la prueba de tolerancia a la glucosa e ITT es la prueba de tolerancia a la insulina.

La FIG. 29 muestra imagenología de bioluminiscencia de ratones de 8 semanas después de la infusión con vectores virales de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 30 y la FIG. 31 muestran mediciones de peso corporal total y mediciones de ganancia de peso corporal acumulada de ratones transfectados, respectivamente.

Las FIGS. 32A, 32B y 32C muestran efectos para la transfección con un vector viral que lleva un transcrito de polinucleótido BCE-Vgll4 en una relación de tejido adiposo total a longitud de tibia, una relación de masa magra total a longitud de tibia y una relación de masa grasa a masa magra. En 32A y 32B, el control de AAV.Luciferasa está a la derecha y AAV.Vgll4 está a la derecha.

La FIG. 33A muestra una ilustración de un diseño experimental que demuestra que el pretratamiento de ratones con AAV.BCE.VGLL4 mitiga la ganancia de peso corporal. AAV.BCE.Vgll4 se inyectó por vía subcutánea en la región interescapular de ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad. Después de 13 semanas de tratamiento con dieta rica en grasas, se probó la tolerancia a la glucosa (GTT) de los ratones. Como control se usó AAV.BCE.GFP.

Las FIGS. 33B y 33C muestran el peso corporal total y la ganancia de peso corporal acumulada, respectivamente. AAV.GFP es el trazo superior y AAV.Vgll4.GFP es el inferior.

La FIG. 33D muestra los niveles de ARNm de fgf21 en BAT después de la transfección con un constructo que impulsa Vgll4 con un elemento regulador cis de Ucp1 de acuerdo con aspectos de la presente divulgación.

Las FIGS. 34A y 34B muestran imágenes de inmunofluorescencia de adiposidades marrones interescapulares (se usó MCT1 para marcar los bordes celulares) y la expresión de Vgll4, respectivamente, de ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad BL610 días después de que se les inyectasen por vía subcutánea AAV.BCE.Vgll4 o AAV.BCE.GFP en la región interescapular.

Las FIGS. 34C y 34D muestran mediciones de PCR en tiempo real de varias transcripciones de ARNm en tejido adiposo marrón. El control (AAV.BCE.GFP) está a la derecha y AAV.BCE.Vgll4-HF4A está a la derecha.

La FIG. 35A muestra una ilustración de un diseño experimental que demuestra que el pretratamiento con un AAV.BCE.VGLL4-HF4A mitiga la ganancia de peso corporal. Se inyectó por vía subcutánea AAV.BCE.Vgll4-HF4A en la región interescapular de ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad. Después de 12 semanas de tratamiento con dieta rica en grasas, se analizó la glucosa (GTT) y la tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones. Se usó AAV.BCE.GFP como control.

Las FIGS. 35B y 35C muestran el peso corporal total y la ganancia de peso corporal acumulada, respectivamente. La FIG. 35D muestra los niveles de glucosa en suero después del desafío con glucosa en una prueba de tolerancia a la glucosa. Los trazos superiores son de control y los trazos inferiores son AAV.BCE.Vgll4-HF4A.

Las FIGS. 36A, 36B, 36C, 36D y 36E son gráficos que muestran una relación entre el peso del tejido adiposo marrón y el peso corporal, la expresión del ARNm de Vgll4 en BAT, la expresión del ARNm de Ucp1 en BAT, los niveles de ARNm del gen mitocondrial en BAT y la expresión del ARNm del gen de síntesis de ácidos

grasos en BAT. Prueba t de Student, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. El control (AAV.BCE.GFP) está a la derecha y AAV.BCE.Vgll4-HF4A está a la izquierda.

La FIG. 37A muestra que el pretratamiento con AAV.BCE.Vgll4-HF4A reduce la relación entre el peso del hígado y el peso corporal. La FIG. 37B muestra el nivel de expresión de ARNm de Vgll4 en el hígado. Las FIGS. 37C y 37D son fotomicrografías que muestran la tinción con HE y la tinción con aceite rojo, respectivamente, de secciones de hígado (barra = 100 μm). La FIG. 37E muestra los niveles de ARNm de expresión de los genes de síntesis de ácidos grasos en el hígado mediante PCR cuantitativa en tiempo real. A, B, E, prueba t de Student, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. El control (AAV.BCE.GFP) está a la derecha y AAV.BCE.Vgll4-HF4A está a la izquierda.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0023] Esta divulgación se refiere a un constructo que incluye un elemento regulador cis en sentido ascendente de una secuencia codificante para un péptido tipo 4 vestigial (Vgll4). En un ejemplo, un elemento regulador cis puede promover la expresión de un péptido de Vgll4 en células BAT. En un ejemplo, un elemento regulador cis también puede promover la expresión de un péptido de Vgll4 en células hepáticas. Puede además impulsar de manera específica o enriquecedora la expresión en células BAT con respecto a la expresión impulsada en muchas o la mayoría de las otras células, cuando las células se transfectan con el constructo. En un ejemplo, puede impulsar adicionalmente específica o enriquecedoramente la expresión en BAT y células hepáticas con respecto a la expresión impulsada en muchas o la mayoría de las otras células, cuando las células se transfectan con el constructo. También se divulga un vector viral que incluye el constructo, en donde el vector viral habilita, permite, o promueve la transfección de células con el constructo. En algunos ejemplos, el péptido de Vgll4 puede incluir sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, los péptidos de Vgll4 incluyen dos dominios TONDU (o TDU), a los que se hace referencia en la presente como TDU_1 y TDU_2. Cada dominio TDU incluye una secuencia de dipéptido HF. En un ejemplo, uno o ambos dipéptidos HF TDU pueden incluir sustituciones de aminoácidos, reemplazando HF con un dipéptido de aminoácidos alifáticos, como AA.

[0024] En un ejemplo, también se divulga que está provocando un aumento de BAT, una disminución de WAT, un aumento de la proporción entre el volumen de BAT y el volumen de WAT, o cualquiera de los dos anteriores, poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga la reducción de un volumen de tejido adiposo del organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga la reducción de una proporción de masa de BAT con el peso corporal de un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga la reducción del volumen del hígado, el peso del hígado, el contenido de grasa intrahepática o cualquier combinación de dos o más de los anteriores, de un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo.

[0025] En un ejemplo, también se divulga la reducción o minimización de los niveles de glucosa en sangre o un aumento de los niveles de glucosa en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga el aumento de la expresión de genes mitocondriales, como genes mitocondriales implicados en la respiración mitocondrial, en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga la disminución de la expresión de genes que promueven la lipogénesis en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo.

[0026] En un ejemplo, se usa un vector viral que incluye el constructo para transfectar células de un organismo con el constructo. Un vector viral puede ser un vector viral adeno-asociado u otro vector viral conocido por ser capaz de transfectar células. El organismo puede ser un mamífero, como un roedor o un humano o cualquier otro mamífero.

[0027] El Vgll4 es un cofactor de transcripción conocido por interactuar con moléculas de señalización celular y factores de transcripción para influir en la supervivencia celular y la función celular. Vgll4 es particularmente conocido por promover la muerte celular inhibiendo el complejo YAP-TEAD1. Se han identificado varias isoformas de Vgll4, derivadas de variantes de corte y empalme del gen Vgll4. Estos incluyen Vgll4A, Vgll4B, Vgll4C Vgll4D, Vgll4E y Vgll4F. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas Vgll4 (a las que se hace referencia colectivamente en la presente como Vgll4), y ejemplos de polinucleótidos que codifican las mismas, se dan en la Tabla II. Vgll4 se ha relacionado con un efecto anticancerígeno en varios tipos de cáncer, donde niveles más bajos de Vgll4 se correlacionan o se corresponden con o provocan una supervivencia de células tumorales aumentada y niveles más altos de Vgll4 se correlacionan o se corresponden con o provocan un efecto antitumoral que incluye procesos metastásicos disminuidos y supervivencia o proliferación de células tumorales disminuidas. Ver Deng, Vgll4 es un cofactor transcripcional que actúa como un nuevo supresor de tumores al interactuar con los TEAD, *Am J Cancer Res* (2018), 8(6):932-943. A este respecto, Vgll4 difiere de otros miembros de la familia tipo vestigial (Vgll) (Vgll1, Vgll2 y Vgll3) de cofactores de transcripción, que no se sabe que tengan funciones supresoras de tumores. Por lo general, no se entiende que los miembros de la familia Vgll distintos de Vgll4 compartan similitudes funcionales con Vgll4.

[0028] En vista del papel bien establecido de la expresión de Vgll4 aumentada en la promoción de procesos de muerte celular o la inhibición de la supervivencia celular, un aumento en el volumen de BAT como se divulga en la

presente resulta sorprendentemente de la expresión de Vgll4 influenciada por un elemento regulador cis específico de células BAT. En otro ejemplo, y sin querer estar limitados por ningún mecanismo de acción en particular, donde una proteína Vgll4 incluye sustituciones de HF por AA en ambos dominios TDU, un volumen de BAT reducido, una acumulación de grasa intrahepática reducida, o ambos, pueden resultar de la actividad de Vgll4 que no incluyen la integración de Vgll4 con una proteína de TEAD. En otro ejemplo, y sin querer estar limitados por ningún mecanismo de acción particular, donde una proteína Vgll4 incluye sustituciones de HF por AA en ambos dominios TDU, un volumen de BAT reducido, acumulación de grasa intrahepática reducida, o ambos, pueden resultar de la expresión aumentada de genes mitocondriales implicados en la respiración mitocondrial, la expresión disminuida de genes implicados en la lipogénesis, o ambas.

[0029] Para impulsar la expresión bajo el control de un elemento regulador cis, los elementos reguladores cis de la proteína 1 de desacoplamiento (Ucp1) pueden colocarse adyacentes a una secuencia codificante para una Vgll4. Por elemento regulador cis, lo que se entiende es una secuencia de nucleótidos que regula la transcripción de genes colindantes o secuencias codificantes. Convencionalmente, se considera que Ucp1 se expresa específicamente en células BAT. Por tanto, dicho elemento regulador cis puede impulsar la expresión mayoritariamente, o predominantemente, o en algunos casos exclusivamente, en células BAT. Sorprendentemente, sin embargo, como se divulga en la presente, dicho elemento regulador cis puede impulsar la expresión en células hepáticas además de la expresión en células BAT. En un ejemplo, dicho elemento regulador cis puede impulsar la expresión solo en BAT y células hepáticas.

[0030] Un elemento regulador cis puede incluir un promotor, un potenciador o ambos. En algunos casos, una secuencia para un elemento regulador cis puede estar localizada en menos de 10 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 20 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 30 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 40 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 50 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 60 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 70 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 80 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 90 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 100 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 125 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 150 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 175 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 200 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 225 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 250 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 275 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 300 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 325 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 35 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 375 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 400 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 425 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 450 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 475 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, en menos de 500 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción, o entre 500 y 1.000 nucleótidos desde un sitio de inicio de la transcripción.

[0031] Un promotor es una secuencia de nucleótidos a la que se unen las enzimas que polimerizan el ARN para iniciar la transcripción de una secuencia génica en sentido descendente. Muchos genes que muestran expresión específica del tipo de tejido o de célula incluyen un promotor en sentido ascendente de la secuencia de ADN que codifica el ARN que es particularmente activo en las células donde se expresa el gen. Un promotor puede ser más activo en algunas células que en otras, como estar activo solo en tipos de células o de tejidos específicos, o muy activo en ciertos tipos de células o de tejidos con respecto a otros. Los promotores incluyen una secuencia donde se inicia la transcripción. Los promotores eucariotas pueden incluir y típicamente incluyen características como una caja TATA, un sitio de reconocimiento del factor de transcripción IIB y una secuencia promotora central (o un iniciador). Los factores de transcripción se unen y la ARN polimerasa se une a un promotor para iniciar la transcripción.

[0032] En un elemento regulador cis también puede haber incluidas una o más secuencias potenciadoras. Un potenciador es parte de un elemento regulador cis que potencia la transcripción iniciada en o por el promotor. Un potenciador puede servir para promover el inicio de la transcripción en un promotor, por ejemplo, como mediante la unión de factores de transcripción adicionales al potenciador que facilitan o potencian el reclutamiento de otros factores y maquinaria transcripcional al promotor. Al igual que con los promotores, muchos genes tienen potenciadores que están implicados en la expresión específica de células o tejidos o potenciada por células o tejidos.

[0033] Ucp1 es una proteína mitocondrial expresada específicamente en células BAT. El gen Ucp1 incluye un elemento regulador cis en el que se han identificado y caracterizado elementos potenciadores y promotores. Tales elementos reguladores cis son responsables de promover la expresión de secuencias de genes colindantes en células BAT y no en otros tipos de tejidos o células. Las secuencias que pueden incluirse en un elemento regulador cis de acuerdo con la presente divulgación en base a los elementos reguladores cis de los genes Ucp1 se muestran en la Tabla I.

Tabla I: Secuencias de Elementos Reguladores Cis

SEQ ID NO	Identidad	Secuencia
1	Potenciador de Ucp1 de ratón	GCATGCCAATTTATAGTGCCGTCCTAACAGTACTGATACTTTAA CATGCTAAGTTTAAAGTGTGTGCTATATTAATTGTAAGATTGGTG AAGAGAGGTGTTATCAGATGGAAGCTGCACATTTCTGGATTAATG TGGTTAAATGTATCTTCTCCTGTGATTACTGTCTTTATTTCTTCTTT TAAAATATTGTCATTTGGACATCTATCTGTATAGCTACGCCCTGAC ACGTCCTCCTGGAGACAGATAAGAAGTTACGACGGGAGGAGCAG ATGGAGGCAAAGCGCTGTGATGCTTTTGTGGTTTGAGTGCACACA TTTGTTCAGTGATTCTGTGAAATGAGTGAGCAAATGGTGACCGGG TGCCCTGTAAATGGTGTCTACATCTTAAGAGAAGAACACGGACA CTAGGTAAGTGAAGCTTGCTGTCACTCCTCTACAGCGTCACAGAG GGTCAGTCACCCTTGACCACACTGAACTAGTCGTCACCTTTTCCACT CTTCCTGCCAGAAGAGCAGAAATCAGACTCTCTGGGGATATCAGC CTCACCCCTACTGCTCTCTCCATTATGAGGCAAACCTTTCTTTCACT TCCCAGAGGCTCTGGGGGCAGCAAGGTCAACCCTTTCTCAGACT CTAG
2	Promotor de Ucp1 de ratón	TCTCGGAGGAGATCAGATCGCGCTTATTCAAGGGAACCAGCCCCT GCTCTGCGCCCTGGTCCAAGGCTGTTGAAGAGTGACAAAAGGCAC CACGCTGCGGGGACGCGGGTGAAGCCCCTCTGTGTGTCCTCTGGG CATAATCAGGAACCTGGTGCCAAATCAGAGGTGATGTGGCCAGGG CTTTGGGAGTGACGCGCGGCTGGGAGGCTTGCGCACCCAAAGGCA CGCCCCTGCCAAGTCCCACTAGCAGCTCTTTGGAGACCTGGGCCG GCTCAGCCACTTCCCCCAGTCCCTCCTCCGGCAAGGGGCTATATA GATCTCCCAGGTCAGGGCGCAG
3	Potenciador-promotor de Ucp1 de ratón	GCATGCCAATTTATAGTGCCGTCCTAACAGTACTGATACTTTAA CATGCTAAGTTTAAAGTGTGTGCTATATTAATTGTAAGATTGGTG AAGAGAGGTGTTATCAGATGGAAGCTGCACATTTCTGGATTAATG TGGTTAAATGTATCTTCTCCTGTGATTACTGTCTTTATTTCTTCTTT TAAAATATTGTCATTTGGACATCTATCTGTATAGCTACGCCCTGAC ACGTCCTCCTGGAGACAGATAAGAAGTTACGACGGGAGGAGCAG ATGGAGGCAAAGCGCTGTGATGCTTTTGTGGTTTGAGTGCACACA TTTGTTCAGTGATTCTGTGAAATGAGTGAGCAAATGGTGACCGGG TGCCCTGTAAATGGTGTCTACATCTTAAGAGAAGAACACGGACA CTAGGTAAGTGAAGCTTGCTGTCACTCCTCTACAGCGTCACAGAG GGTCAGTCACCCTTGACCACACTGAACTAGTCGTCACCTTTTCCACT CTTCCTGCCAGAAGAGCAGAAATCAGACTCTCTGGGGATATCAGC CTCACCCCTACTGCTCTCTCCATTATGAGGCAAACCTTTCTTTCACT TCCCAGAGGCTCTGGGGGCAGCAAGGTCAACCCTTTCTCAGACT CTAGTCTCGGAGGAGATCAGATCGCGCTTATTCAAGGGAACCAGC CCCTGCTCTGCGCCCTGGTCCAAGGCTGTTGAAGAGTGACAAAAG GCACCACGCTGCGGGGACGCGGGTGAAGCCCCTCTGTGTGTCCTC TGGGCATAATCAGGAACCTGGTGCCAAATCAGAGGTGATGTGGCC AGGGCTTTGGGAGTGACGCGCGGCTGGGAGGCTTGCGCACCCAA GGCACGCCCCTGCCAAGTCCCACTAGCAGCTCTTTGGAGACCTGG GCCGGCTCAGCCACTTCCCCCAGTCCCTCCTCCGGCAAGGGGCTA TATAGATCTCCCAGGTCAGGGCGCAG
4	Potenciador de UCP1	GACGTCACAGTGGGTCAGTCACCCTTGATCACACTGCACCAGTCT TCACCTTTCCACGCTTCCTGCCAGAGCATGAATCAGGCTCTCTGG

