

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 920**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2018** **PCT/US2018/037443**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18232057**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2018** **E 18816687 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 3638288**

54 Título: **Uso terapéutico de composiciones de proteína 27 específica de grasa (FSP27)**

30 Prioridad:

15.06.2017 US 201762520015 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

OHIO UNIVERSITY (100.00%)
340 W. State Street
Athens, OH 45701, US

72 Inventor/es:

PURI, VISHWAJEET;
KOPCHICK, JOHN y
SHARMA, VISHVA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 008 920 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de composiciones de proteína 27 específica de grasa (FSP27)

5 Antecedentes de la invención

La obesidad se ha convertido en un importante problema de salud pública, y actualmente el 69 % de la población estadounidense y más de 2 000 millones de personas en todo el mundo se caracterizan por tener sobrepeso u obesidad.

La Asociación Médica Estadounidense recientemente etiquetó formalmente la obesidad como una enfermedad importante, destacando su impacto negativo crítico en la salud pública. Si bien gran parte del trabajo se ha centrado en la prevención de la obesidad, es posible que este enfoque haya llegado demasiado tarde, ya que ya nos enfrentamos a millones de adultos obesos con alto riesgo de padecer diabetes y otras comorbilidades relacionadas con la obesidad. El número de estadounidenses extremadamente obesos, en particular, está creciendo a un ritmo récord sin señales de desaceleración.

La obesidad se asocia con la acumulación ectópica de grasa, la lipotoxicidad, la disfunción del tejido adiposo y la inflamación, que en conjunto se han implicado en los mecanismos de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Está bien establecido que en la obesidad hay una alteración del almacenamiento y la descomposición de las grasas, lo que conduce a un aumento de los ácidos grasos libres (FFA - *Free Fatty Acids*) circulatorios; también denominados ácidos grasos no esterificados). Los niveles altos de FFA circulantes son un factor de riesgo importante para la lipotoxicidad. La deposición ectópica de estos FFA altera la señalización de la insulina en varios tejidos y órganos, como el hígado, los músculos y el páncreas, con la aparición de resistencia a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2 y/u obesidad.

Recientemente se ha identificado que la proteína grasa específica 27 (FSP27), también conocida como CIDEA (DFFA inductores de muerte celular como el efector C), está asociada con gotículas lipídicas en los adipocitos. Es una proteína intracelular que también se ha demostrado que se expresa en el tejido muscular y hepático. FSP27 es sorprendentemente regulada al alza durante la adipogénesis y se expresa en gran medida en el tejido adiposo. La depleción de FSP27 en los adipocitos provoca un aumento de la lipólisis, lo que resulta en la descomposición de los triglicéridos en ácidos grasos libres. La expresión de FSP27 en la grasa omental se correlaciona positivamente con la sensibilidad a la insulina en humanos obesos. Además, se ha demostrado que una mutación homocigótica sin sentido, FSP27 E186X, en un sujeto humano está asociada con un fenotipo de lipodistrofia parcial y diabetes resistente a insulina.

El documento EP 2572730 A1 describe que la inhibición del AIM (*apoptosis inhibitor of macrophage* - inhibidor de la apoptosis de los macrófagos) disminuye la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FAS - *fatty acid synthase*) y la expresión de FSP27 en los adipocitos humanos, aunque no sugiere el uso de FSP27 como agente terapéutico.

Resumen de la invención

En un primer aspecto amplio, en la presente memoria se describen los usos de las composiciones de FSP27, que se especifican en la reivindicación 1 adjunta. Ahora se describe en la presente memoria que la administración exógena de los péptidos de FSP27 puede rescatar la disfunción de FSP27.

Dichos usos incluyen, pero no se limitan a, aumentar los niveles de FSP27 en un sujeto mediante la administración de FSP27 recombinante exógena (rFSP27), cuando el sujeto padece una enfermedad metabólica y/u otras enfermedades asociadas con un aumento de ácidos grasos libres y/o lipotoxicidad, y afecciones asociadas con estas enfermedades.