5	especifico de adiposo de rata	GGATACCGGCCTCACCCCTACTGAGGCAAACCTTTCTCCCACTTCTC AGAGGCTCTGAGGGCAGCAAGGTCAGCCCTTTCTTTGGAATCTAG AACCCTCCCTGTCTTGAGCTGACATCACAGGGCAGGCAGATGCA GCAGGGAAGGGCCTGGGACTGGGACGTTTCATCCTACAAGAAAGC TGTGGAACCTTTTCAGCAACATCTCA
10	5 Promotor de UCP1 basal de rata	GAAATCAGATCGCACTTATTCAAAGGAGCCAGGCCCTGCTCTGCG CCCTGGTGGAGGCTCCTCATGTGAAGAGTGACAAAAGGCACCAT GTTGTGGATACGGGGCGAAGCCCCTCCGGTGTGTCCTCCAGGCAT CATCAGGAAGTAGTGCCAAAGCAGAGGTGCTGGCCAGGGCTTTG GGAGTGACGCGCGTCTGGGAGGCTTGTGCGCCCAGGGCACGCCC CTGCCGATTCCCCTAGCAGGTCTTGGGGGACCTGGGCGGCTCT GCCCCTCCTCCAGCAATCGGGCTATAAAGCTCTTCCAAGTCAGGG CGCAGAAGTGCCGGGCGATCCGGGCTTAAAGAGCGAGAGGAAGG GACGCTCACCTTTGAGCTCCTCCACAAATAGCCCTGGTGGCTGCC ACAGAAGTTCGAAGTTGAGAGTTCGG
20	6 Potenciador de UCP1 de rata con promotor de UCP1 basal de rata	GACGTCACAGTGGGTCAGTCACCCTTGATCACACTGCACCAGTCT TCACCTTTCCACGCTTCCTGCCAGAGCATGAATCAGGCTCTCTGG GGATACCGGCCTCACCCCTACTGAGGCAAACCTTTCTCCCACTTCTC AGAGGCTCTGAGGGCAGCAAGGTCAGCCCTTTCTTTGGAATCTAG AACCCTCCCTGTCTTGAGCTGACATCACAGGGCAGGCAGATGCA GCAGGGAAGGGCCTGGGACTGGGACGTTTCATCCTACAAGAAAGC TGTGGAACCTTTTCAGCAACATCTCAGAAATCAGATCGCACTTATT CAAAGGAGCCAGGCCCTGCTCTGCGCCCCTGGTGGAGGCTCCTCAT GTGAAGAGTGACAAAAGGCACCATGTTGTGGATACGGGGCGAAG CCCCTCCGGTGTGTCCTCCAGGCATCATCAGGAAGTAGTGCCAAA GCAGAGGTGCTGGCCAGGGCTTTGGGAGTGACGCGCGTCTGGGA GGCTTGTGCGCCCAGGGCACGCCCCTGCCGATTCCCCTAGCAGG TCTTGGGGGACCTGGGCGGCTCTGCCCCTCCTCCAGCAATCGGG CTATAAAGCTCTTCCAAGTCAGGGCGCAGAAAGTGCCGGGCGATCC GGGCTTAAAGAGCGAGAGGAAGGGACGCTCACCTTTGAGCTCCT CCACAAATAGCCCTGGTGGCTGCCACAGAAGTTCGAAGTTGAGA GTTTCGG
45	7 Potenciador de Ucp1 humano	TGATCAAGTGCATTTGTTAATGTGTTCTACATTTTCAAAAAGGAA AGGAGAATTTGTTACATTCAGAACTTGCTGCCACTCCTTTGCTACG TCATAAAGGGTCAGTTGCCCTTGCTCATACTGACCTATTCTTTACC TCTCTGCTTCTTCTTTGTGCCAGAAGAGTAGAAATCTGACCCTTTG GGGATAACCACCCTCTCCCCTACTGCTCTCTCCAACCTGAGGCAAA CTTTCTCCTACTTCCCAGAGCCTGTCAGAAGTGGTGAAGCCAGCC TGCTCCTTGGAATCCAGAACTACTTTTCAGAATCTTGAACCTTCTGTG ACCTCTCAGGGTCCC
55	8 Promotor de Ucp1 humano	ACCGCCGCGGTGCGCCCTCCCTCCGACGTGCGGTGTGCGGGGCGC AGACAACCAGCGGCCGGCCAGGGCTTTGCGGGAGCGAAGCAGG GCTCCCGAGGCACCGAGCGAGAATGGGAATGGGAGGGACCCGGT GCTCCCGGACACGCCCCCGGCAGGTCCCACGCCCCGGGTCTTCTGA GACCTCGCGCGGCCAGCCCCGGGAGCGGCCAGCTATATAAGTCC CAGCGGAAGACCGGAACGCAGAGGGTCCTGCTGGCGCGAGGGTG GGTAGGAGGGGACGCGGGGACT
65	9 Potenciador-promotor	TGATCAAGTGCATTTGTTAATGTGTTCTACATTTTCAAAAAGGAA AGGAGAATTTGTTACATTCAGAACTTGCTGCCACTCCTTTGCTACG TCATAAAGGGTCAGTTGCCCTTGCTCATACTGACCTATTCTTTACC

	de Ucp1 humano	TCTCTGCTTCTTCTTTGTGCCAGAAGAGTAGAAATCTGACCCTTTG GGGATACCACCCTCTCCCCTACTGCTCTCTCCAACCTGAGGCCAAA CTTTCTCCTACTTCCCAGAGCCTGTCAGAAGTGGTGAAGCCAGCC TGCTCCTTGGAATCCAGAACTACTTTTCAAGATCTTGAACCTTCTGTG ACCTCTCAGGGTCCCACCGCCGCGGTGCGCCCTCCCTCCGACGTG CGGTGTGCGGGGCGCAGACAACCAGCGGCCGCGCCAGGGCTTTC GGGGAGCGAAGCAGGGCTCCCGAGGCACCGAGCGAGAATGGGA ATGGGAGGGACCCGGTGCTCCCGGACACGCCCCCGGCAGGTCCC ACGCCCCGGGTCTTCTGAGACCTCGCGCGGCCAGCCCCGGGAGCGG CCCAGCTATATAAGTCCCAGCGGAAGACCGGAACGCAGAGGGTC CTGCTGGCGCGAGGGTGGGTAGGAGGGGACGCGGGGACT
--	----------------	--

[0034] Los ejemplos de promotores de Ucp1 incluyen los de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 8 (de genes de Ucp1 de ratón, rata y humano, respectivamente). Los ejemplos de potenciadores de Ucp1 incluyen los de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 7 (de genes de Ucp1 de ratón, rata y ser humano, respectivamente). En un ejemplo, la presencia de dicho potenciador de Ucp1 o promotor de Ucp1, o ambos, o de otros elementos potenciadores o promotores de Ucp1, o ambos, en el elemento regulador cis de un gen puede impulsar la transcripción y expresión de dicho gen solo en BAT, o solo en niveles altos en BAT, o solo en niveles detectables en BAT, o en niveles sustancialmente más altos en BAT en comparación con otros tipos de células. En otro ejemplo, la presencia de tal potenciador de Ucp1 o promotor de Ucp1, o ambos, o de otros elementos potenciadores o promotores de Ucp1, o ambos, en el elemento regulador cis de un gen también puede impulsar la transcripción y expresión de dicho gen en las células hepáticas. En algunos ejemplos, un elemento regulador cis puede incluir múltiples elementos potenciadores de Ucp1, como más de uno de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 8, o una combinación o combinaciones de los mismos.

[0035] Un elemento regulador cis de Ucp1 puede incluir una secuencia de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 9. O puede incluir un promotor de Ucp1 sin un potenciador de Ucp1. Un elemento regulador cis de Ucp1 también puede incluir combinaciones de un potenciador de Ucp1 y un promotor de Ucp1 distintos de los ejemplos mencionados anteriormente, como uno o más potenciadores la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 7, junto con cualquiera de los promotores de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 8. En la presente se contemplan explícitamente todas las posibles combinaciones y permutaciones de lo anterior y se incluyen explícitamente como ejemplos de la presente divulgación.

[0036] Se ha demostrado con anterioridad que un elemento regulador cis que incluye un potenciador de Ucp1 de rata de la SEQ ID NO: 4 y un promotor de Ucp1 de rata de la SEQ ID NO: 5 impulsa la expresión de un gen colindante de una manera específica de BAT. La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2016/0319303A1. Como se divulga en la presente, un elemento regulador cis que incluye un potenciador de Ucp1 de ratón de la SEQ ID NO: 1, un promotor de Ucp1 de ratón de la SEQ ID NO: 2, o ambos (como en la SEQ ID NO: 3) también puede impulsar la expresión de un gen colindante de una manera específica de BAT. Sorprendentemente, como se divulga adicionalmente en la presente, un elemento regulador cis que incluye un potenciador de Ucp1 y un promotor de Ucp1 también puede inducir la expresión en células hepáticas. Algunos ejemplos pueden tener una secuencia potenciadora de Ucp1, una secuencia promotora de Ucp1 o un elemento regulador cis de Ucp1, con un 90% o más, o un 95% o más, o un 97,5% o más de homología de secuencia con cualquiera de los ejemplos anteriores correspondientes.

[0037] En la Tabla II se muestran las secuencias de aminoácidos y ejemplos no limitativos de secuencias de nucleótidos que codifican tales secuencias peptídicas de Vgll4.

Tabla II: Secuencias de Vgll4

5	SEQ ID NO	Identidad	Secuencia
10	10	Nucleótido de Vgll4A	ATGCTATTTATGAAGATGGACCTGTTGAACTATCAGTACTTGGAC AAGATGAACAACAATATCGGCATTCTGTGCTACGAAGGCGAAGC TGCTCTCAGGGGAGAACCCAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTC TGCCCTCAGCAGTCACCGCACCGGCCCTCCCCAATCAGCCCCAG CAAGAGGAAGTTCAGCATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACT GTGACAACGACCACGTCTCCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCC ATCTGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGG GAGCGGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCAT GAGCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGG CCTGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCA GCAGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACACTGACCCCGGGGGAGCGG CAGCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCC CGCAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGT GCCGCGCCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGC CACCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGCATTTCCGCAGGAGCCT GGGCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACCTCCGTGT CCATCACGGGCTCCGTGGACGACCACTTTGCCAAAGCTCTGGGTG ACACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGC AGCCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCT GCCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
35	11	Aminoácido de Vgll4A	MLFMKMDLLNYQYLDKMNNNIGILCYEGEAALRGEPRITLPVASA LSSHRTGPPPIPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVSMSRIFNPHLNKT ANGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQPLALT KNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAH SGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEHFRRSLGKNYKEPEPAPNSV SITGSVDDHFAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAH MVSHSHSPSVVS
45	12	Nucleótido de Vgll4B	ATGGAGACGCCATTGGATGTTTTGTCCAGGGCAGCATCTCTGGTG CATGCTGATGACGAAAAACGCGAAGCTGCTCTCAGGGGAGAACC CAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTCTGCCCTCAGCAGTCACCG CACCGGCCCTCCCCAATCAGCCCCAGCAAGAGGAAGTTCAGCAT GGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGACAACGACCACGTCT CCAAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCTGAACAAGACTGCCA ATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCCCC
50			

(continuación)

5			ATCGAGCGCGCTGTGGCCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCCAC CTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCTCGCA CTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTCTC GCCCACACTGACCCCGGGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTCCG TGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCGCAACTGCAACCTCTCGC 10 ACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGCGCCCGGGCCTGCCA GCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGTGG TGGAGGAGCATTTCGCGCAGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGGAG CCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGGAC 15 GACCACTTTGCCAAAGCTCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCAAA GCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCTCGC AGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCACATGGTCAGCCACAGT CACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
20	13	Péptido de Vgll4B	METPLDVL SRAASLVHADDEKREAALRGEPRIQTLPVASALSSHRTG PPPIPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVS KMSRIFNPHLNKTANGDCR 25 RDPRESRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSL GLEQPLALTKNSLDA SRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAHSGCAAP GPASYRRPPSAATTCDPVVEEHFRRSLGKNYKEPEPAPNSVSITGSVD DHFAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAHMVSHSH SPSVVS
30	14	Nucleótido de Vgll4C	ATGATTAAAGTGAGGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAG AGACCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCCCATCGAGCGCGCTGTGG 35 CCCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCC CCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCC TGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACTGACCCCGG GGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGG CTGGCGCCCGCAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACA GCGGCTGTGCCGCGCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCG 40 AGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGCATTTCGCG AGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAA CTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGGACGACCACTTTGCCAAAGC TCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAG 45 CATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCCA GCCCTCTGCCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGT CTCC
50	15	Aminoácido de Vgll4C	MIKVRNKTANGDCRRDPRESRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSL GLEQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNC 55 NLSHCPIAHSGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEHFRRSLGKNYK EPEPAPNSVSITGSVDDHFAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRR GQPASPSAHMVSHSHSPSVVS
55	16	Nucleótido de Vgll4D	ATGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCGGGA GCGGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCACCATGA 60 GCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCC TGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGC AGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACTGACCCCGGGGAGCGGCA GCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCG CAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGC 65 CGCGCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCA CCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGCATTTCGCGCAGGAGCCTGG GCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCC

(continuación)

5		ATCACGGGCTCCGTGGACGACCACTTTGCCAAAGCTCTGGGTGAC ACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAG CCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGC CCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
10	17 Aminoácido de Vgll4D	MNKTANGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQ PLALTKNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSH CPIAHSGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEHFRRSLGKNYKEPEPA PNSVSITGSVDDHFAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPAS PSAHMVSHSHSPSVVS
15	18 Nucleótido de Vgll4E	ATGACTGAGAATACGCATTTTGACAAAATCCCTGAGTCCTGTGCA CTCAAAAGTTGGAGACATCCAGGTCTGCACCATGGCGAAGCTGCT CTCAGGGGAGAACCCAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTCTGCC CTCAGCAGTCACCGCACCGGCCCTCCCCAATCAGCCCCAGCAAG AGGAAGTTCAGCATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGA CAACGACCACGTCTCCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCT GAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGAGC GGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCATGAGCC TGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGG AGCAGCCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGCAGG CCAGCCGGCCTCTCGCCCACACTGACCCCGGGGGAGCGGCAGCA GAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCCGAA CTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGC GCCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCA CCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGCATTTCGCGAGGAGCCTGGGCA AGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATCA CGGGCTCCGTGGACGACCACTTTGCCAAAGCTCTGGGTGACACGT GGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCCCT GAGTCCGCCTCTCGCAGGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCCAC ATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
40	19 Aminoácido de Vgll4E	MTENTHFDKIPESCALKSWRHPGLHHGEAALRGEPRITQPLPVASALS SHRTGPPPISPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVS KM SRIFNPHLNKTA NGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQPLALTK NSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAHS GCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEHFRRSLGKNYKEPEPAPNSVSI TGSVDDHFAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAHM VSHSHSPSVVS
50	20 Nucleótido de Vgll4F	ATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGACAACGACCACGT CTCCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCTGAACAAGACTGC CAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCC CCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCC ACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCCTCG CACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTC TCGCCCACACTGACCCCGGGGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTC CGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCCGCAACTGCAACCTCTC GCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGCGCCCCGGGCCTGC CAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGT GGTGGAGGAGCATTTCGCGAGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGG AGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGG ACGACCACTTTGCCAAAGCTCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCA AAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCT

(continuación)

		CGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCCACATGGTCAGCCAC AGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
5	21	Aminoácido de Vgll4F
10		MEPGDEDLDCDNDHVS KM SRIFNPHLNKTANGDCRRDPRERSRSPIE RAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTP GERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAHSGCAAPGPASYRRPPSA ATTCDPVVEEHFRRSLGKNYKEPEPAPNSVSITGSVDDHFAKALGDT WLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAHMVSHSHSPSVVS

[0038] Se han identificado por lo menos seis isoformas (A-F) de Vgll4, a las que se hace referencia en la presente como Vgll4A, Vgll4B, Vgll4C, Vgll4D, Vgll4E y Vgll4F, que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO 21, respectivamente. Estas seis isoformas se incluyen colectivamente en el término Vgll4 como se usa en la presente. También se incluye en la presente cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de las isoformas de Vgll4 anteriores incluyendo, sin limitación, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO 18 y la SEQ ID NO: 20, que incluyen una o más sustituciones de codones en cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores que, sin embargo, todavía codifican un Vg14 (por ejemplo, A-F), debidas a la degeneración de codones. Un constructo como se divulga en la presente puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 como se divulga en la presente con cualquier elemento regulador cis como se divulga en la presente, incluyendo sin limitación, uno o más de un potenciador de Ucp1 y un promotor de Ucp1, incluyendo cualquier variación de los mismos descrita anteriormente.

[0039] Una proteína de Vgll4 puede ser de Vgll4 humano (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, o SEQ ID NO 21), o Vgll4 de ratón o rata, o una secuencia de Vgll4 que tiene por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o por lo menos un 97,5% de homología con cualquiera de los ejemplos anteriores de la Tabla II. En un ejemplo, un péptido de Vgll4 puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (en relación con los ejemplos divulgados en la Tabla II). En un ejemplo, un péptido de Vgll4 puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones de aminoácidos (en relación con los ejemplos divulgados en la Tabla II). En un ejemplo, un péptido de Vgll4 puede tener de 1 a 3 sustituciones de aminoácidos, o 2 sustituciones de aminoácidos, o 1 sustitución de aminoácidos (en relación con los ejemplos divulgados en la Tabla II). En un ejemplo, cualquiera de las sustituciones de aminoácidos anteriores puede estar fuera de un dominio TDU_1 y TDU_2 del péptido Vgll4.

[0040] En otro ejemplo, un péptido Vgll4 puede incluir dos sustituciones de aminoácidos en un dominio TDU, o dos sustituciones de aminoácidos en cada uno de los dos dominios TDU. Un dominio TDU_1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. Un dominio TDU_2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. Cada una de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, y la SEQ ID NO 21 incluye un TDU1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y un dominio TDU_2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. En algunos ejemplos, un dominio TDU_1 puede tener una secuencia de aminoácidos del dipéptido HF sustituida con una secuencia de aminoácidos del dipéptido AA, para producir la secuencia de aminoácidos de TDU_1 SEQ ID NO: 43. En algunos ejemplos, un dominio TDU_2 puede tener una secuencia de aminoácidos de dipéptido HF sustituida con una secuencia de aminoácidos de dipéptido AA, para producir la secuencia de aminoácidos de TDU_2 SEQ ID NO: 44. Un péptido Vgll4 puede incluir un dominio TDU_1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 en lugar de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. Un péptido Vgll4 puede incluir un dominio TDU_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 en lugar de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. Un péptido Vgll4 puede incluir un dominio TDU_1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 en lugar de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 e incluyen un dominio TDU_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 en lugar de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. A un péptido Vgll4 (por ejemplo, Vgll4A, Vgll4B, Vgll4C, Vgll4D, Vgll4E o Vgll4F) que tiene dominios TDU con secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44 en lugar de la SEQ ID NO: 41 y la SEQ ID NO: 42 se hace referencia en la presente como péptido Vgll4-HF4A.

[0041] En la presente se divulgan por lo menos seis isoformas (A-F) de Vgll4-HF4A, a las que se hace referencia en la presente como Vgll4A-HF4A, Vgll4B-HF4A, Vgll4C-HF4A, Vgll4D-HF4A, Vgll4E-HF4A y Vgll4F-HF4A. En la Tabla III se muestran las secuencias de aminoácidos, y ejemplos no limitativos de secuencias de nucleótidos que codifican tales secuencias peptídicas de Vgll4-HF4A.

Tabla III: secuencias de VglI4-HF4A

SEQ ID NO	Identidad	Secuencia
22	Nucleótido de VglI4A- HF4A	ATGCTATTTATGAAGATGGACCTGTTGAACTATCAGTACTTGGAC AAGATGAACAACAATATCGGCATTCTGTGCTACGAAGGCGAAGC TGCTCTCAGGGGAGAACCCAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTC TGCCCTCAGCAGTCACCGCACCGGCCCTCCCCAATCAGCCCCAG CAAGAGGAAGTTCAGCATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACT GTGACAACGACCACGTCTCCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCC ATCTGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGG GAGCGGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCAT GAGCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGG CCTGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCA GCAGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACACTGACCCCGGGGGAGCGG CAGCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCC CGCAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGT GCCGCGCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGC CACCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGGCAGCCCGCAGGAGCC TGGGCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACCTCCGTG TCCATCACGGGCTCCGTGGACGACGCAGCTGCCAAAGCTCTGGGT GACACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAG

(continuación)

		CAGCCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCCTC TGCCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
5	23	Aminoácido de Vgll4A- HF4A
10		MLFMKMDLLNYQYLDKMNNNIGILCYEGEAALRGEPIRQITLPVASA LSSHRTGPPPIPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVS KM SRIFNPHLNKT ANGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQPLALT KNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAH SGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEAARRSLGKNYKEPEPAPNSV SITGSVDDAAAKALGDTWLQIKA AKDGASSSPESASRRGQPASPSAH MVSHSHSPSVVS
15	24	Nucleótido de Vgll4B- HF4A
20		ATGGAGACGCCATTGGATGTTTTGTCCAGGGCAGCATCTCTGGTG CATGCTGATGACGAAAAACGCGAAGCTGCTCTCAGGGGAGAACC CAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTCTGCCCTCAGCAGTCACCG CACCGGCCCTCCCCAATCAGCCCCAGCAAGAGGAAGTTCAGCAT GGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGACAACGACCACGTCT CCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCTGAACAAGACTGCCA ATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCCCC ATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCCAC CTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCCTCGCA CTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTCTC GCCACACTGACCCCGGGGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTCCG TGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCGCAACTGCAACCTCTCGC ACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGCGCCCGGGCCTGCCA GCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGTGG TGGAGGAGGCAGCCCGCAGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGGAG CCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGGAC GACGCAGCTGCCAAAGCTCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCAA AGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCTC GCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCACATGGTCAGCCACA GTCACCTCCCCCTCTGTGGTCTCC
25	25	Péptido de Vgll4B- HF4A
30		METPLDVL SRAASLVHADDEKREAALRGEPIRQITLPVASALSSHRTG PPPIPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVS KM SRIFNPHLNKTANGDCR RDPREERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLEQPLALT KNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAH SGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEAARRSLGKNYKEPEPAPNSV SITGSVD DAAAKALGDTWLQIKA AKDGASSSPESASRRGQPASPSAH MVSHSHSPSVVS
35	26	Nucleótido de Vgll4C- HF4A
40		ATGATTAAAGTGAGGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAG AGACCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGG CCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCC CCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCC TGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACACTGACCCCGG GGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGG CTGGCGCCCGCAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACA GCGGCTGTGCCGCGCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCG AGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGGCAGCCCG CAGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCA ACTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGGACGACGCAGCTGCCAAAG CTCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGA GCATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCC
45		
50		
55		
60		
65		

(continuación)

			AGCCCCCTCTGCCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTG GTCTCC
5	27	Aminoácido de Vgll4C- HF4A	MIKVRNKTANGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSL GLEQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNC NLSHCPIAHSGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEAARRSLGKNYK EPEPAPNSVSITGSVDDAAAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRR 10GQPASPSAHMVSHSHSPSVVS
15	28	Nucleótido de Vgll4D- HF4A	ATGAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGA GCGGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCACCATGA GCCTGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCC TGGAGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGC AGGCCAGCCGGCCTCTCGCCCACTGACCCCGGGGGAGCGGCA GCAGAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCCG CAACTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGC CGCGCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCA CCACCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGGCAGCCCGCAGGAGCCTG GGCAAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTC 25CATCACGGGCTCCGTGGACGACGCAGCTGCCAAAGCTCTGGGTGA CACGTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCA GCCCTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTG CCCACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
30	29	Aminoácido de Vgll4D- HF4A	MNKTANGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSL GLEQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTPGERQQNRPSVITCASAGARNC NLSHCPIAHSGCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEAARRSLGKNYK EPEPAPNSVSITGSVDDAAAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRR 35GQPASPSAHMVSHSHSPSVVS
40	30	Nucleótido de Vgll4E- HF4A	ATGACTGAGAATACGCATTTTGACAAAATCCCTGAGTCCTGTGCA CTCAAAAGTTGGAGACATCCAGGTCTGCACCATGGCGAAGCTGCT CTCAGGGGAGAACCCAGAATACAGACCCTGCCGGTGGCCTCTGCC CTCAGCAGTCACCGCACCCGGCCCTCCCCCAATCAGCCCCAGCAAG AGGAAGTTCAGCATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGA CAACGACCACGTCTCAAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCT GAACAAGACTGCCAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCGGGAGC GGAGCCGCAGCCCCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCACCATGAGCC TGCACGGCAGCCACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGG AGCAGCCCCTCGCACTGACCAAGAACAGCCTGGACGCCAGCAGG CCAGCCGGCCTCTCGCCCACTGACCCCGGGGGAGCGGCAGCA GAACCGGCCCTCCGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCGCAA CTGCAACCTCTCGCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGC GCCCCGGGCCTGCCAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCA CCTGTGACCCCGTGGTGGAGGAGGCAGCCCGCAGGAGCCTGGGC AAGAATTACAAGGAGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATC ACGGGCTCCGTGGACGACGCAGCTGCCAAAGCTCTGGGTGACAC GTGGCTCCAGATCAAAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCC 60CTGAGTCCGCCTCTCGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCC ACATGGTCAGCCACAGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
65	31	Aminoácido de Vgll4E- HF4A	MTENTHFDKIPESCALKSWRHPGLHHGEAALRGEPIRQTLPVASALS SHRTGPPPIPSKRKFSMEPGDEDLDCDNDHVSKMSRIFNPHLNKTA NGDCRRDPRERSRSPIERAVAPTMSLHGSHLYTSLPSL GLEQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTPGEROONRPSVITCASAGARNC NLSHCPIAHS

(continuación)

5		GCAAPGPASYRRPPSAATTCDPVVEEAARRSLGKNYKEPEPAPNSVS ITGSVDDAAAKALGDTWLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAH MVSHSHSPSVVS
10	32	Nucleótido de Vgll4F- HF4A
15		ATGGAGCCAGGTGACGAGGACCTAGACTGTGACAACGACCACGT CTCCAAAATGAGTCGCATCTTCAACCCCCATCTGAACAAGACTGC CAATGGAGACTGCCGCAGAGACCCCCGGGAGCGGAGCCGCAGCC CCATCGAGCGCGCTGTGGCCCCCACCATGAGCCTGCACGGCAGCC ACCTGTACACCTCCCTCCCCAGCCTTGGCCTGGAGCAGCCCCCTCG CACTGACCAAGAAGCAGCCTGGACGCCAGCAGGCCAGCCGGCCTC TCGCCCACACTGACCCCCGGGGAGCGGCAGCAGAACCGGCCCTC CGTGATCACCTGTGCCTCGGCTGGCGCCCCGCAACTGCAACCTCTC GCACTGCCCCATCGCGCACAGCGGCTGTGCCGCGCCCCGGGCCTGC CAGCTACCGGAGGCCACCGAGCGCTGCCACCACCTGTGACCCCGT GGTGGAGGAGGCAGCCCGCAGGAGCCTGGGCAAGAATTACAAGG AGCCCGAGCCGGCACCCAACTCCGTGTCCATCACGGGCTCCGTGG ACGACGCAGCTGCCAAAGCTCTGGGTGACACGTGGCTCCAGATCA AAGCGGCCAAGGACGGAGCATCCAGCAGCCCTGAGTCCGCCTCT CGCAGGGGCCAGCCCGCCAGCCCCTCTGCCCACATGGTCAGCCAC AGTCACTCCCCCTCTGTGGTCTCC
20	33	Aminoácido de Vgll4F- HF4A
25		MEPGDEDLDCDNDHVSKMSRIFNPHLNKTANGDCRRDPRERSRSPIE RAVAPTMSLHGSHLYTSLPSLGLQPLALTKNSLDASRPAGLSPTLTP GERQQNRPSVITCASAGARNCNLSHCPIAHSGCAAPGPASYRRPPSA ATTCDPVVEEAARRSLGKNYKEPEPAPNSVSITGSVDDAAAKALGDT WLQIKAAKDGASSSPESASRRGQPASPSAHMVSHSHSPSVVS

[0043] Una proteína de Vgll4-HF4A puede ser un Vgll4 humano, o Vgll4 de ratón o rata, que lleva una sustitución de HF por AA en sus dominios TDU, o una secuencia de Vgll4-HF4A que tiene por lo menos el 90%, por lo menos el 95% o por lo menos el 97,5% de homología con cualquiera de los ejemplos anteriores en la Tabla III. En un ejemplo, un péptido de Vgll4-HF4A puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (con respecto a los ejemplos divulgados en la Tabla III) fuera de un dominio TDU_1 y TDU_2. En un ejemplo, un péptido de Vgll4-HF4A puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones de aminoácidos (con respecto a las secuencias divulgadas en la Tabla III) fuera de un dominio TDU_1 y TDU_2. En un ejemplo, un péptido de Vgll4-HF4A puede tener de 1 a 3 sustituciones de aminoácidos, o 2 sustituciones de aminoácidos, o 1 sustitución de aminoácidos (con respecto a las secuencias divulgadas en la Tabla III) fuera de un dominio TDU_1 y TDU_2.

[0044] En algunos ejemplos, puede incluirse un intrón entre un elemento regulador cis y un gen que codifica Vgll4. En algunos ejemplos, un intrón puede potenciar o promover la transcripción o promover la estabilidad de una transcripción de ARN. Otros ejemplos no incluyen un intrón. Los expertos en la técnica saben que pueden incluirse varias secuencias intrónicas en constructos recombinantes para promover la expresión génica, cualquiera de las cuales podría incluirse en un constructo como se divulga en la presente. En un ejemplo, puede incluirse un intrón de la SEQ ID NO: 34 (un intrón quimérico de genes de cadena pesada de inmunoglobulina y globina b humana), o una secuencia que tiene por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o por lo menos un 97,5% homología de secuencia con la mismo.

[0045] En las Tablas IV y V, respectivamente, se muestra un resumen de los aspectos de un constructo que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica Vgll4, y un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica Vgll4-HF4A, como se divulga en la presente.

Tabla IV: Constructos de Vgll4

5	Elementos reguladores cis		Intrón opcional	Vgll4
	<u>Secuencias potenciadoras</u>	<u>Secuencias promotoras</u>	<u>SEQ ID NO: 34</u>	<u>Secuencias de aminoácidos:</u>
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	GTAAGTATCAAGG	SEQ ID NO: 11
	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	TTACAAGACAGGT	SEQ ID NO: 13
10	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	TTAAGGAGACCAA	SEQ ID NO: 15
			TAGAAACTGGGCT	SEQ ID NO: 17
			TGTCGAGACAGAG	SEQ ID NO: 19
15			AAGACTCTTGCGTT	SEQ ID NO: 21
	<u>Secuencias potenciadoras-promotoras:</u>		TCTGATAGGCACCT	<u>Secuencias de nucleótidos:</u>
	SEQ ID NO: 3		ATTGGTCTTACTGA	SEQ ID NO: 10
20	SEQ ID NO: 6		CATCCACTTTGCCT	SEQ ID NO: 12
	SEQ ID NO: 9		TTCTCTCCACAG	SEQ ID NO: 14
				SEQ ID NO: 16
25				SEQ ID NO: 18
				SEQ ID NO: 20

Tabla V: Constructos de Vgll4-HF4A

30	Elementos reguladores cis		Intrón opcional	Vgll4-HF4A
	<u>Secuencias potenciadoras</u>	<u>Secuencias promotoras</u>	<u>SEQ ID NO: 34</u>	<u>Secuencias de aminoácidos:</u>
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	GTAAGTATCAAGG	SEQ ID NO: 23
	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	TTACAAGACAGGT	SEQ ID NO: 25
35	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	TTAAGGAGACCAA	SEQ ID NO: 27
			TAGAAACTGGGCT	SEQ ID NO: 29
			TGTCGAGACAGAG	SEQ ID NO: 31
40			AAGACTCTTGCGTT	SEQ ID NO: 33
	<u>Secuencias potenciadoras-promotoras:</u>		TCTGATAGGCACCT	<u>Secuencias de nucleótidos:</u>
	SEQ ID NO: 3		ATTGGTCTTACTGA	SEQ ID NO: 22
45	SEQ ID NO: 6		CATCCACTTTGCCT	SEQ ID NO: 24
	SEQ ID NO: 9		TTCTCTCCACAG	SEQ ID NO: 26
				SEQ ID NO: 28
50				SEQ ID NO: 30
				SEQ ID NO: 32

[0046] Un constructo como se divulga en la presente puede incluir un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 o Vgll4-HF4A. Un elemento regulador cis puede incluir, por ejemplo, una o más secuencias potenciadoras SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 7, y cualquiera de las secuencias promotoras SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8. En la presente divulgación se contemplan e incluyen expresamente todas las permutaciones de lo anterior. En un ejemplo, un elemento regulador cis puede incluir 2, 3 o 4 secuencias potenciadoras, cada una seleccionada independientemente de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 7. Los ejemplos de elementos reguladores cis incluyen la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 9.

[0047] Un péptido de Vgll4 codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de Vgll4 de un constructo puede incluir, por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, y la SEQ ID NO: 21, o cualquier variación de las mismas como se ha explicado con anterioridad. Los ejemplos incluyen la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 20. El péptido de Vgll4-HF4A codificado por la secuencia de nucleótidos que codifica

un péptido de Vgll4-HF4A de un constructo puede incluir, por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 31, o cualquier variación de las mismas como se ha explicado con anterioridad. Los ejemplos incluyen la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 32. Un constructo puede incluir cualquier elemento regulador cis como se divulga en la presente y cualquier secuencia de nucleótidos que codifica Vgll4 o Vgll4-HF4A como se divulga en la presente. Opcionalmente, un constructo también puede incluir un intrón entre un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica Vgll4 o Vgll4-HF4A. Un ejemplo no limitativo de un intrón opcional es la SEQ ID NO: 34. En otros ejemplos, pueden incluirse nucleótidos distintos de un intrón o que tienen una secuencia de nucleótidos intrónica distinta de la SEQ ID NO: 34 en un constructo entre un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica Vgll4 o Vgll4-HF4A. Un ejemplo de constructo de Vgll4A es la SEQ ID NO: 35 y un ejemplo de constructo de Vgll4-HF4A es la SEQ ID NO: 36.

[0048] Una célula puede transfectarse con un constructo como se divulga anteriormente mediante varios métodos, como transfección química, electroporación, empalfección, transfección con pistola génica o transferencia génica mediada por vector viral, o cualquier otro método conocido por los expertos en el campo relevante. En un ejemplo, un gen de Vgll4 con el elemento regulador cis de Ucp1 asociado se empaqueta en un vector viral para la transfección celular. En este caso el vector viral se refiere a una partícula similar a un virus que contiene o incluye un constructo o casete de gen de carga útil capaz de unirse a una célula y administrar la carga útil en la célula. En algunos ejemplos, un vector viral puede ser de un tipo en el que una carga útil, una vez introducida en una célula transfectada, se integra en el ADN genómico de la célula, aunque tal integración genómica no es una característica esencial de un vector viral como se divulga en la presente. El vector viral también puede referirse a una secuencia génica que incluye un constructo génico o un casete estructurado para su inclusión en una partícula similar a un virus. Los ejemplos de vectores virales incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV). Varios serotipos de vectores AAV son útiles para la transfección celular, incluyendo cualquiera de serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, o subtipos de los mismos. Las secuencias para tales serotipos de AAV son conocidas y pueden encontrarse en bases de datos de acceso público, al igual que los métodos para empaquetar un constructo de interés en partículas de vectores virales para la transfección celular y la promoción de la expresión del constructo en células transfectadas.

[0049] Un vector AAV incluye secuencias que limitan un constructo de carga útil a las que se hace referencia como repeticiones terminales invertidas (ITR). Las secuencias de ITR están implicadas en la transcripción del genoma de AAV, la encapsulación de la carga útil en una partícula de vector, la multiplicación del genoma para la generación de partículas y la integración en el genoma del huésped. Un casete, constructo, transgén, carga útil, etc., colocado entre las ITR de un vector de AAV puede promover la producción de un vector de AAV y/o la expresión del gen transfectado dentro de las células. En un ejemplo, un elemento regulador cis de Ucp1 colindante con una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 o Vgll4-HF4A puede colocarse entre las ITR y usarse para generar una partícula de AAV, en donde dicha partícula puede ponerse en contacto con células de un organismo para transfectarlas con tal constructo. Un ejemplo incluye un AAV de serotipo AAV9 que contiene tal constructo, aunque también pueden usarse otros serotipos.

[0050] En algunos casos, puede usarse o incluirse un gen indicador en un constructo para verificar la expresión de un gen de constructo incluido en un vector o para probar la expresión específica de un tipo de célula o tejido de un gen bajo el control de un elemento regulador cis dado. Se conocen numerosos genes indicadores y se han usado ampliamente en el campo relevante. Una lista no limitativa de ejemplos incluye una proteína verde fluorescente (por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 38 o cualquier otra secuencia de nucleótidos que pueda codificar una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 de acuerdo con los principios de degeneración de codones), una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente azul, una proteína luciferasa, una proteína beta-galactosidasa, una proteína glutatión S-transferasa, una proteína cloranfenicol acetiltransferasa, y cualquier combinación de dos o más de las anteriores. También pueden incluirse otros indicadores. En otros ejemplos, no se incluye ningún indicador. Al detectar la expresión de una proteína indicadora, puede evaluarse la capacidad de un elemento regulador cis, o vector viral, dado para promover la transfección y/o la expresión en varios tipos de células y tejidos. Una secuencia de proteína indicadora puede aparecer inmediatamente antes del aminoácido N-terminal o inmediatamente después del aminoácido C-terminal de un péptido de Vgll4 o Vgll4-HF4A como se divulga en la presente, o puede estar separada por uno o más aminoácidos del aminoácido N- o C-terminal de un péptido de Vgll4 o Vgll4-HF4A. Un constructo puede incluir cualquier secuencia de nucleótidos para codificar cualquier proteína indicadora. Un ejemplo no limitativo de un constructo de Vgll4 que incluye una secuencia que codifica una proteína indicadora que codifica GFP es la SEQ ID NO: 39. En otro ejemplo no limitativo, la SEQ ID NO: 39 puede modificarse para reemplazar la SEQ ID NO: 41 en el mismo y la SEQ ID NO: 42 en el mismo con la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44, respectivamente, para codificar Vgll4-HF4A y una proteína indicadora de GFP.

[0051] Un vector viral o una partícula similar a un virus, como un vector de AAV, puede inyectarse en un organismo, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o mediante otros métodos para la introducción del vector en el organismo para el contacto con las células del mismo. Un vector puede ponerse en contacto con varios tipos diferentes de células y tejidos y transfectarlos. Sin embargo, la inclusión de un elemento regulador cis específico de una célula o tejido (potenciador, promotor o ambos) puede restringir la expresión del gen transfectado a un tipo o tipos de células o tejidos dados, en donde el constructo no se transcribe o está inactivo de otro modo o como mucho apenas se expresa o se expresa mínimamente en otros tipos de células. Como se ha

explicado anteriormente, un elemento regulador de cis puede incluir elementos que se sabe o se piensa que impulsan la expresión en adipocitos o células grasas, específicamente, incluso en subtipos específicos de células grasas, como predominantemente en las células BAT. Sin embargo, no es necesario que la expresión se limite absolutamente a un tipo de célula dado, incluyendo solo en células BAT, incluso bajo el control de un elemento regulador cis de Ucp1. Por ejemplo, aunque se cree que la expresión de Ucp1 está restringida a células BAT maduras, es posible que, de vez en cuando, otros tipos de células expresen un constructo cuya expresión esté influenciada por un elemento regulador cis colindante, como un potenciador, promotor o ambos de Ucp1. Sorprendentemente, en algunas circunstancias, como se divulga en la presente, un elemento regulador cis de Ucp1 puede incluir expresión en células hepáticas además de células BAT.

[0052] En un ejemplo, poner en contacto las células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia codificante para una proteína de Vgll4 o variante puede aumentar el volumen de BAT, reducir el volumen de WAT, aumentar la relación entre el volumen de BAT y el volumen de WAT o cualquier combinación de los anteriores, incluso si la expresión de Vgll4 bajo el control del elemento regulador cis no se limita estrictamente a las células BAT que contienen el transgén. En otro ejemplo, un constructo puede

[0053] En otro ejemplo, la transfección de células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia codificante para una proteína de Vgll4 o variante puede reducir el volumen de tejido adiposo del organismo. En otro ejemplo, la transfección de células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia codificante para una proteína de Vgll4 o variante puede reducir la proporción de masa de BAT con el peso corporal del organismo.

[0054] En otro ejemplo, se divulga en la presente un método para la prevención o el tratamiento de la obesidad, transfectando células de un organismo con cualquiera de los constructos anteriores divulgados en la presente, que incluyen un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 o un péptido de Vgll4-HF4A.

[0055] En otro ejemplo, la transfección de células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia codificante para una proteína de Vgll4 o variante puede reducir el volumen del hígado, el peso del hígado, el contenido de grasa intrahepática o cualquier combinación de dos o más de lo anterior, del organismo. Un contenido de grasa intrahepática de por lo menos el 5% del peso del hígado se denomina esteatosis hepática. La obesidad, o el riesgo de desarrollar obesidad, como los factores genéticos o de estilo de vida (por ejemplo, dieta rica en calorías o rica en grasas, poco ejercicio o tasa de quema de calorías, estilo de vida sedentario, etc.), son factores de riesgo para desarrollar esteatosis hepática elevada. La obesidad puede definirse como tener un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más. Un ejemplo de factor de riesgo para desarrollar obesidad puede ser tener un IMC de 25 a 29, lo que se considera sobrepeso. La esteatosis hepática prolongada es un factor de riesgo para trastornos que incluyen disfunción metabólica del hígado, inflamación y formas avanzadas de enfermedad del hígado graso no alcohólico. En la presente se divulga un método para la prevención o el tratamiento de la esteatosis hepática transfectando células de un organismo con cualquiera de los constructos anteriores divulgados en la presente que incluyen un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 o un péptido de Vgll4-HF4A.