En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica y las afecciones asociadas con la enfermedad son una o más de la resistencia a la insulina, la obesidad y la dislipidemia.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para reducir la obesidad visceral, la resistencia a la insulina y mejorar los niveles de glucosa en sangre mediante la administración de una cantidad eficaz de rFSP27 para mejorar la señalización inducida por la insulina en las células o en todo el cuerpo de un sujeto que lo necesite.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para modular la lipólisis en los adipocitos, administrando rFSP27 a un sujeto en una cantidad suficiente para proteger a ese sujeto de la resistencia a la insulina.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para regular la morfología de las gotas lipídicas y optimizar el almacenamiento y la descomposición de la grasa (lipólisis) en un sujeto, mediante la administración de una cantidad eficaz de rFSP27 a un sujeto que lo necesite.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para disminuir la expresión de la glicerol lipasa (ATGL) del tejido adiposo y la lipólisis en un sujeto que lo necesite, mediante la administración de una cantidad eficaz de rFSP27.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para proteger las células adipocíticas contra la resistencia a la insulina inducida por los FFA, mediante la administración de una cantidad eficaz de rFSP27 a un sujeto que lo necesite.

Otro uso de las composiciones de FSP27 es para tratar patologías asociadas con el síndrome de resistencia a la insulina, mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición de FSP27 a un sujeto que lo necesite. Tales patologías pueden incluir, por ejemplo, el tratamiento de la diabetes de tipo 2 en un sujeto.

En otro aspecto amplio, en la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más medicamentos de FSP27. Los medicamentos de FSP27 se pueden administrar como una sal farmacéuticamente aceptable, o como una composición pegilada, o se pueden modificar de una manera farmacéuticamente aceptable para mejorar las propiedades terapéuticas. Los medicamentos con FSP27 también se pueden administrar opcionalmente junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes. El medicamento FSP27 está presente en una cantidad suficiente para tratar una o más de: diabetes mellitus, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinismo/hiperinsulinemia, alteración de la producción de insulina, alteración de la sensibilidad a la insulina, síndrome metabólico, síndrome de resistencia a la insulina, obesidad, lipodosis, dislipidemia, hígado graso y lipodistrofia.

En otro aspecto amplio, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para su uso tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

En ciertas realizaciones, la proteína FSP27 es de origen natural.

En ciertas realizaciones, la proteína FSP27 es una proteína recombinante.

En ciertas realizaciones, la proteína FSP27 comprende un dominio FSP27 central que está asociado con la acumulación de TG, tal como aa 120-220.

En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En ciertas realizaciones, el sujeto experimenta una reducción de la resistencia a la insulina, obesidad y/o dislipidemia al administrar la composición.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 está unido operativamente a un promotor/potenciador constitutivo, un promotor/potenciador específico de adipocitos o un promotor/potenciador inducible.

En ciertas realizaciones, la composición comprende un plásmido, comprendiendo el plásmido el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción (promotor/potenciador).

En ciertas realizaciones, la composición comprende un vector viral, comprendiendo el vector viral el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 unido operativamente a un promotor.

En otro aspecto amplio, en la presente memoria se describe un ratón transgénico que expresa FSP27 humana en tejidos adiposos y/u otros tejidos.

Diversos objetos y ventajas de esta invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la luz de los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1D: Ilustración esquemática de un modelo de regulación de la lipólisis por FSP27. Un modelo de regulación de la lipólisis por FSP27 que está respaldado por los resultados descritos en la presente memoria. PLIN1 estructura FSP27 en la superficie de las gotículas lipídicas, donde FSP27 interactúa con ATGL y disminuye la lipólisis:

Figura 1A. En condiciones basales, FSP27 reduce el acceso de ATGL a su coactivador CGI-58, disminuyendo así la lipólisis, como lo indica la flecha discontinua hacia abajo.

Figura 1B. Cuando FSP27 está ausente en condiciones basales, ATGL es libre de interactuar con CGI-58, lo que lleva a un aumento de la lipólisis, como lo indica una flecha continua hacia abajo.

Figura 1C. Tras la estimulación beta-adrenérgica en presencia de FSP27, la activación de PKA produce la fosforilación de PLIN1 y de HSL, lo que provoca la liberación de CGI-58, que se une a ATGL y la estimula. ATGL no unido se transloca a gotícula lipídica y G0S2 se regula a la baja para aumentar la lipólisis mediada por ATGL, como lo indica la flecha hacia abajo en negra.

FIG. 1D. Tras la estimulación beta-adrenérgica en ausencia de FSP27, ATGL, que de otro modo estaría secuestrado por FSP27, ahora está disponible para unirse a CGI-58, lo que resulta en niveles aún más altos de lipólisis, indicados por la flecha hacia abajo más prominente.