[0056] En otro ejemplo, la transfección de células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia codificante para una proteína de Vgll4 o variante puede reducir o minimizar los niveles de glucosa en sangre o un aumento en los niveles de glucosa o la duración de dicho aumento en un organismo. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes, que incluye la desregulación patológica de los niveles de glucosa, específicamente elevaciones patológicas en los niveles de glucosa en suero o duración patológicamente elevada de los niveles de glucosa en suero elevados, como después de la ingesta de calorías, como una comida. En un ejemplo, puede medirse un aumento de la glucosa en suero después de la administración de una prueba de glucosa (es decir, consumir una solución de glucosa). Normalmente, a un aumento en la glucosa en suero le sigue a un desafío de este tipo, el cual luego vuelve al valor de referencia o casi al valor de referencia. En individuos con diabetes, sin embargo, la glucosa puede elevarse patológicamente más alta y/o durante una duración patológicamente más duradera que en individuos sin diabetes. Para los individuos con diabetes o en riesgo de desarrollar diabetes (por ejemplo, antecedentes familiares, genética u otra predisposición evidenciada por biomarcadores, obesidad, etc.), es ventajoso un tratamiento para prevenir el aumento patológico de los niveles de glucosa en suero o una extensión patológica de un aumento de los niveles de glucosa en suero, después de una comida o un desafío de glucosa. Un ejemplo de acuerdo con la presente divulgación incluye reducir o minimizar los niveles de glucosa en sangre o un aumento en los niveles de glucosa en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. Un ejemplo de acuerdo con la presente divulgación incluye prevenir el desarrollo de un aumento patológicamente alto en los niveles de glucosa en sangre o una duración patológicamente alta de un aumento en los niveles de glucosa en sangre en un organismo con diabetes o en riesgo de desarrollar diabetes al poner en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células del organismo. El organismo puede ser una persona obesa, o una persona con riesgo de desarrollar obesidad, o una persona a la que se le ha diagnosticado diabetes, o una persona con riesgo de desarrollar diabetes. Por consiguiente, un ejemplo divulgado en la presente incluye un método para la prevención o el tratamiento de la diabetes transfectando células de un organismo con cualquiera de los constructos anteriores divulgados en la

presente, incluyendo un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de Vgll4 o un péptido de Vgll4-HF4A.

[0057] En un ejemplo, también se divulga aumentar la expresión de genes mitocondriales, como genes mitocondriales implicados en la respiración mitocondrial, en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. En un ejemplo, también se divulga disminuir la expresión de genes que promueven la lipogénesis en un organismo poniendo en contacto un organismo con el constructo, como transfectando células de un organismo con el constructo. Aumentar los genes mitocondriales que promueven la respiración mitocondrial, o disminuir la expresión de genes implicados en la lipogénesis, como en BAT o células hepáticas de un organismo transfectado con un constructo como se divulga en la presente (por ejemplo, que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 y una secuencia de nucleótidos que codifica un nucleótido que codifica Vgll4 o Vgll4-HFA, como se divulga en la presente), puede incluir ventajosamente promover los niveles de BAT, disminuir la lipogénesis en células adiposas, disminuir la esteatosis hepática, o cualquier combinación de los anteriores.

[0058] Como se divulga en la presente, en un ejemplo, poner en contacto células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 colindante a una secuencia codificante de Vgll4 aumenta sorprendentemente el volumen de BAT, es decir, el volumen ocupado por las células BAT. En otro ejemplo, poner en contacto células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 colindante con una secuencia codificante de Vgll4 disminuye sorprendentemente el volumen de WAT. En otro ejemplo, poner en contacto células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 colindante a una secuencia codificante de Vgll4 aumenta sorprendentemente la proporción entre el volumen de BAT y el volumen de WAT. Un aumento en BAT impulsando la expresión de Vgll4 bajo el control de un elemento regulador cis de Ucp1, conocido por aumentar la expresión de un gen colindante en las células BAT, es particularmente inesperado dado que se sabe que el aumento de la expresión de Vgll4 promueve la apoptosis o tiene efectos antitumorales contra las células, a diferencia de otros miembros de la familia Vgll. En comparación, los niveles de Vgll3 se aumentan en las células WAT en ratones obesos, lo que sugiere que Vgll3 puede promover las células WAT, mientras que la sobreexpresión de Vgll3 inhibe la adipogénesis en general. Patente de Estados Unidos N° 8.852.939.

[0059] Como se divulga adicionalmente en la presente, en un ejemplo, poner en contacto células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 colindante a una secuencia codificante de Vgll4 o una secuencia de Vgll4-HF4A en algunos casos puede promover la expresión de Vgll4 o Vgll4-HF4A respectivamente, en el hígado.

[0060] En otro ejemplo, poner en contacto células de un organismo con una secuencia de nucleótidos que incluye un elemento regulador cis de Ucp1 colindante a una secuencia codificante de Vgll4-HF4A puede reducir sorprendentemente el volumen del tejido adiposo. En un ejemplo, se reduce un volumen de BAT. Sin limitar la presente divulgación a ningún mecanismo de acción particular, el volumen de BAT disminuido después de la transfección con tal constructo puede estar relacionada con la estimulación de la expresión de genes mitocondriales implicados en la respiración mitocondrial, la inhibición de la expresión de genes implicados en la lipogénesis, una inhibición de la lipogénesis, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores, en BAT, provocados por la transfección. En otro ejemplo, se disminuye la esteatosis hepática. Sin limitar la presente divulgación a ningún mecanismo de acción particular, la esteatosis hepática disminuida después de la transfección con tal constructo puede estar relacionada con la estimulación de la expresión de los genes mitocondriales implicados en la respiración mitocondrial, la inhibición de la expresión de genes implicados en la lipogénesis, una inhibición de la lipogénesis, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores, en el hígado, provocadas por la transfección.

EJEMPLOS

[0061] Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren realizaciones particulares de la presente divulgación, pero de ninguna manera se pretende que limiten el alcance de la misma.

Ejemplo 1: un elemento regulador cis de Ucp1 impulsa la expresión en BAT cuando se produce la transfección durante el desarrollo temprano

[0062] La FIG. 1 muestra ejemplos de polinucleótidos de acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación. El ejemplo incluye un elemento regulador cis (BCE) que incluye un potenciador de Ucp1 de ratón y un promotor de Ucp1 de ratón en sentido ascendente de una secuencia codificante de una proteína indicadora (ya sea una proteína fluorescente verde (GFP) de luciferasa de luciérnaga (Luci)). En estos ejemplos, se incluye un intrón quimérico de genes de cadena pesada de inmunoglobulina y globina b humana entre el BCE y la secuencia indicadora. La inclusión de un intrón puede aumentar la expresión de la secuencia del gen de carga útil, aquí los constructos indicadores. También se incluyen secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) en los extremos 5' y 3', que flanquean el BCE y el indicador. Los vectores virales adenoasociados se sintetizaron incorporando constructos como se ilustra para determinar la capacidad de BCE para impulsar la expresión de una secuencia codificante en sentido descendente. En un ejemplo, se construyeron vectores virales adenoasociados del serotipo 9 (AAV9) que portaban constructos como se ilustra en la FIG. 1. Los constructos incluyen un BCE que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3 y un intrón de la SEQ ID NO: 34.

[0063] La FIG. 2 ilustra el curso temporal del tratamiento de ratones con vectores virales como se ilustra en la FIG. 1 para determinar patrones de expresión de proteínas indicadoras impulsadas por BCE. A los 5 días de edad (P5), los ratones recién nacidos recibieron una inyección de AAV sc dorsal (de un AAV9 que lleva uno de los constructos que se muestran en la FIG. 1), a una dosis de 1×10^{10} copias del genoma por gramo de peso corporal, en solución salina tamponada con fosfato. A los 42 días después del nacimiento (P42), se evaluó la bioluminiscencia para determinar la expresión de proteínas marcadoras. La expresión se determinó mediante un sistema de imagenología in vivo (IVIS™, Perkin Elmer) como se muestra en las FIGS. 3 (vista dorsal) y 4 (vista ventral), así como por micro exploración CT para mostrar patrones de expresión topográfica, como se muestra en la FIG. 5. Primero se tomaron imágenes de los sujetos transducidos con AAV9.BCE.luci para bioluminiscencia y luego se exploraron con micro CT, con AAV9.BCE.GFP sirviendo como control. En la FIG. 5, los orígenes de la señal de bioluminiscencia se emparejaron con los tejidos mapeados por micro CT (rosa = tejido adiposo marrón, azul o rojo = tejidos con señal de bioluminiscencia positiva). La expresión se elevó específicamente en BAT, lo que demuestra la expresión específica de BAT impulsada por el elemento regulador cis de BCE después de la transfección durante el período neonatal.

[0064] Como se muestra en las FIGS. 6 y 7, los tejidos adiposos interescapulares (es decir, en la región donde está localizado el BAT) se recogieron en el día postnatal 60 y se usaron para la tinción de inmunofluorescencia. La FIG. 6 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia de BAT interescapular (usando imagenología UCP1 para identificar células BAT), y la FIG. 7 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia tanto de BAT como de tejido adiposo blanco (usando la tinción de perilipina para marcar el tejido adiposo, tanto de BAT como de WAT). La tinción nuclear DAPI también se muestra en la FIG. 6 y la expresión de GFP se usó para teñir células con expresión de indicador impulsada por BCE en animales tratados con AAV.BCE.GFP (con el tratamiento de AAV.BCE.Luci sirviendo como control). Barra = 200 μ m. BCE impulsó la expresión de la proteína indicadora en los adipocitos y, en particular, en BAT.

[0065] La FIG. 8 muestra una vista esquemática de un constructo de pAAV.BCE.Vgll4-GFP administrada a través de un portador de AAV9. El constructo se asemeja a la que se muestra en la FIG. 1 excepto que Vgll4-GFP es la secuencia codificante cuya expresión está impulsada por BCE en lugar de simplemente por GFP o luciferasa. La secuencia del transcrito BCA-intrón-Vgll4-GFP es la SEQ ID NO: 39, y es un polinucleótido que incluye un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de tipo 4 vestigial, en donde el elemento regulador cis incluye un potenciador de la proteína de desacoplamiento 1 y un promotor de la proteína de desacoplamiento 1. Un intrón está presente entre el elemento regulador cis y la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de tipo 4 vestigial. El constructo se empaquetó en un vector viral adenoasociado (AAV9) para la transfección de células de un organismo con el constructo.

[0066] La FIG. 9 ilustra el curso temporal del tratamiento de ratones con vectores virales como se ilustra en la FIG. 8 para determinar los efectos sobre el volumen del tejido adiposo. En el día postnatal 5 se les inyectó dorsalmente sc a los ratones AAV (AAV9.BCE.Vgll4-GFP, o AAV9.BCE.GFP, que lleva el constructo mostrado en la FIG. 1, como control), a una dosis de 1×10^{10} copias del genoma por gramo de peso corporal, en solución salina tamponada con fosfato. En el día postnatal 42, se tomó una exploración micro CT para medir el volumen de tejido adiposo intraescapular, usando el software de exploración de micro CT disponible comercialmente (analyze 12™). El tejido adiposo intraescapular fue diferenciable del tejido colindante, y BAT fue diferenciable de WAT, debido a las diferencias en las unidades Hounsfield asociadas con diferentes tipos de tejido de acuerdo con las técnicas estándar de exploración por micro TC. En las FIGS. 10 (control) y 11 (para un sujeto inyectado con AAV9.BCE.Vgll4-GFP) se muestra una exploración ejemplar. BAT y WAT son como se indica. Puede observarse un aumento del volumen de BAT y una disminución del volumen de WAT después de la expresión de Vgll4 impulsada por BCE.

[0067] El volumen de BAT se midió como se representa gráficamente en la FIG. 12. En sujetos con expresión de Vgll4 impulsada por BCE, el volumen de BAT fue una media de $102,2 \pm 2,8$ mm³, en comparación con $84,2 \pm 1,9$ mm³ en los controles (* = $p < 0,05$). El volumen WAT se midió como se representa gráficamente en la FIG. 13. En sujetos con expresión de Vgll4 impulsada por BCE, el volumen de WAT fue una media de $27,1 \pm 0,6$ mm³, en comparación con $40,0 \pm 2,8$ mm³ en los controles (** = $p < 0,01$). La proporción de volumen BAT/WAT se midió como se representa gráficamente en la FIG. 14. En sujetos con expresión de Vgll4 impulsada por BCE, la proporción de volumen de BAT/WAT fue una media de $3,8 \pm 0,6$ mm³, en comparación con $40,0 \pm 2,8$ mm³ en los controles (** = $p < 0,01$). Por tanto, la transfección de células de un organismo con un constructo que incluye un elemento regulador cis que impulsa la expresión de Vgll4, en donde el elemento regulador cis incluye un potenciador de proteína de desacoplamiento 1 y un promotor de proteína de desacoplamiento1, aumentó el volumen de BAT, disminuyó el volumen de WAT y aumentó una proporción de volumen de BAT a volumen de WAT.

Ejemplo 2: un elemento regulador cis de Ucp1 impulsa la expresión en BAT e hígado cuando la transfección se produce durante la edad adulta.

[0068] Se administró un vector AAV (AAV9) que contenía un constructo con un elemento regulador cis de BCE (SEQ ID NO: 3) que impulsaba la expresión de luciferasa (AAV.BCE.Luci) a ratones de 6 semanas de edad. En otros ratones, el elemento regulador cis (MiniUcp1) incluía un potenciador de Ucp1 (SEQ ID NO: 4) pero no un promotor de Ucp1 (AAV.MiniUcp1.Luci). Los sujetos fueron evaluados para las señales de luciferasa una semana después. Los resultados se ilustran en las FIGS. 15-18. Ambos BAT (FIG. 16) e hígado (FIG. 17) tenían señales de luciferasa, con

el elemento regulador cis de BCE impulsando una expresión hepática más alta que MiniUcp1. AAV.BCE.Luci impulsa la expresión en el hígado cuando la transfección se produce más tarde en el desarrollo, como en la edad adulta. La FIG. 18 muestra que BAT y el hígado incluían copias del genoma del vector viral, según se evalúa por PCR en tiempo real.

[0069] AAV tiene muy pocas posibilidades de integrarse en el genoma de la célula huésped, existiendo principalmente como episomas en las células huésped. Si las células huésped proliferan rápidamente, las células descendientes pueden perder fácilmente el número de copias de AAV. En las células quiescentes del ciclo celular, por el contrario, las AAV coexisten hasta que mueren las células. Durante el desarrollo, como en los recién nacidos, los hepatocitos proliferan rápidamente, mientras que las BAT son en su mayoría células quiescentes del ciclo celular. Sin querer estar limitados a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, durante el crecimiento de las crías transducidas por AAV.BCE.Luci, los hepatocitos, pero no los adipocitos marrones, pueden haber eliminado AAV, lo que podría explicar por qué las señales de luciferasa solo pueden detectarse en la BAT pero no en el hígado después de la transfección temprana en el desarrollo (como en el Ejemplo 1). En los ratones adultos transducidos con AAV.BCE.Luci del presente Ejemplo (Ejemplo 2), las BAT y los hepatocitos no proliferaron activamente, y se detectaron señales de luciferasa en ambos tejidos.

Ejemplo 3. La vía Hippo-YAP

[0070] La vía de señalización Hippo-YAP es bien conocida por controlar el crecimiento de órganos. En los mamíferos, la cascada Hippo quinasa incluye MST1/2, LATS1/2 y la proteína de andamiaje Salvador (Say). La activación de estas cinasas da como resultado la fosforilación e inactivación de YAP y WWTR1 (conocido más comúnmente como TAZ), coactivadores transcripcionales ortólogos que son efectores terminales de esta vía. YAP/TAZ interactúan con los factores de transcripción de la familia TEAD para regular en sentido descendente la expresión de genes objetivo. Tipo 4 vestigial (VGLL4) es otro factor cotranscripcional que sirve como supresor de un complejo YAP-TEAD. Mecánicamente, VGLL4 se une directamente a TEAD a través de sus dos dominios TONDU (TDU), y la unión de VGLL4 o YAP a TEAD es mutuamente excluyente (FIG. 19).

[0071] Cada dominio TDU de VGLL4 tiene dos residuos de ácido animal esenciales (HF) que median la interacción VGLL4-TEAD (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente). El reemplazo de los HF en los dominios TDU con cuatro residuos de alanina (FIG. 20) minimiza la interacción entre VGLL4 y TEAD. A diferencia de VGLL4, VGLL4-HF4A no suprime un complejo YAP-TEAD (FIG. 21). YAP/TAZ puede promover la termogénesis de BAT, elevando la posibilidad de manipular esta vía para reducir la obesidad.

Ejemplo 3. TEAD1 regula directamente la expresión de Fgf21

[0072] Se ha demostrado con anterioridad que los ratones knockout YAP y TAZ dobles heterocigotos tienen un BAT mucho más pequeño que sus controles de compañeros de camada a las cuatro semanas después del nacimiento. En la vía Hippo-YAP, YAP/TAZ interactúa con las proteínas TEAD para regular la expresión en sentido descendente de los objetivos. Por tanto, TEAD1 puede regular el crecimiento posnatal de BAT. Como se divulga en la presente, se cruzaron ratones transgénicos Ucp1::Cre con el alelo flox Tead1 para eliminar específicamente Tead1 en el BAT (FIG. 22). El agotamiento de TEAD1 en BAT de ratones Tead1 cKO se confirmó mediante transferencia Western (FIG. 23). En comparación con los controles, los ratones Tead1 cKO tenían depósitos BAT interescapulares más pequeños (FIGS. 24 y 25). La inactivación de TEAD1 en los adipocitos marrones disminuyó significativamente la expresión de Fgf21 en BAT (FIG. 26). Los datos de secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina demostraron que TEAD1 se une directamente a la región promotora de Fgf21 (FIG. 27). El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es una mioquina importante que regula el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

Ejemplo 4. La activación de VGLL4 reduce la adiposidad

[0073] BAT desempeña un papel importante en la termogénesis sin temblores y la homeostasis energética. Como se divulga en la presente, la sobreexpresión de VGLL4 mediada por AAV aumentó el volumen de BAT. Para demostrar si la activación de VGLL4 en un modelo de obesidad (ratones alimentados con una dieta rica en grasas) reduciría el peso corporal, AAV.BCE.VGLL4 (incluyendo SEQ ID NO: 39) en ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas, y se monitorizó su peso corporal durante 7 semanas (FIG. 28). Los controles recibieron AAV con luciferasa controlada por el elemento regulador cis (SEQ ID NO: 3). 8 semanas después de la administración de AAV, las señales de luciferasa se detectaron fácilmente en los ratones transducidos con AAV.BCE.luci (FIG. 29). Los valores de peso corporal y ganancia de peso corporal no eran distinguibles entre los ratones de control y los tratados con VGLL4 (FIGS. 30 y 31). Sin embargo, usando micro CT, se midió el volumen de tejido adiposo y no adiposo (masa magra). 4 semanas después de la transducción de AAV, aunque la ganancia de peso corporal fue similar entre los ratones control y VGLL4, los ratones de control, pero no los de VGLL4, mostraron un aumento significativo en la masa de tejido adiposo. Por otro lado, los ratones de VGLL4 pero no los de control tuvieron un aumento significativo de masa magra. Por consiguiente, 4 semanas después de la infusión de AAV, los ratones de VGLL4 tenían una proporción de prueba grasa/magra más baja que la de los ratones de control (FIG. 32A-C). La transferencia Western mostró que se expresó VGLL4 exógeno en BAT de ratones transducidos con AAV.BCE.VGLL4 (no mostrado).