Figuras 2A-2C: La depleción de FSP27 aumentó la lipólisis basal y estimulada en adipocitos humanos:

Figura 2A. Niveles relativos de ARNm en adipocitos humanos transfectados con ARNip.

Figura 2B. Inmunotransferencia y cuantificación de los niveles de expresión proteica de FSP27 y la beta-tubulina (control de carga) de los adipocitos humanos transfectados con ARNip.

Figura 2C. Cuantificación bioquímica de la lipólisis basal y estimulada basada en la medición de la liberación de glicerol después de 2 horas.

Figura 3: La expresión de FSP27 disminuyó la lipólisis mediada por ATGL.

Figuras 4A-4B: FSP27 regula negativamente la expresión de ATGL y la lipólisis en los adipocitos humanos:

Figura 4A. ARN se extrajo de los adipocitos de control y tratados con ARNip, y los niveles de ARNm se midieron mediante PCR cuantitativa y se normalizaron mediante ARNm de GAPDH.

Figura 4B. Lisados de proteínas de adipocitos de control y tratados con ARNip se cargaron a 15 µg/carril y se probaron con anticuerpos contra FSP27, ATGL o beta-tubulina.

Figuras 5A-5G: FSP27 inhibe la actividad del promotor de ATGL a través de Egr1:

Figuras 5A, 5B, 5D, 5F y 5G. Células HEK293T cultivadas en placas de 12 pocillos se transfectaron con construcciones promotoras de luciferasa ATGL de longitud completa (-2979/+21), mutadas en C→T o truncadas, ADNc para eGFP; ADNc para FSP27 y Egr1, así como ARNip codificado y ARNip de Egr1, como se indica.

Figura 5C. Representación esquemática de la región proximal del promotor ATGL con el sitio de unión consensuado de Egr1. [SEQ ID NO: 1].

FIG. 5D. Indica el efecto sinérgico entre Egr1 y FSP27 con $p < 0,05$.

Figura 5E. Células HEK293T que crecían en placas de 35 mm se transfectaron con ARNip codificado o Egr1.

Figuras 6A-6D: FSP27 protegió a los adipocitos humanos contra la resistencia a la insulina inducida por FFA:

Figura 6A: La insulina estimuló la fosforilación de AKT en los adipocitos humanos después de la inactivación de FSP27 mediada por ARNip.

Figura 6B. La insulina estimuló la fosforilación de AKT en los adipocitos humanos en presencia o ausencia de FSP27-CFP o EGFP (Control).

Figura 6C. La expresión de FSP27-HA protege los adipocitos.

Figura 6D. La expresión de PA/BSA o FSP27-HA 100 µM no tuvo ningún efecto sobre la activación de AKT estimulada por la insulina en los adipocitos diferenciados de MEF de ATGL-KO.

Figura 7: La lipólisis basal fue significativamente mayor en los depósitos viscerales en comparación con la subcutánea. La liberación de glicerol se midió en 12 depósitos subcutáneos y 15 depósitos adiposos de epiplón y se normalizó hasta un total de µg de proteína. Los datos se presentan como ± EEM. (Error Estándar de la Media)

Figuras 8A-8B: El aumento de la lipólisis en el tejido adiposo visceral se correlaciona negativamente con la expresión de FSP27:

Figura 8A. FSP27 basal fue significativamente mayor en el depósito subcutáneo.

Figura 8B. La proteína FSP27 basal se midió en 13 depósitos subcutáneos y de epiplones pareados.

Figuras 9A-9B: La inactivación de FSP27 mediada por ARNip aumenta la lipólisis y altera la señalización de la insulina:

Figura 9A. La inactivación de FSP27 en el tejido adiposo subcutáneo aumentó la tasa de liberación de glicerol en los medios.

Figura 9B. El agotamiento de FSP27 mediado por ARNip disminuyó la fosforilación de Akt.

Figuras 10A-10B: FSP27 recombinante mejora la señalización de la insulina en el tejido adiposo visceral:

Figura 10A. El tratamiento del depósito visceral con FSP27 recombinante disminuyó la lipólisis basal.

Figura 10B. Cuantificación de la fosforilación de AKT estimulada por insulina.

Figura 11: FSP27 (120-220) protegió contra la resistencia a la insulina inducida por FFA en los adipocitos primarios humanos.