[0074]

Ejemplo 5. AAV.BCE.VGLL4 mitiga la ganancia de peso corporal

[0075] Para demostrar si la activación de VGLL4 en ratones normales evitaría o mitigaría la progresión de la obesidad, se administró AAV.BCE.VGLL4 (incluyendo la SEQ ID NO: 39) a ratones de 8 semanas de edad. Comenzando 1 semana después de la inyección, los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas (FIG. 33A). Al final de las 13 semanas de tratamiento con dieta rica en grasas, el peso corporal de los ratones VGLL4 fue menor que el de los ratones de control, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística (FIG. 33B). Comenzando desde la semana 5, sin embargo, los ratones VGLL4 tuvieron una ganancia de peso corporal acumulada significativamente menor que la de los de control (FIG. 33C). Como se divulga en la presente (Ejemplo 2), AAV.BCE.VGLL4 se dirige tanto a BAT como al hígado cuando se administra más tarde en el desarrollo, como en la edad adulta. Fgf21 es un objetivo de TEAD1 (FIGS. 26 y 27), y es producido principalmente por el hígado y el tejido adiposo. Por lo tanto, se midió la expresión de VGLL4 y Fgf21 en el hígado. VGLL4 se sobreexpresó en el hígado y Fgf21 disminuyó significativamente en el hígado de ratones VGLL4 (FIG. 33D).

Ejemplo 6. AAV.BCE.VGLL4HF4A aumenta la expresión de genes mitocondriales BAT

[0076] Como se divulga en la presente, la expresión de VGLL4 impulsada por un elemento regulador cis de Ucp1 mitigó la ganancia de peso corporal, también suprimió la expresión de Fgf21, que es importante para el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, VGLL4 puede tener múltiples funciones, interactuando con TEAD1 para disminuir la expresión de Fgf21, a la vez que también interactúa con otros factores desconocidos para mejorar el gasto de energía. Sin querer estar limitados por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, esta posibilidad puede indicar por qué VGLL4 puede mitigar la ganancia de peso corporal sin mejorar el metabolismo de la glucosa. Se creó un vector de AAV.BCE.VGLL4HF4A, que expresa un VGLL4 mutado que no interactúa con TEAD (mutaciones de HF4A), que incluye la SEQ ID NO: 36, y también incluye una proteína indicadora de GFP (SEQ ID NO: 40). Ratones normales de 8 semanas de edad recibieron una inyección subcutánea de AAV.BCE.VGLL4HF4A, lo que dio como resultado la transfección de BAT (FIGS. 34A y B). Los resultados de qRT-PCR mostraron que la sobreexpresión de VGLL4HF4A no afectó a la expresión de Fgf21 pero redujo la expresión de Cidea y Fasn (FIG. 34C), que son dos genes implicados en la lipogénesis, en BAT. Además, VGLL4HF4A aumentó la expresión de Cox2 (Subunidad II de Citocromo C Oxidasa, codificada por MT-CO2) y Cox6a2 (Subunidad 6A2 de Citocromo C Oxidasa) en BAT (FIG. 34D). Estos datos indican que VGLL4HF4A puede aumentar la actividad de la respiración mitocondrial sin afectar a la expresión de Fgf21 y también reducir la lipogénesis.

Ejemplo 7. AAV.BCE.VGLL4HF4A mitiga la ganancia de peso corporal y reduce el nivel de glucosa en suero.

[0077] Se inyectó sc AAV.BCE.VGLL4HF4A (incluyendo la SEQ ID NO: 36) en la región interescapular de ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad, a una dosis de 2x10⁹ GC/gramo de peso corporal. Se usó AAV.BCE.GFP como control. Una semana después de la inyección del virus, comenzaron 12 semanas de alimentación con dieta rica en grasas (HFD) (FIG. 35A). Durante el tratamiento con HFD, la tasa de ganancia de peso corporal de los ratones AAV.BCE.VGLL4HF4A (VGLL4HF4A) fue más lenta que la de los ratones AAV.BCE.GFP, y la diferencia alcanzó significancia 9 semanas después del tratamiento con HFD (FIG. 35B). 11 semanas después del tratamiento con dieta rica en grasas, el peso corporal de los ratones AAV.BCE.VGLL4HF4A comenzó a ser significativamente más bajo que el de los ratones AAV.BCE.GFP (FIG. 35C). Una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) mostró que el nivel de glucosa en suero privado de alimento y el nivel máximo de glucosa después del desafío con glucosa fueron significativamente más bajos en los ratones AAV.BCE.VGLL4HF4A (FIG. 35D).

Ejemplo 8. AAV.BCE.VGLL4HF4A reduce el peso de BAT

[0078] En comparación con la de los ratones de control GFP, la masa de BAT fue significativamente menor en los ratones VGLL4HF4A (FIG. 36A). qRT-PCR confirmó que VGLL4 estaba sobreexpresado en el BAT de ratones VGLL4HF4A (FIG. 36B). La expresión de Ucp1 no se vio afectada por VGLL4HF4A (FIG. 36C). También se midieron los niveles de expresión de tres genes más que regulan la actividad respiratoria de las mitocondrias en BAT: Cox2, Cox6a, Ndufsa8. Cox2 se reguló por incremento significativamente en BAT de VGLL4HF4A (FIG. 36D). VGLL4HF4A también suprimió la expresión de Acc1, un gen implicado en la síntesis de ácidos grasos (FIG. 36E). Por lo tanto, VGLL4HF4A puede preservar la función de BAT tanto aumentando la actividad respiratoria de las mitocondrias como atenuando la síntesis de ácidos grasos.

Ejemplo 9. AAV.BCE.VGLL4HF4A reduce el peso del hígado y la síntesis de ácidos grasos.

[0079] Un elemento regulador de BCE cis que incluye un potenciador de Ucp1 y un promotor de Ucp1, como se divulga en la presente, impulsa la expresión génica en el hígado cuando se transfectan sujetos adultos, como se divulga en la presente. Curiosamente, el peso del hígado de los ratones VGLL4HF4A fue significativamente menor que el de los ratones de control GFP (FIG. 37A). qRT-PCR confirmó que VGLL4 se sobreexpresaba fuertemente en el hígado de ratones VGLL4HF4A (FIG. 37B). La histología determinada por tinción con hematoxilina y eosina (H&E) mostró una acumulación moderada de gotitas de lípidos y microesteatosis (FIG. 37C). La tinción con aceite rojo confirmó que el hígado VGLL4HF4A tenía mucha menos acumulación de gotitas de lípidos que el hígado de control GFP (FIG. 37D). La expresión de los genes de síntesis de ácidos grasos Acc1 y Fasn en el hígado se redujo

significativamente por VGLL4HF4A (FIG. 37E). VGLL4HF4A puede prevenir patologías hepáticas inducidas por HFD, como disfunción metabólica hepática, inflamación o enfermedad del hígado graso no alcohólico.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido, que comprende
un elemento regulador cis y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína tipo 4 vestigial, en donde
el elemento regulador cis comprende un potenciador de la proteína 1 de desacoplamiento y un promotor de
la proteína 1 de desacoplamiento.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde el potenciador de la proteína de desacoplamiento 1 tiene por lo
menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO 4 y la SEQ ID NO:
7.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el promotor de la proteína 1 de
desacoplamiento tiene por lo menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 2, la
SEQ ID NO 5 y la SEQ ID NO: 8.
4. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el elemento regulador cis tiene por lo menos
un 90% de homología con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 9.
5. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína tipo 4 vestigial tiene por lo menos
un 90% de homología con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la
SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la
SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33.
6. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína tipo 4 vestigial se selecciona de
la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la
SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33.
7. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia que codifica una proteína tipo
4 vestigial tiene por lo menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID
NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO:
24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, y la SEQ ID NO: 32.
8. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia que codifica una proteína tipo
4 vestigial se selecciona de la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID
NO: 18, SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO:
30 y la SEQ ID NO: 32.
9. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 7, en donde la proteína tipo 4 vestigial tiene de 0 a 3
sustituciones en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID
NO: 17, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 21, en donde las sustituciones no están en un dominio TDU.
10. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 7, en donde la proteína tipo 4 vestigial tiene de 0 a 3
sustituciones en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID
NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33, en donde las sustituciones no están en un dominio TDU.
11. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un intrón entre el elemento
regulador cis y la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de tipo 4 vestigial.
12. El polinucleótido de la reivindicación 10, en donde el intrón tiene por lo menos un 90% de homología con la SEQ
ID NO: 34.
13. El polinucleótido de la reivindicación 11, en donde el intrón es la SEQ ID NO: 34.
14. Un vector viral que comprende un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. El vector viral de la reivindicación 14, en donde el vector viral comprende un vector asociado a adenovirus.
16. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el vector viral de la reivindicación 13 o 14 para su
uso como medicamento.

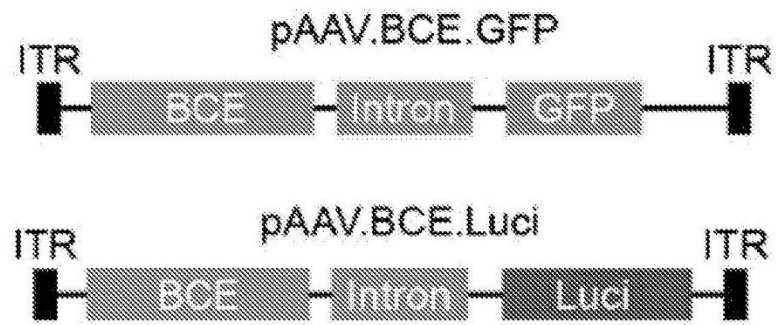


FIG. 1

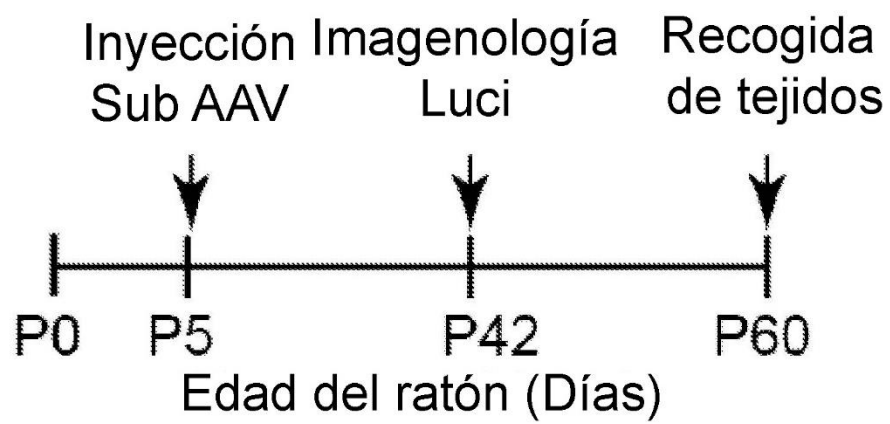


FIG. 2

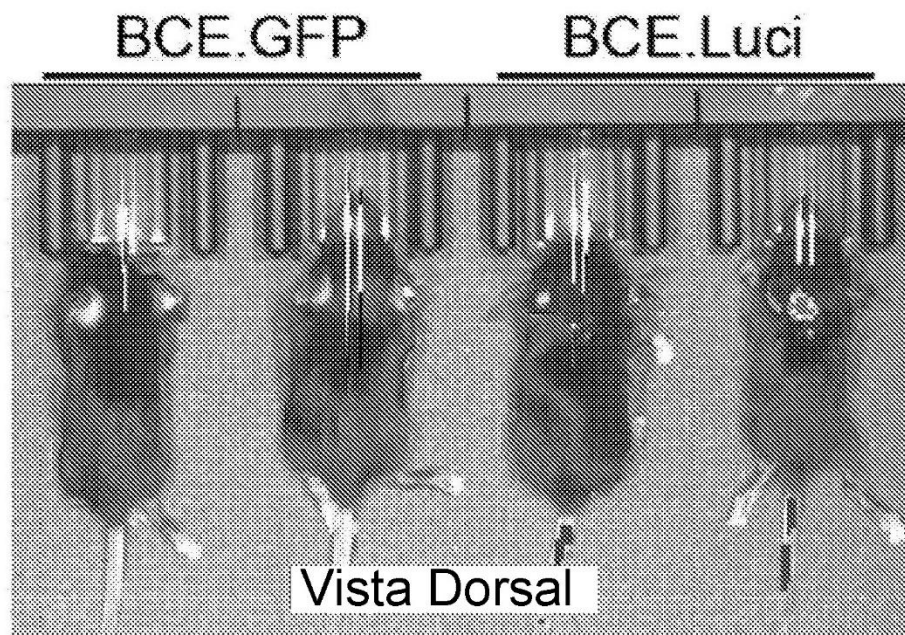


FIG. 3

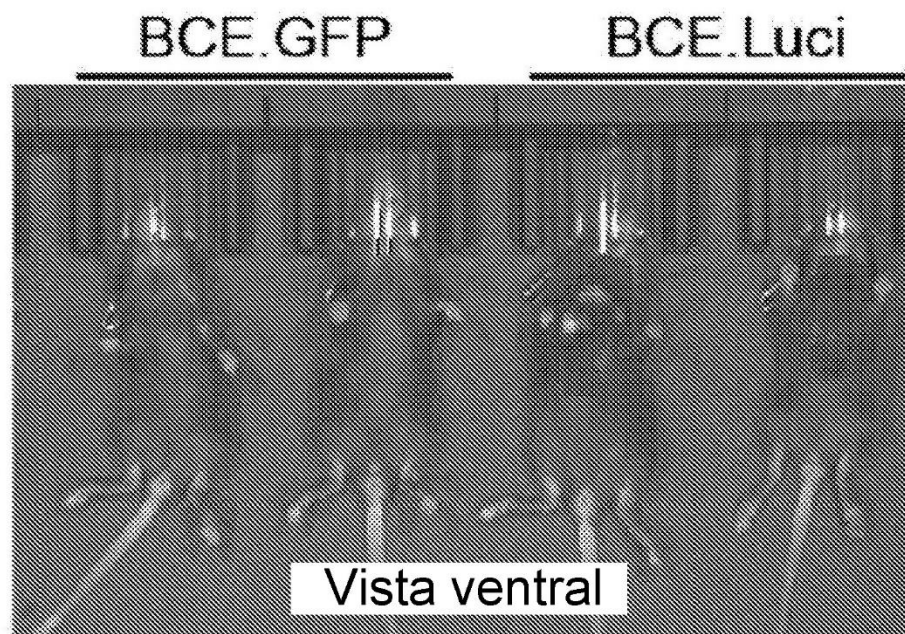


FIG. 4

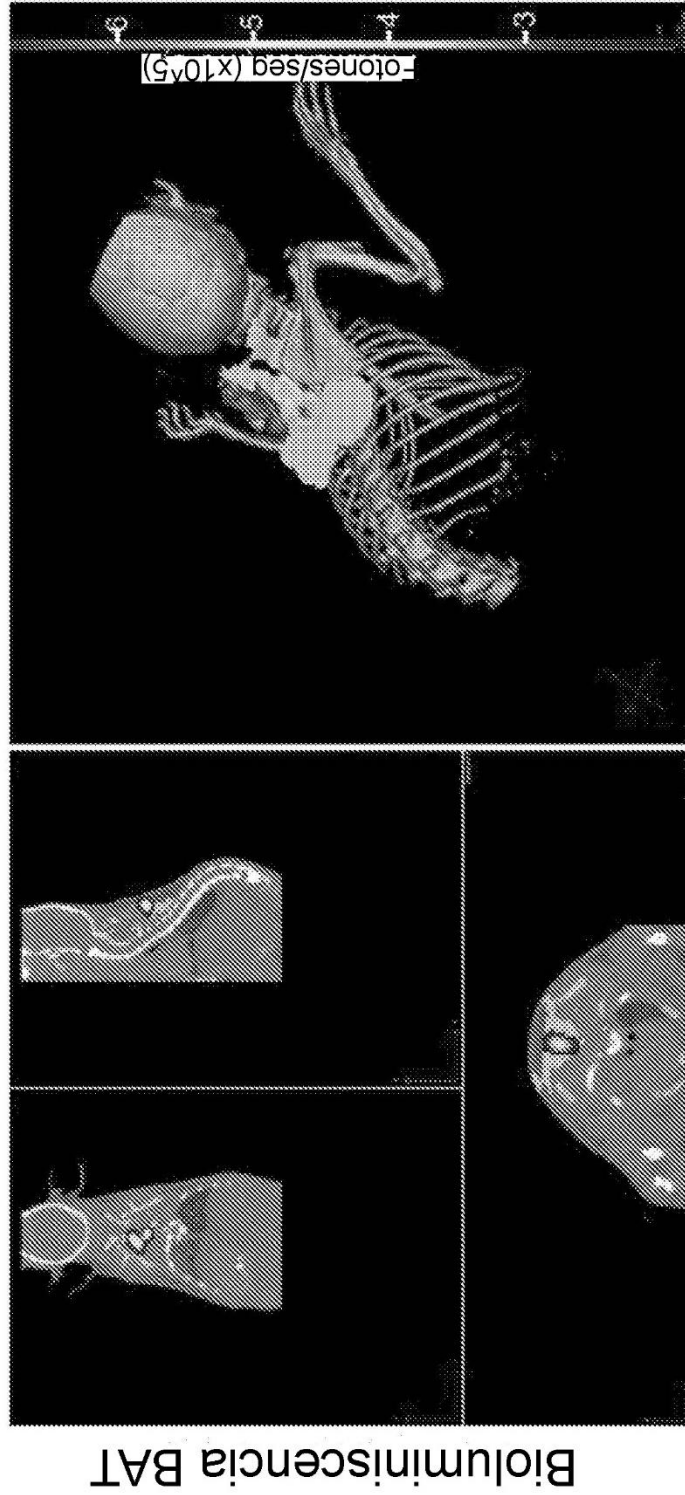


FIG. 5

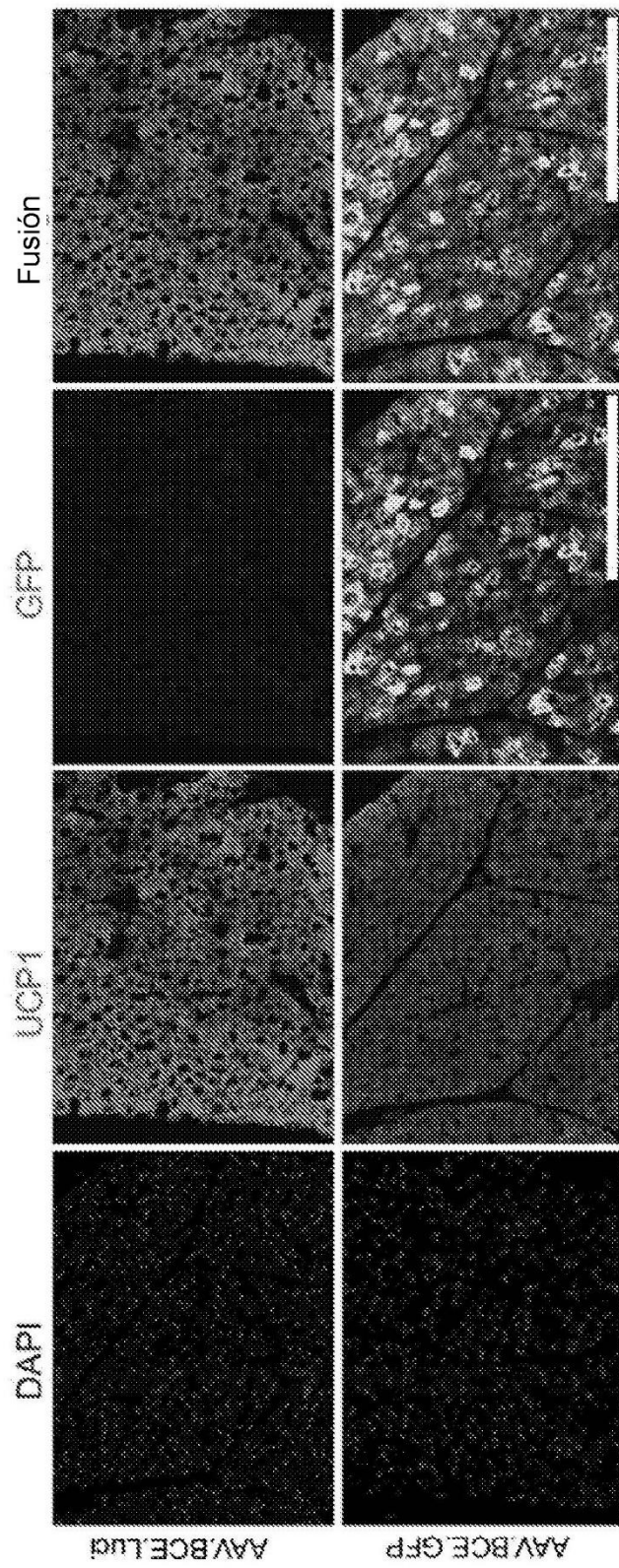


FIG. 6

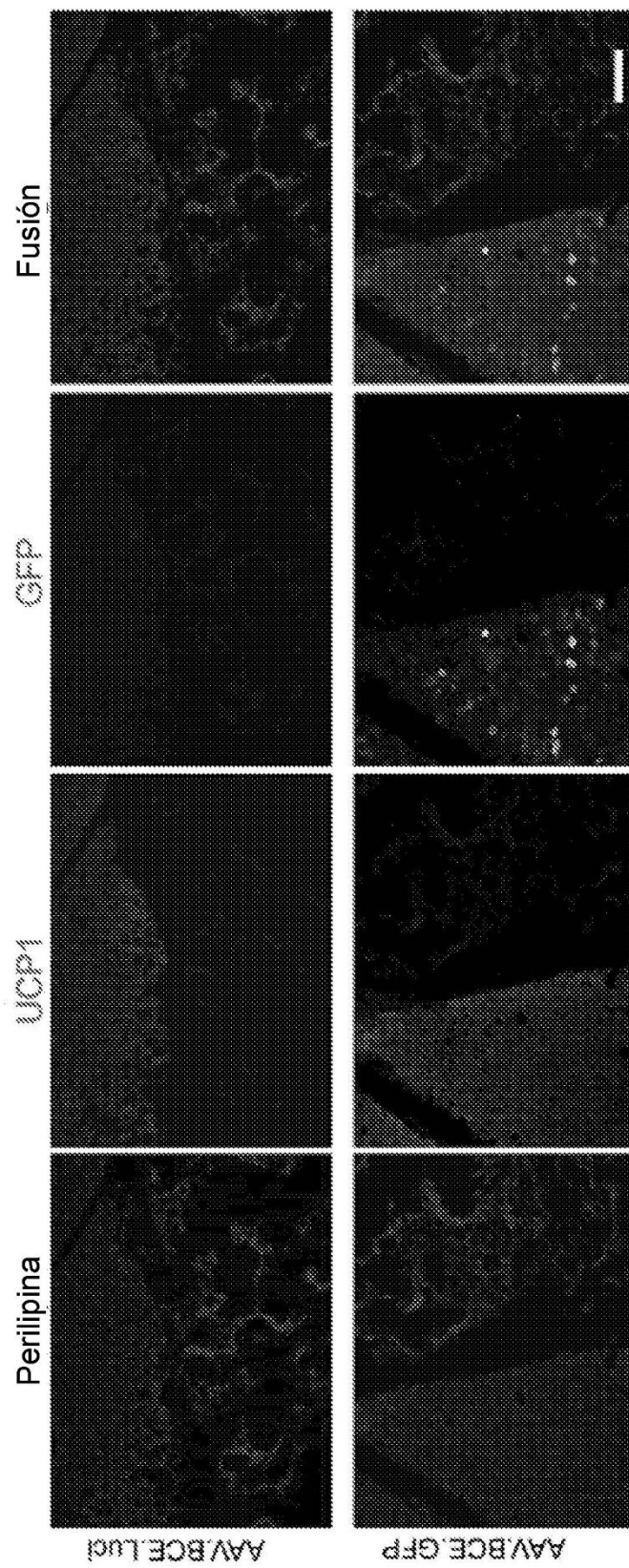


FIG. 7

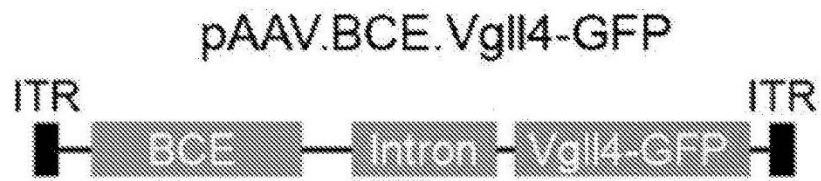


FIG. 8

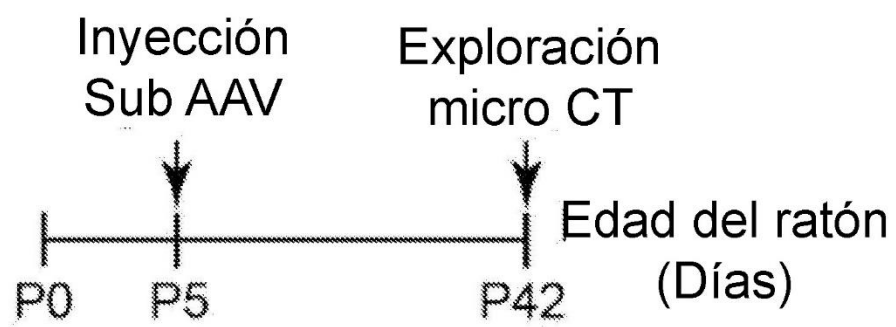


FIG. 9

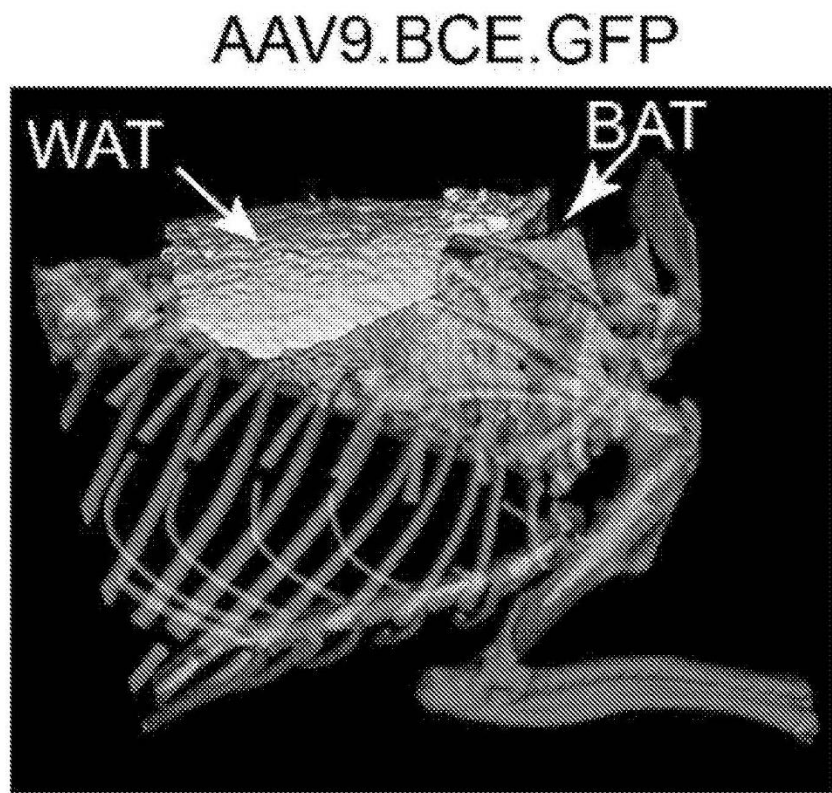


FIG. 10

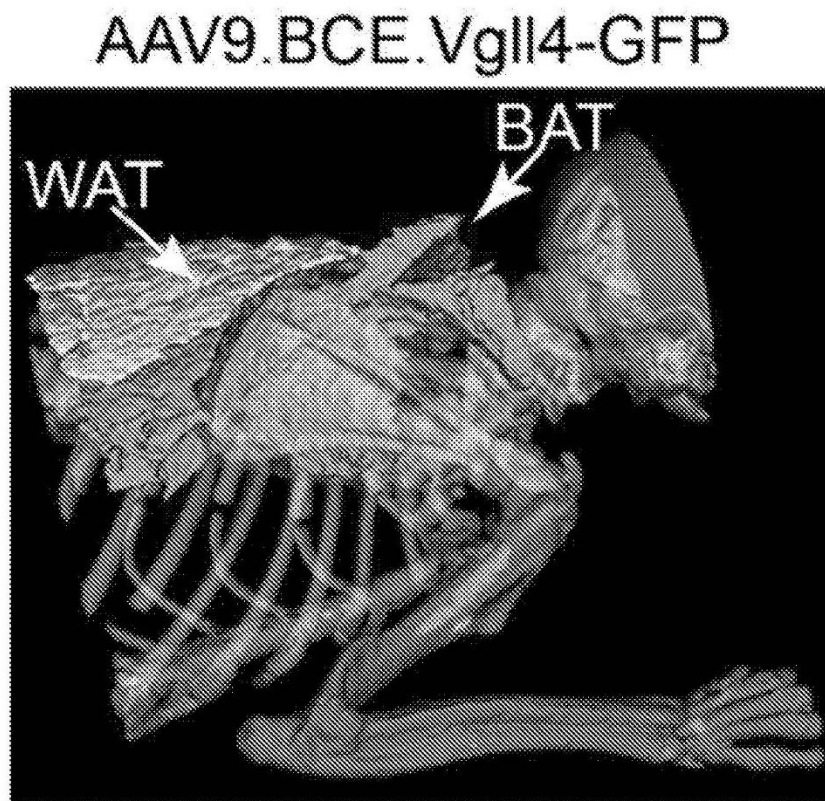


FIG. 11

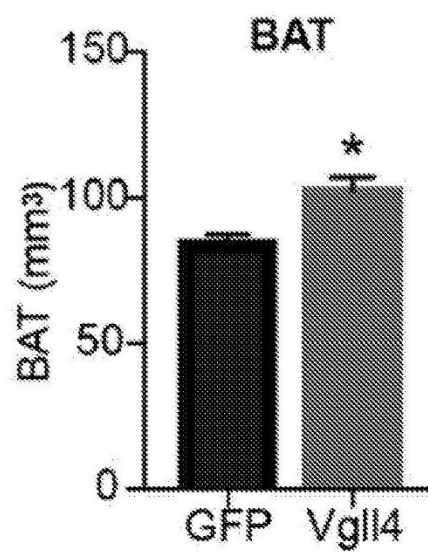


FIG. 12

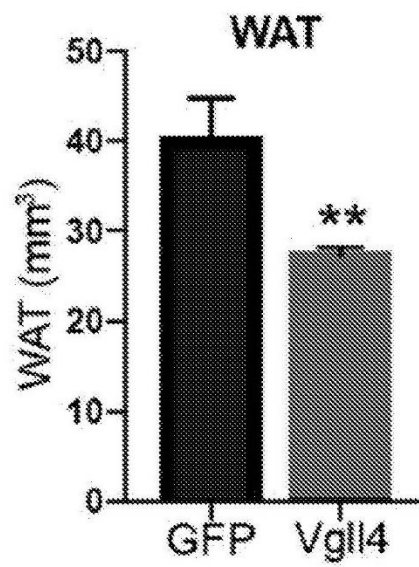


FIG. 13

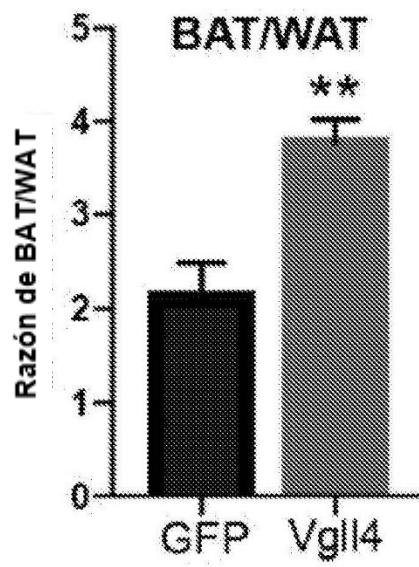


FIG. 14

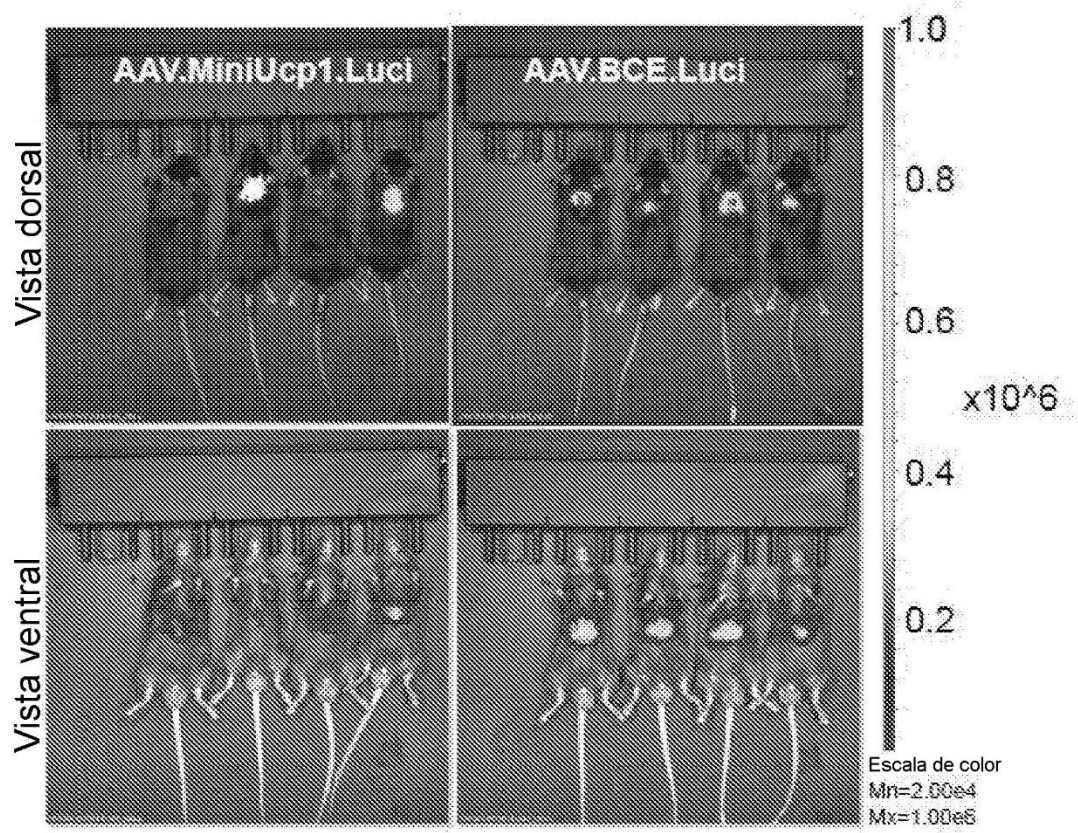


FIG 15

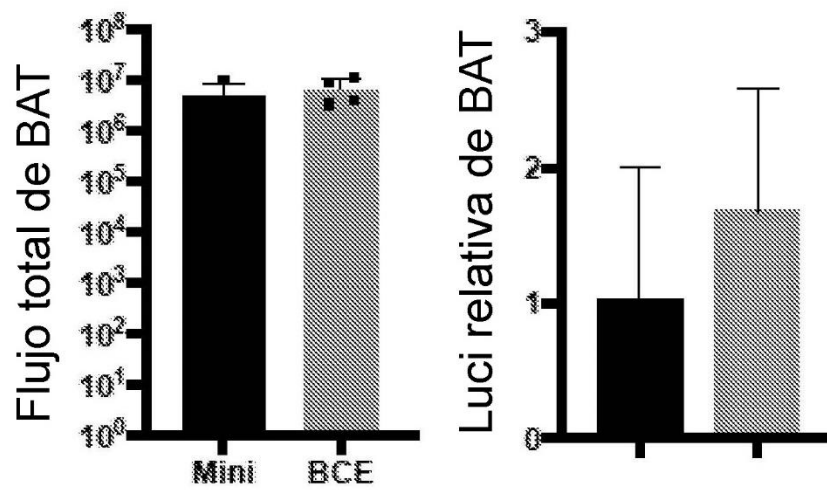


FIG. 16

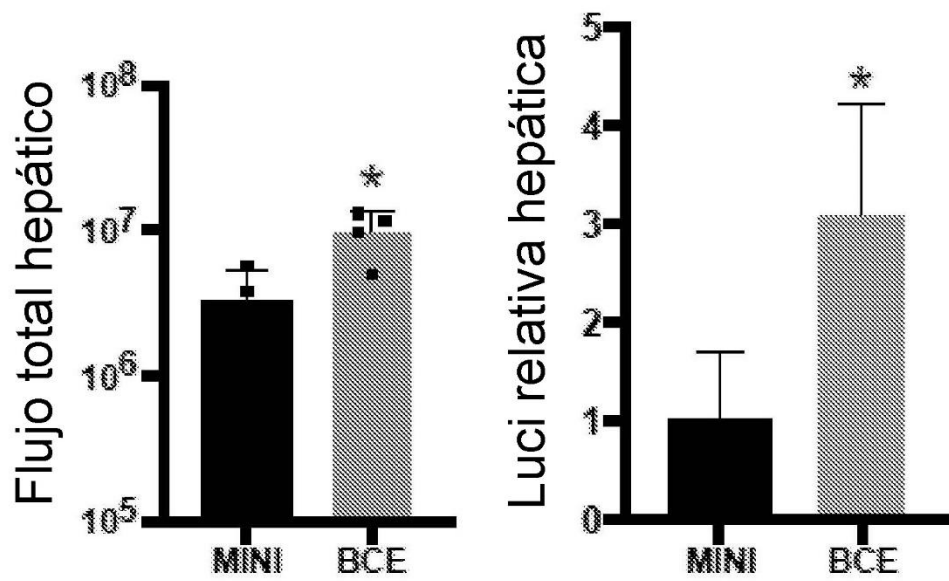


FIG. 17

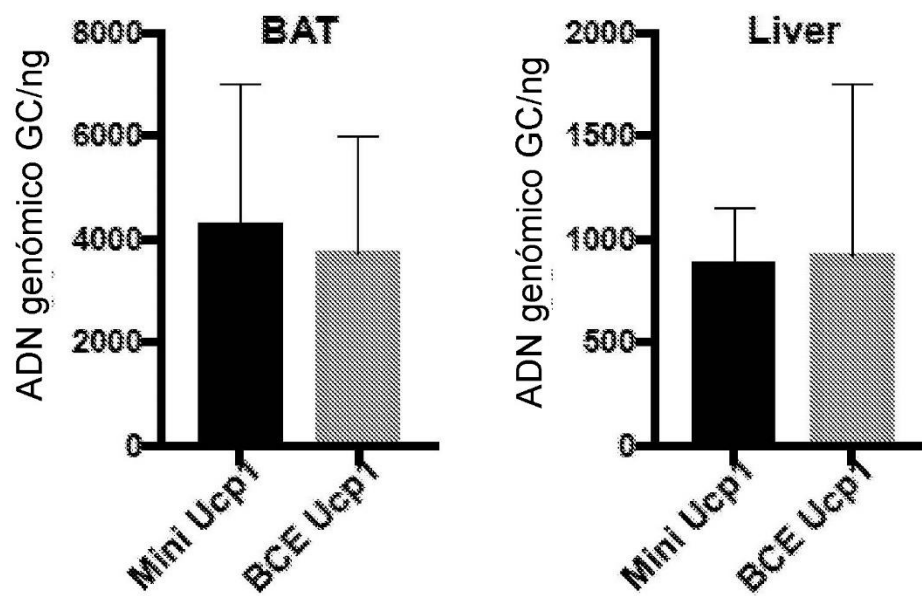


FIG. 18

Via Hippo-YAP

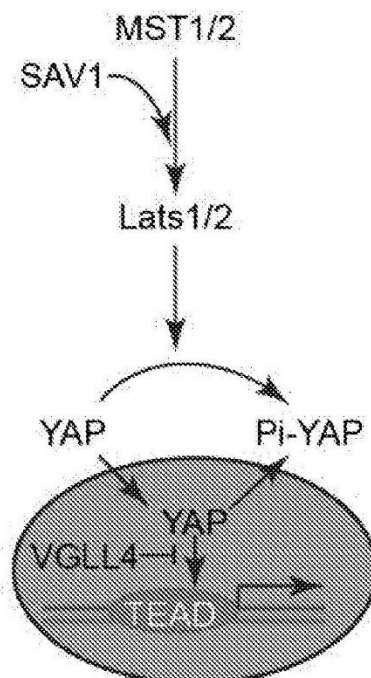


FIG. 19

	TDU_1	TDU_2
hVGLL4	DPVVEEHFRRSLGKNY...	TGSVDDHFAKALGDTW
hVGLL4 ^{HF4A}	DPVVEEAARRSLGKNY...	TGSVDDAAAKALGDTW

hVGLL4 TDU_1: SEQ ID NO: 41
hVGLL4 TDU_2: SEQ ID NO: 42
hVGLL4-HF4A TDU_1: SEQ ID NO: 43
hVGLL4-HF4A TDU_2: SEQ ID NO: 44