Figura 12: Representación esquemática de FSP27 y sus dominios funcionales: CIDE-N y CIDE-C.

Figura 13: La secuencia de FSP27 está conservada en vertebrados; por ejemplo, más del 90 % de la secuencia conservada en FSP27 en humanos, ratones, monos, perros, vacas y ranas. Figura 13 describe las SEQ ID NO: 2-7, respectivamente, en orden de aparición.

Figura 14A: Prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en ratones AT-HFSP27Tg.

Figura 14B: Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones AT-HFSP27tg.

Figura 15A: Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones FSP27^{-/-}.

Figura 15B: Prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en ratones FSP27^{-/-}.

Figura 16A: Insulina sanguínea en ayunas en ratones isin FSP27.

Figura 16B: Ácidos grasos no esterificados (NEFA - *Non-esterified fatty acid*) (ácidos grasos libres) en ratones sin FSP27.

Descripción detallada de la(s) realización(es) preferida(s)

Definiciones

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Composiciones/medicamentos de FSP27: Se refiere a FSP27 tal como se muestra en la representación esquemática de FSP27 y sus dominios funcionales en la Figura 12, incluyendo cualquier sustitución, delección, modificación o mutación de la misma. Las composiciones/medicamentos de FSP27 tal como se contemplan en la presente memoria también pueden prepararse como proteínas recombinantes, incluidas las secuencias de FSP27 que se muestran en la Figura 13.

La proteína FSP27 también puede estar codificada por ácidos nucleicos. Como se usa en la presente memoria, un "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye un ácido nucleico, un oligonucleótido, un nucleótido, un polinucleótido y cualquier fragmento o variante del mismo. El ácido nucleico o polinucleótido puede ser ADN o ARN bicatenario, monocatenario o triple (incluido el ADNc), o un híbrido de ADN-ARN de origen genético o sintético, en donde el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases, que incluyen, pero no se limitan a, adenina, timina, citosina, guanina, uracilo, inosina y hipoxantina. El ácido nucleico o polinucleótido puede combinarse con un carbohidrato, lípido, proteína u otros materiales. Preferiblemente, el ácido nucleico codifica la proteína FSP27.

El "complemento" de un ácido nucleico se refiere, en la presente memoria, a una molécula de ácido nucleico que es completamente complementaria a otro ácido nucleico, o que se hibridará con el otro ácido nucleico en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de alta rigurosidad son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2001)). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y pueden variar según las circunstancias. Como se usa en la presente memoria, el término "ADNc" se refiere a un polinucleótido de ADN aislado o una molécula de ácido nucleico, o cualquier fragmento, derivado o complemento del mismo. Puede ser bicatenario,

monocatenario, puede haberse originado de forma recombinante o sintética, y puede representar secuencias 5' y/o 3' codificantes y/o no codificantes.

Además, “complementarios” significa no solo aquellos que son completamente complementarios a una región de al menos 20 nucleótidos continuos, sino también aquellos que tienen una homología de secuencia de nucleótidos de al menos el 40 % en ciertos casos, el 50 % en ciertos casos, el 60 % en ciertos casos, el 70 % en ciertos casos, al menos el 80 %, el 90 % y el 95 % o más. El grado de homología entre las secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante un algoritmo, BLAST, etc.

Como se usa en la presente memoria, los ácidos nucleicos y/o las secuencias de ácidos nucleicos son “homólogos” cuando se derivan, natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología se deduce generalmente de la identidad de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje preciso de identidad entre secuencias que es útil para establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión. También se pueden usar niveles más altos de identidad de secuencia, por ejemplo, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más, para establecer la homología. Los métodos para determinar los porcentajes de similitud de secuencia (por ejemplo, BLASTN usando parámetros predeterminados) están generalmente disponibles. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

El agente de ácido nucleico, por ejemplo, puede ser un plásmido. Dicho plásmido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica FSP27 u otra proteína asociada a FSP27, aunque debe entenderse que también pueden usarse otros tipos de agentes de ácido nucleico, tales como vectores virales recombinantes, para los fines de la presente invención. En una realización de la presente invención, el ácido nucleico (p. ej., plásmido) codifica al menos una proteína asociada a FSP27.