FIG. 20



FIG. 21

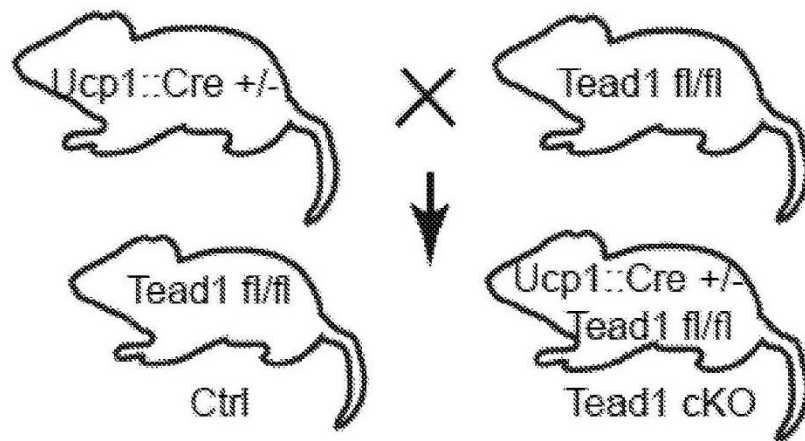


FIG. 22

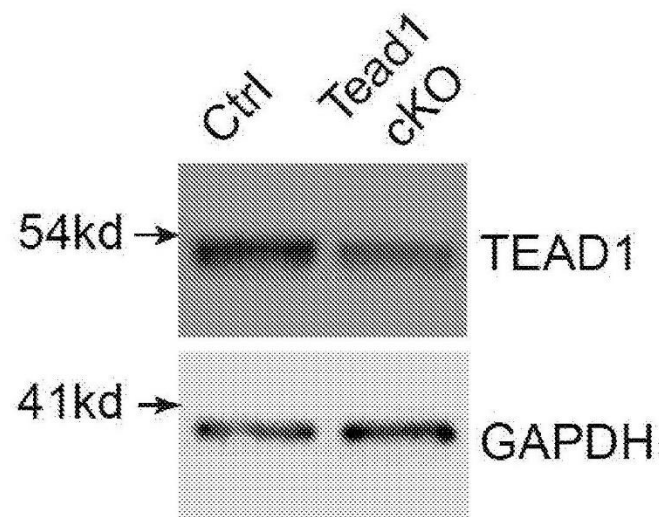


FIG. 23

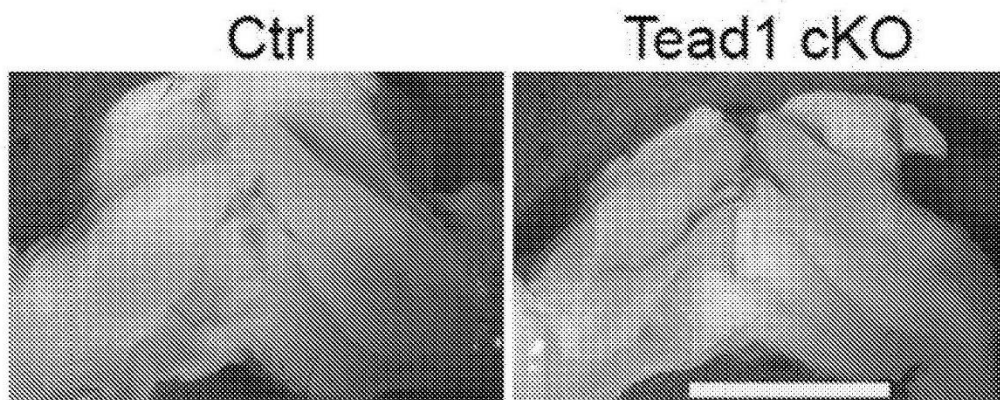


FIG. 24

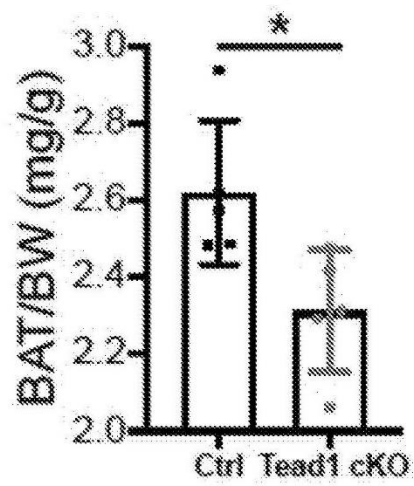


FIG. 25

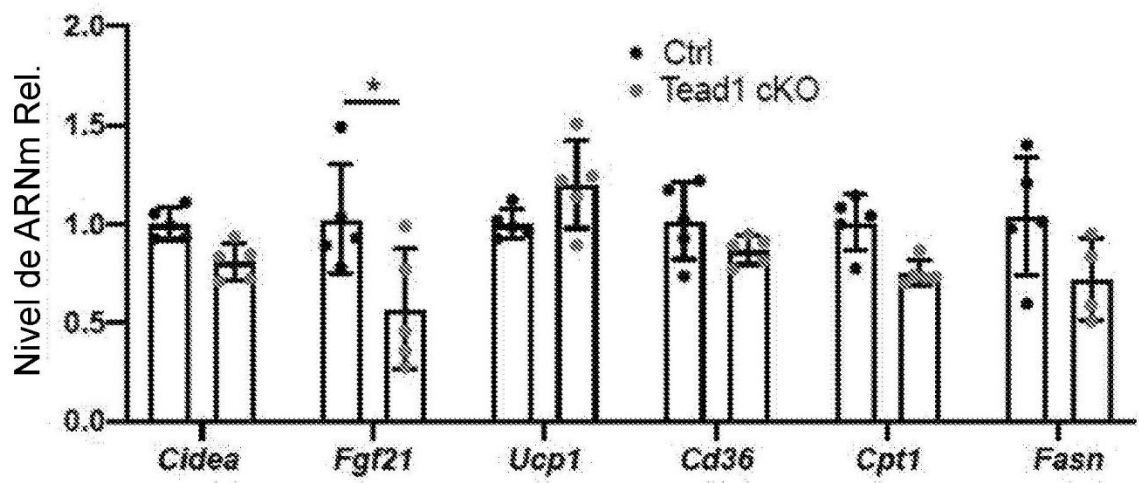


FIG. 26

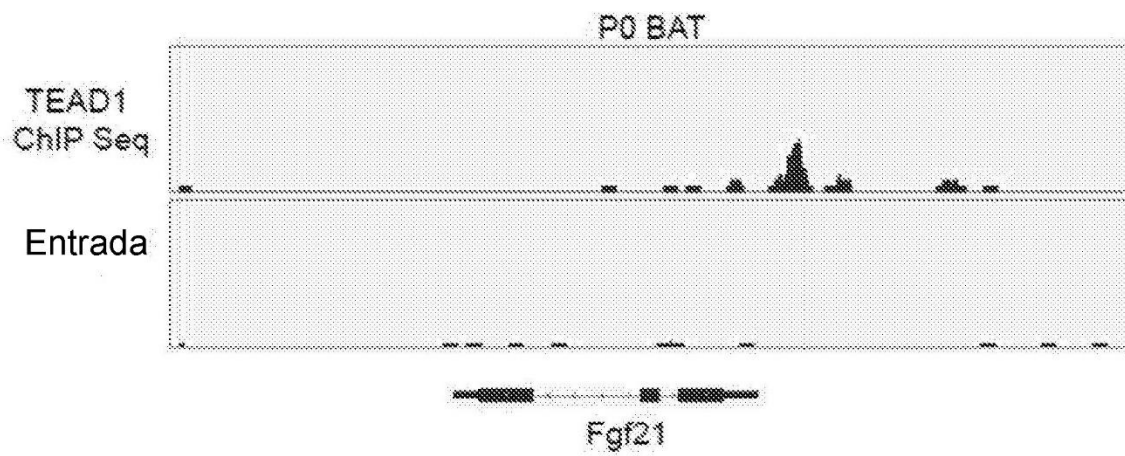


FIG. 27

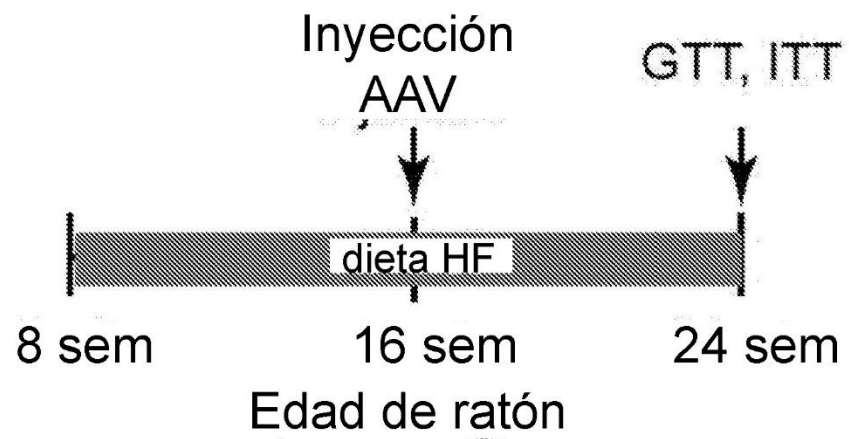


FIG. 28

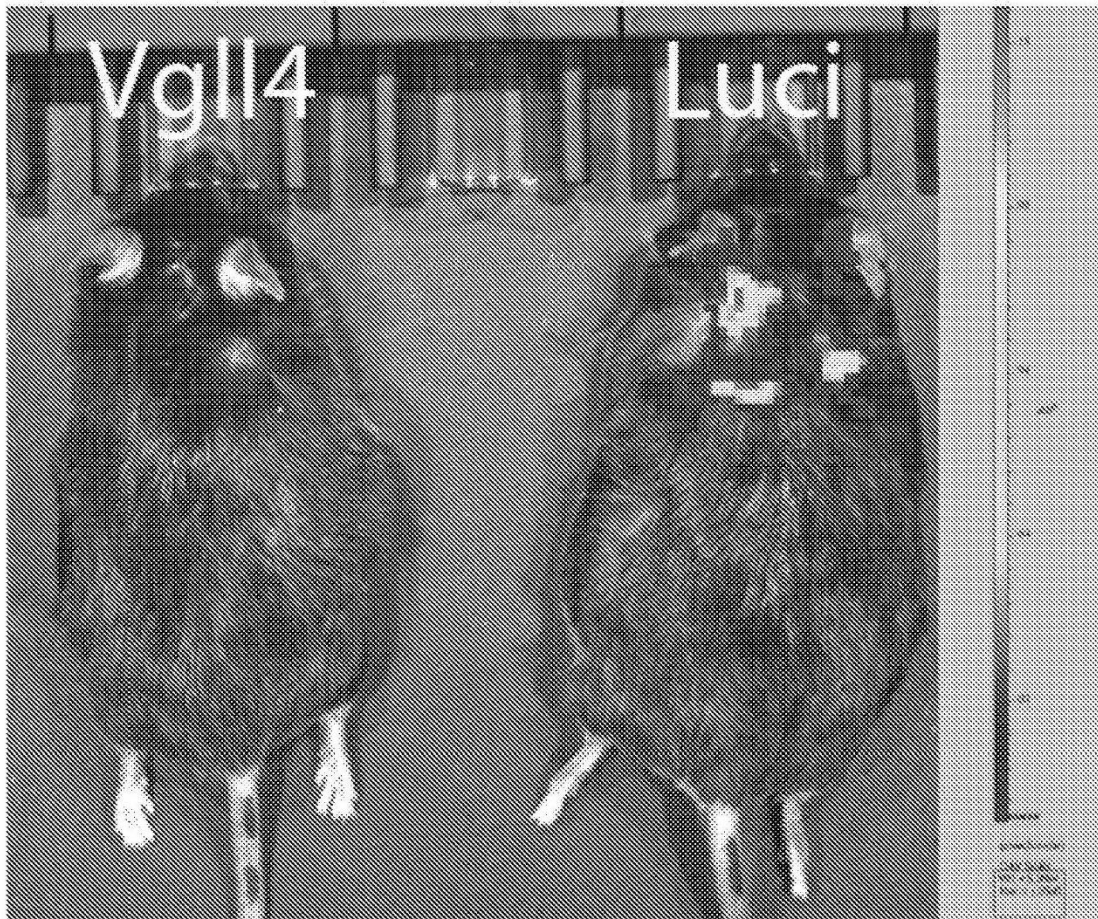


FIG. 29

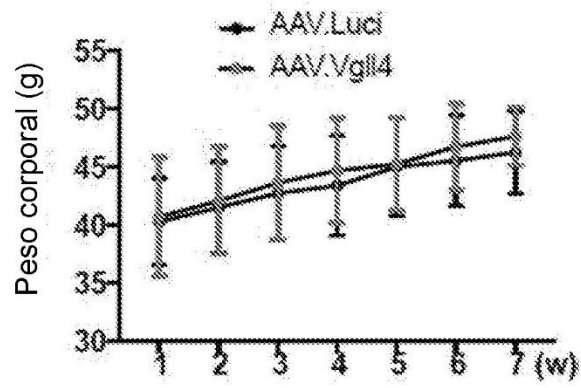


FIG. 30

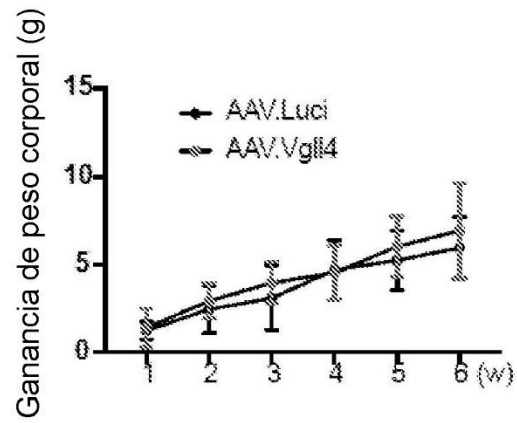


FIG. 31

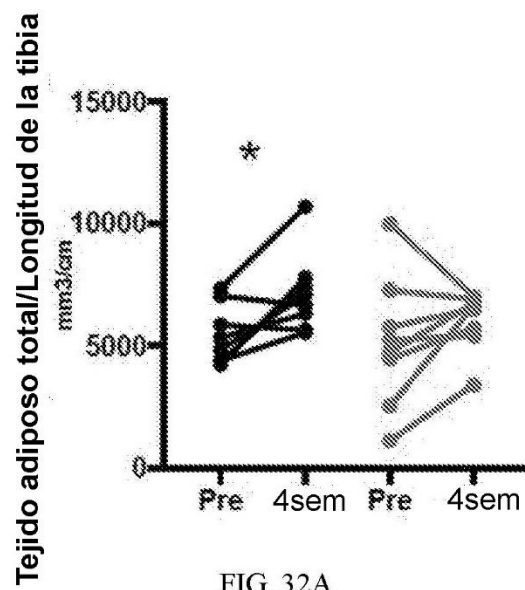


FIG. 32A

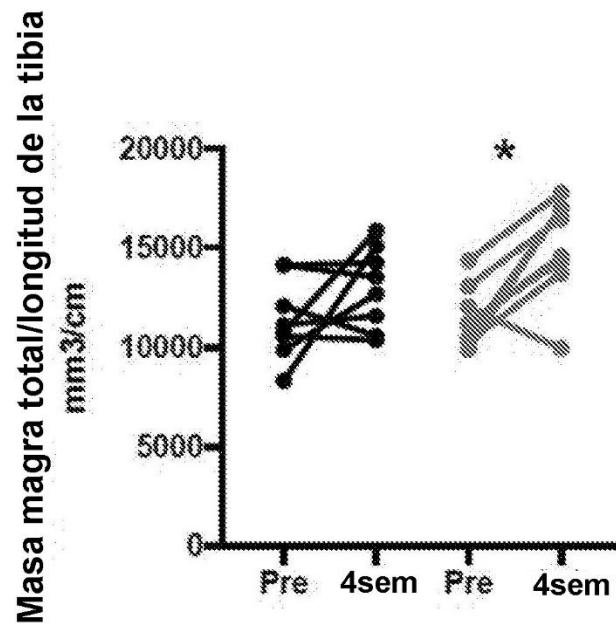


FIG. 32B

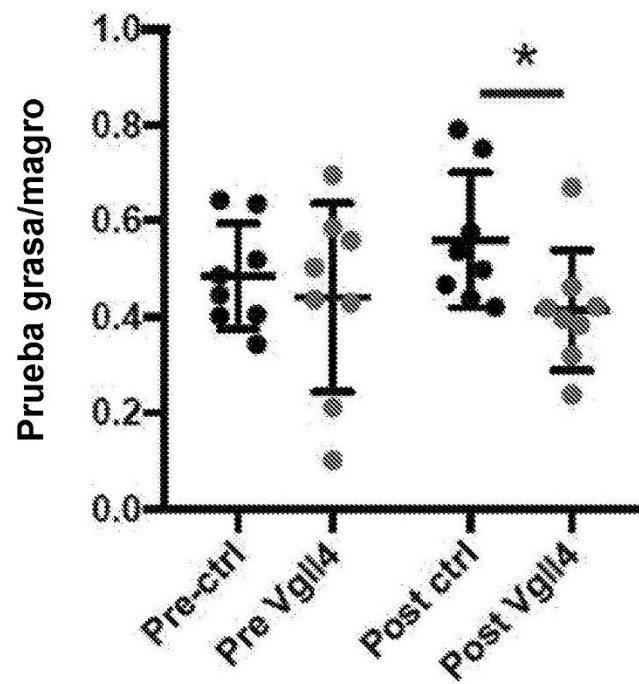


FIG. 32C

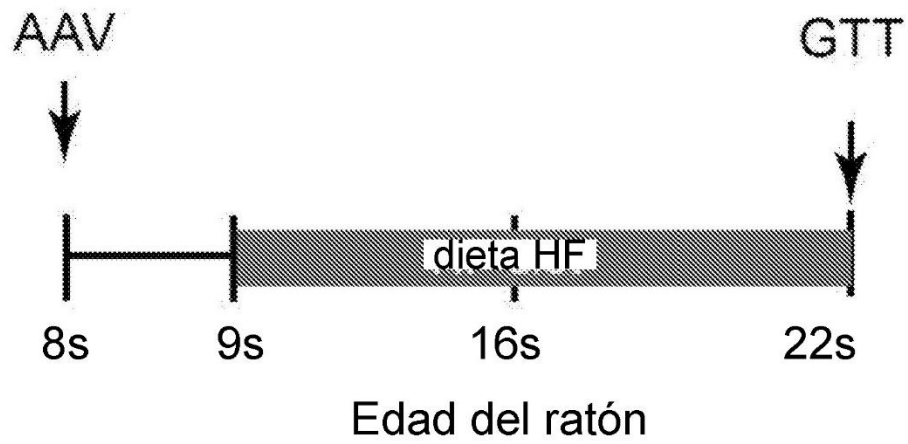


FIG. 33A

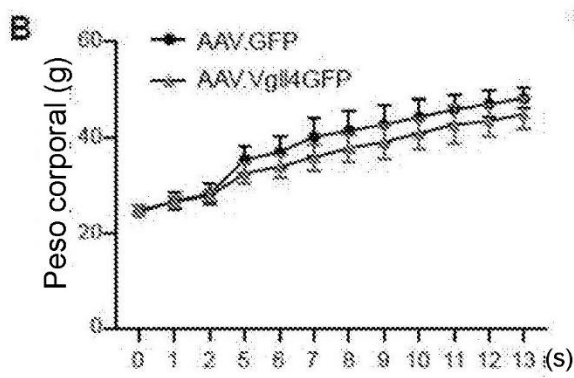


FIG. 33B

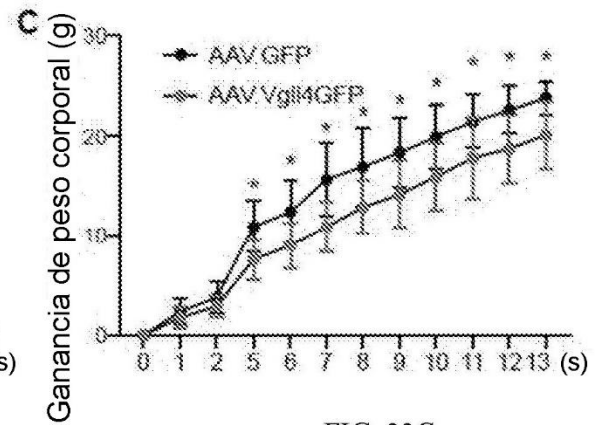


FIG. 33C

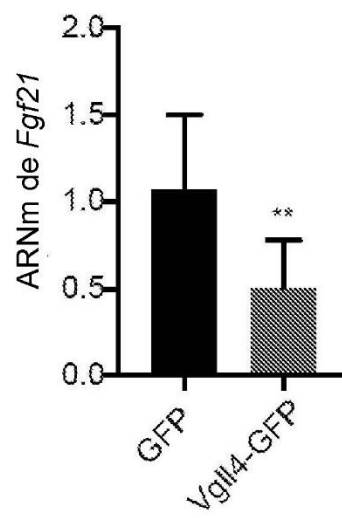


FIG. 33D