El término “plásmido”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere generalmente a ADN bicatenario circular, que no está unido a un cromosoma. El ADN, por ejemplo, puede ser un plásmido de origen cromosómico o episómico. El plásmido de la presente invención puede contener opcionalmente un promotor/potenciador y un terminador de transcripción, y/o una serie discreta de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción, localizados entre el promotor y el terminador. En el plásmido, un inserto de polinucleótido de interés (por ejemplo, uno que codifique una proteína asociada a FSP27) debe estar unido operativamente a un promotor apropiado. El promotor puede ser su promotor nativo o un promotor derivado del hospedador. El promotor también puede ser un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de adipocitos u otro promotor específico de tejido. El promotor puede ser además un promotor regulable, que puede desactivarse cuando ya no se desea la expresión del gen. Ejemplos no limitativos de promotores para su uso en la presente invención incluyen el promotor de actina o albúmina y los promotores virales. El experto en la materia conocerá otros promotores adecuados.

Terapéutico: Término genérico que incluye tanto el diagnóstico como el tratamiento. Se apreciará que en estos métodos la “terapia” puede ser cualquier terapia para tratar una enfermedad que incluye, pero no se limita a, composiciones farmacéuticas, terapia génica y terapia biológica, tal como la administración de anticuerpos y quimiocinas. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para evaluar a un paciente o sujeto antes, durante y después de la terapia, por ejemplo, para evaluar la reducción del estado de la enfermedad.

Terapia adyuvante: Tratamiento que se usa en combinación con un tratamiento primario para mejorar los efectos del tratamiento primario.

Resultado clínico: Se refiere al estado de salud de un paciente después del tratamiento de una enfermedad o trastorno o en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos incluyen, pero no se limitan a, un aumento en el tiempo hasta la muerte, una disminución en el tiempo hasta la muerte, un aumento en la probabilidad de supervivencia, un aumento en el riesgo de muerte, supervivencia, supervivencia sin enfermedad, enfermedad crónica, metástasis, enfermedad avanzada o agresiva, recurrencia de la enfermedad, muerte y respuesta favorable o deficiente al tratamiento.

Disminución de la supervivencia: Como se usa en la presente memoria, “disminución de la supervivencia” se refiere a una disminución en el período de tiempo antes de la muerte de un paciente, o a un aumento en el riesgo de muerte del paciente.

Paciente: Tal como se usa en la presente memoria, el término “paciente” incluye animales humanos y no humanos. El paciente preferido para el tratamiento es un ser humano. “Paciente”, “individuo” y “sujeto” se usan indistintamente en la presente memoria.

Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: “Prevenir” una enfermedad se refiere a inhibir el pleno desarrollo de una enfermedad. “Tratar” se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que haya comenzado a desarrollarse o detiene la progresión de dicha enfermedad. El término “mejora” se refiere a la reducción del número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad.

Mal pronóstico: Generalmente se refiere a una disminución de la supervivencia o, en otras palabras, a un aumento del riesgo de muerte o a una disminución del tiempo hasta la muerte. El mal pronóstico también puede referirse a un aumento de la gravedad de la enfermedad, como un aumento de la diseminación (metástasis) del cáncer a otros tejidos u órganos.

Cribaje (*screening*): Tal como se usa en la presente memoria, “cribaje” se refiere al proceso usado para evaluar e identificar los agentes candidatos que afectan a dicha enfermedad.

Comprendiendo, comprende y se comprende de: Tal como se usan en la presente memoria, son sinónimos de “incluyendo”, “incluye” o “conteniendo”, “contiene”, y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales no enumerados. Los términos “que comprende”, “comprende” y “comprendido por” también incluyen el término “que consiste en”.

Aproximadamente: Tal como se usa en la presente memoria cuando se hace referencia a un valor medible, tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de +/-10 % o menos, preferiblemente +/-5 % o menos, más preferiblemente +/-1 % o menos, y aún más preferiblemente +/-0,1 % o menos del y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizarse en la invención descrita. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador “aproximadamente” también se describe en sí mismo de manera específica y preferible.

Y/o: Cuando se usa en una lista de dos o más artículos, significa que cualquiera de los artículos listados se puede emplear por sí solo o se puede emplear cualquier combinación de dos o más de los artículos listados. Por ejemplo, si se describe que una lista comprende el grupo A, B y/o C, la lista puede comprender A solo; B solo; C solo; A y B en combinación; A y C en combinación, B y C en combinación; o A, B y C en combinación.

Enfermedades metabólicas: Tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier enfermedad causada por un proceso metabólico anormal que puede ser congénita, resultante de una anomalía hereditaria, o adquirida, resultante de una disfunción o fallo de un órgano o sistema.

Descripción general

La lipotoxicidad debida al exceso de lipólisis del tejido adiposo contribuye a la resistencia a la insulina. La proteína específica de la grasa (FSP27) es un regulador clave de la lipólisis en los adipocitos. La lipotoxicidad puede existir en los músculos, el hígado, el páncreas y otros órganos. La Figura 12 proporciona una representación esquemática de FSP27 y sus dominios funcionales.

FSP27 es una proteína asociada a las gotículas lipídicas que regula la homeostasis de los ácidos grasos en los adipocitos, y su expresión está inversamente asociada con la sensibilidad a la insulina en humanos obesos. Mutaciones genéticas humanas de FSP27 están asociadas con la lipodistrofia, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina, y la inactivación de las mutaciones de FSP27 en humanos conduce a un aumento de la lipólisis. Además, la alteración de FSP27 específica del tejido adiposo provoca resistencia a la insulina en ratones alimentados con alto contenido de grasas.

La lipólisis en la patogénesis de la resistencia a la insulina.

La lipólisis es una rama catabólica del ciclo de los ácidos grasos (FA - *fatty acids*) que proporciona los FA en momentos de necesidad metabólica. Los ácidos grasos esenciales son sustratos esenciales para la producción de energía y la síntesis de la mayoría de los lípidos. A pesar de su importancia fisiológica fundamental, un exceso de ácidos grasos es muy perjudicial. El aumento de los ácidos grasos libres (FFA - *free fatty acids*) provoca lipotoxicidad que altera la integridad de las membranas, altera la homeostasis ácido-base celular y provoca la generación de lípidos bioactivos dañinos. Estos efectos, a su vez, alteran la función de la membrana e inducen estrés en el retículo endoplásmico (RE), disfunción mitocondrial, inflamación, muerte celular y resistencia a la insulina. El tejido adiposo regula el equilibrio entre la esterificación de los FA y la lipólisis de los triglicéridos (TG), por lo que desempeña un papel central en la regulación del metabolismo de todo el cuerpo y la homeostasis de la glucosa. Se cree que las altas concentraciones de FFA y TG circulantes, observadas tanto en la obesidad como en la lipodistrofia, provocan resistencia a la insulina y una disminución de la tolerancia a la glucosa.

FSP27 regula la morfología de las gotículas lipídicas y la lipólisis:

La proteína FSP27 se asocia con gotículas lipídicas y regula la homeostasis de los FA en los adipocitos. FSP27 regula la dinámica de las gotículas lipídicas y la lipólisis en los adipocitos mediante la regulación de la capacidad catalítica y la transcripción de la glicerol lipasa del tejido adiposo, ATGL, la enzima limitante de la velocidad en la lipólisis. Los niveles de FSP27 están inversamente asociados con la sensibilidad a la insulina en humanos obesos, y la mutación de FSP27 en humanos conduce a un aumento de la lipólisis. Además, la alteración de FSP27 específica del tejido adiposo provoca resistencia a la insulina en ratones alimentados con alto contenido de grasas.

En la presente memoria se describe un papel previamente no reconocido de FSP27 en la regulación de la señalización de la insulina para proteger contra la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2. Si bien la regulación metabólica de FSP27 se ha caracterizado esencialmente exclusivamente en los adipocitos, los datos de la presente memoria muestran que FSP27 está regulada a la baja, particularmente en asociación con la obesidad visceral/central. Perturbaciones en FSP27 pueden promover afecciones que elevan los FFA, lo que causa o promueve la resistencia a la insulina. Sin embargo, el almacenamiento/descomposición de los lípidos generalmente no se considera una función principal de otros tipos de células, por lo que FSP27 puede gobernar las respuestas celulares mediante mecanismos que van más allá de la regulación del metabolismo de los lípidos.

Además, a nivel del tejido adiposo local, la rarefacción capilar y la alteración de la perfusión se han relacionado con la pseudohipoxia del tejido adiposo y la desregulación metabólica. FSP27 está regulada a la baja en la grasa visceral humana y está asociada con la resistencia a la insulina.

También se describen en la presente memoria modelos de ratón que son ratones transgénicos específicos para el tejido adiposo que expresan FSP27 humana. Estos ratones son útiles para examinar la contribución relativa del tejido adiposo en la regulación de la resistencia a la insulina y/o la diabetes de tipo 2.