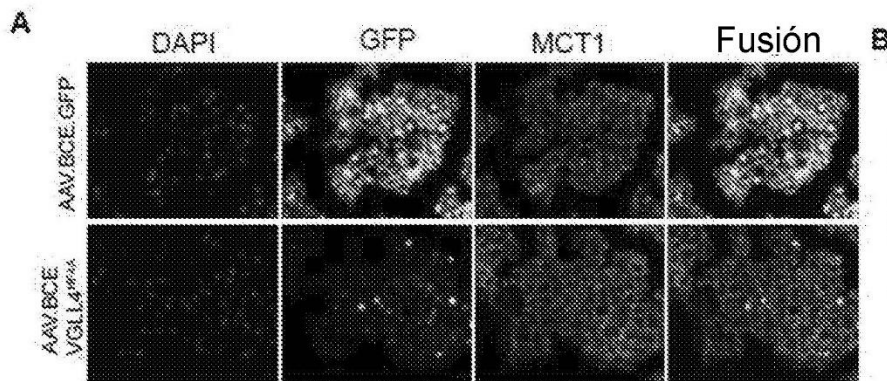


FIG. 34A

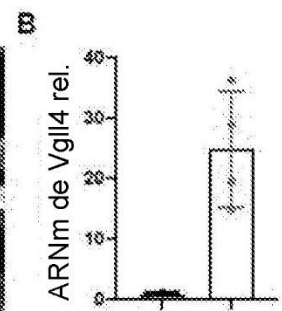


FIG. 34B

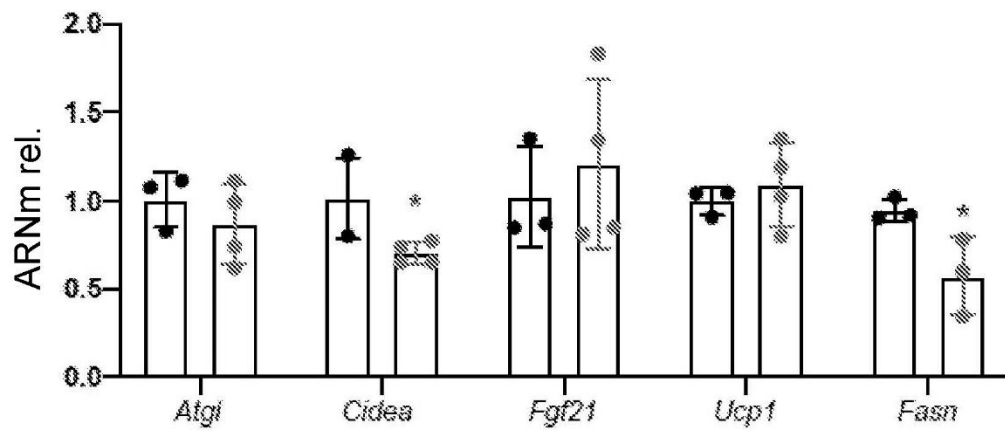


FIG. 34C

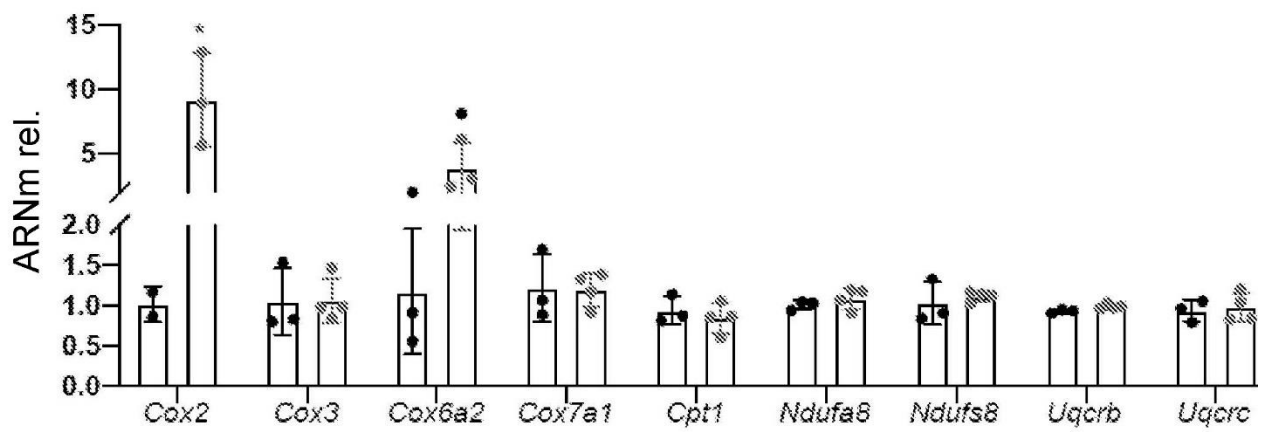


FIG. 34D

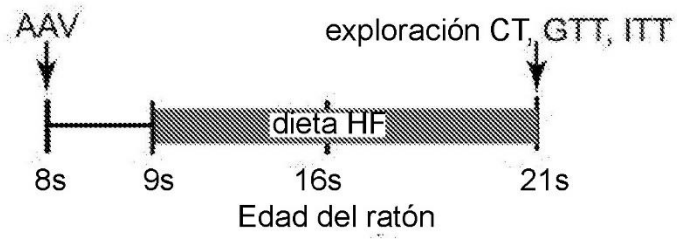


FIG. 35A

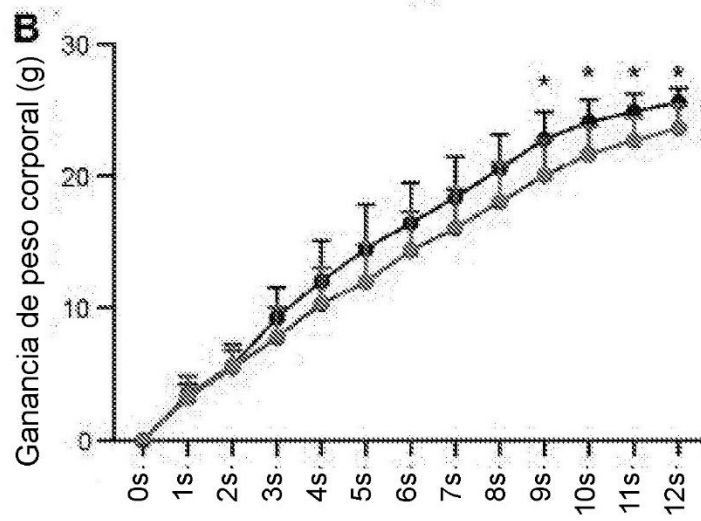


FIG. 35B

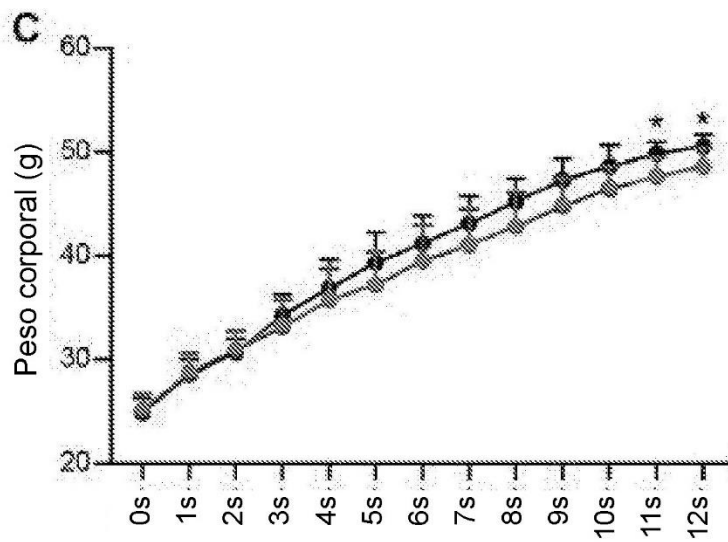


FIG. 35C

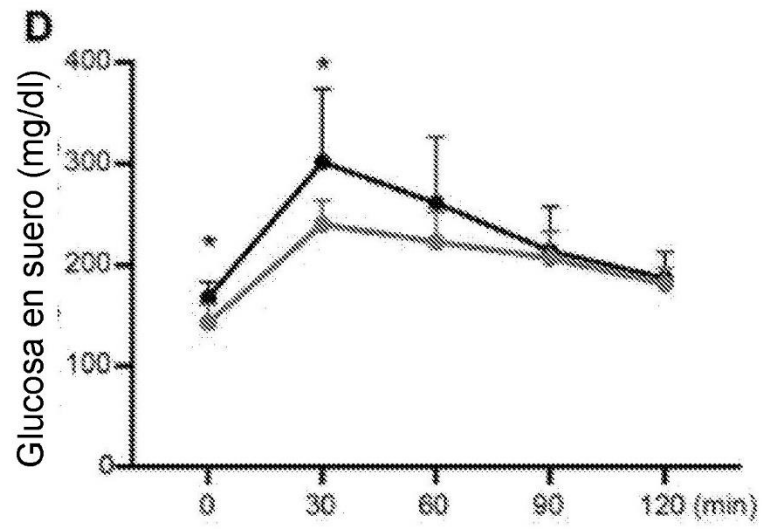


FIG. 35D

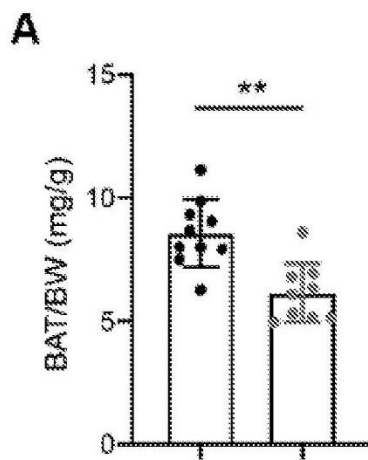


FIG. 36A

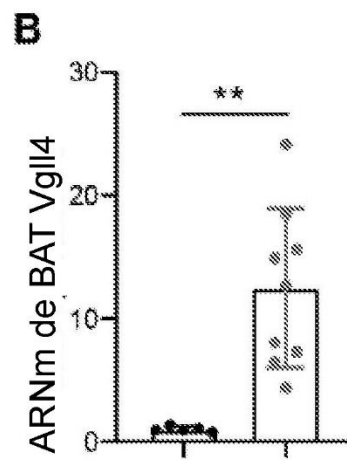


FIG. 36 B

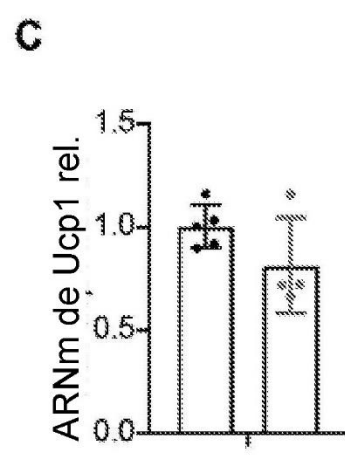


FIG. 36C

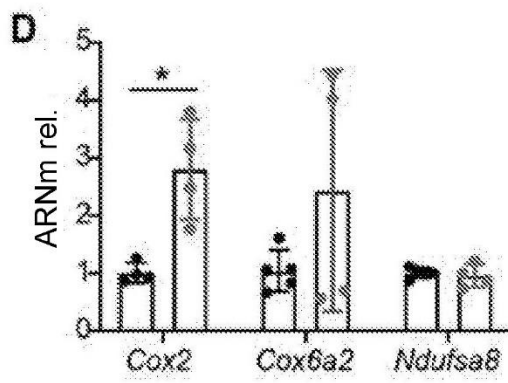


FIG. 36D

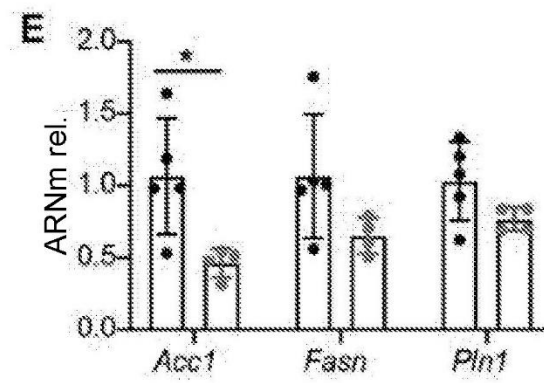


FIG. 36E

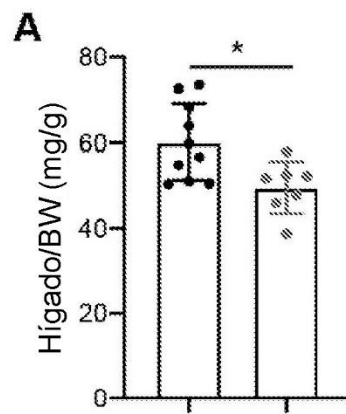


FIG. 37A

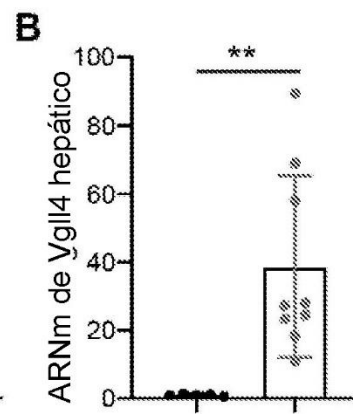


FIG. 37B

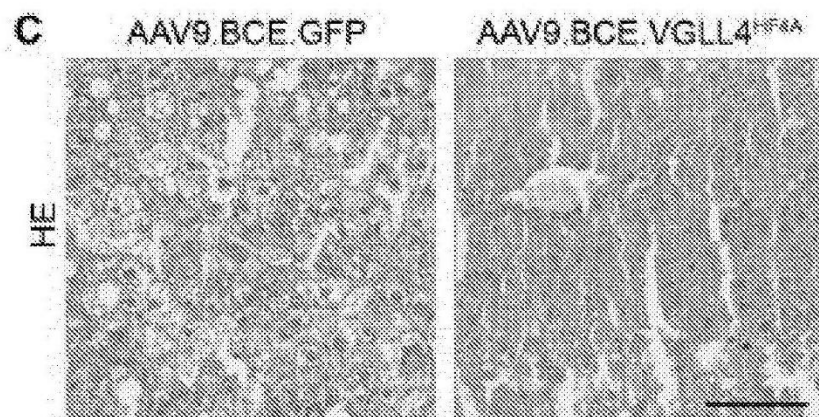


FIG. 37C

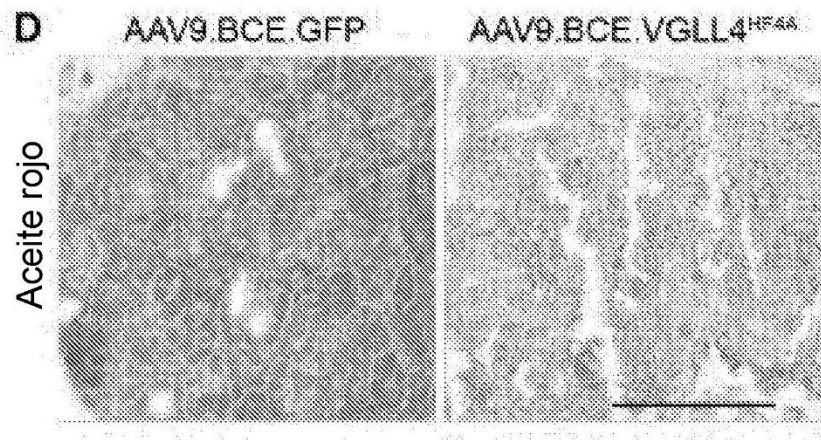


FIG. 37D

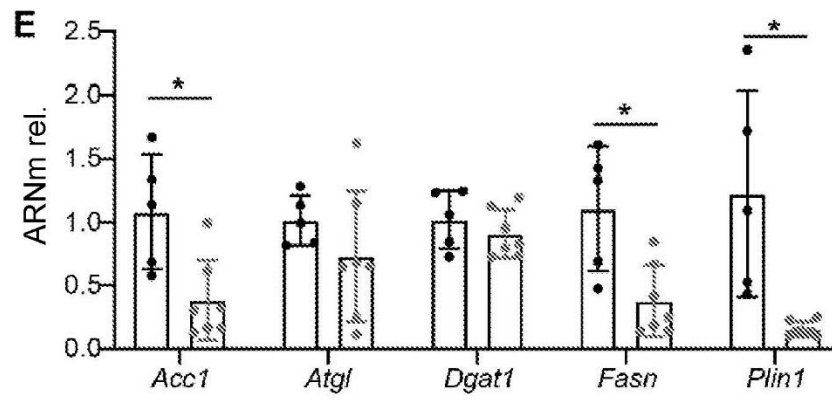


FIG. 37E