FS-IVGTT

Sujetos en ayunas se estudian por la mañana en el centro de investigación clínica general (GCRC - *general clinical research center*). Cualquier medicamento oral para diabéticos se conserva 48 horas antes de la prueba. Se colocan dos catéteres intravenosos para antebrazo en cada brazo (uno para la toma de muestras y otro para la infusión). Muestras de sangre basales se recogen a $t = -15$ min y $t = -5$ min para medir la glucosa y la insulina. Se administra un bolo de 300 mg/kg de glucosa en una infusión de glucosa/solución salina al 25 % durante 1 minuto. A $t = 20$ minutos, se administra un bolo de 0,05 unidades/kg de insulina regular por vía intravenosa que mejora la precisión del FS-IVGTT en sujetos diabéticos. Se extrae sangre para insulina y glucosa a $t = 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 16, 19, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 130, 150, 170$ y 180 minutos. El índice de sensibilidad a la insulina (SI) y el índice de disposición (DI) se calculan utilizando el software MINMOD basado en el modelo de Bergman. Estos datos se recopilaron dentro de una semana de la cirugía planificada.

Análisis cuantitativos de PCR y western blot en tiempo real

Mediante PCR cuantitativa en tiempo real, la expresión en el tejido adiposo de mediadores específicos relevantes para la señalización de la insulina, FSP27 y la inflamación (que inicialmente consistirá en: Se examinan TNF α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, CD68, FSP27, IRS-1, PI3-K, Akt, PTEN).

FSP27 está asociado con las gotículas lipídicas y funciona principalmente como un regulador de la morfología de las gotículas lipídicas y de la lipólisis en los adipocitos. El tejido adiposo visceral mostró una menor expresión de FSP27 en comparación con los depósitos subcutáneos (véanse las Figuras 9A-9B).

FSP27 evita la interacción de ATGL con su activador, CGI-58, lo que conduce a una disminución de la lipólisis en los adipocitos humanos.

La lipólisis de los TG a los FA y al glicerol requiere tres pasos consecutivos en los que intervienen tres enzimas diferentes, la glicerolipasa del tejido adiposo (ATGL - *Adipose tissue glycerol lipase*); también se llama desnitrina y PNPLA2), lipasa sensible a hormonas (HNL) y monoacilglicerol lipasa (MGL). La ATGL es la enzima limitante de la velocidad para la lipólisis en los adipocitos que cataliza la primera etapa de la hidrólisis de TG a diacilglicerol (DG).

FSP27 regula la lipólisis en los adipocitos mediante la regulación de la capacidad catalítica y la transcripción del gen de la glicerol lipasa (ATGL) del tejido adiposo. La actividad de ATGL depende de su interacción con su activador CGI-58. Como se muestra en las Figuras 1A-1D, FSP27 interactúa con el ATGL en la superficie de las gotículas lipídicas e inhibe su interacción con el activador CGI-58, impidiendo así la activación del ATGL para regular la lipólisis tanto en condiciones basales como estimuladas.

Las Figuras 1A-1D proporcionan una ilustración esquemática de un modelo de regulación de la lipólisis por FSP27. La Figura 1A ilustra que, en condiciones basales, FSP27 reduce el acceso del ATGL a su coactivador CGI-58, disminuyendo así la lipólisis, como lo indica la flecha discontinua hacia abajo.

La Figura 1B ilustra que, cuando FSP27 está ausente en condiciones basales, ATGL es libre de interactuar con el CGI-58, lo que lleva a un aumento de la lipólisis, como lo indica una flecha continua hacia abajo.

La Figura 1C ilustra que, tras la estimulación beta-adrenérgica en presencia de FSP27, la activación de PKA da como resultado la fosforilación de PLIN1 y HLA, lo que provoca la liberación de CGI-58, que se une al ATGL y lo

estimula. ATGL no unido se transloca a gotícula lipídica y G0S2 se regula a la baja para aumentar la lipólisis mediada por ATGL, como lo indica la flecha hacia abajo en negrita.

La Figura 1D ilustra que, tras la estimulación beta-adrenérgica en ausencia de FSP27, ATGL, que de otro modo estaría secuestrado por FSP27, ahora está disponible para unirse a CGI-58, lo que resulta en niveles aún más altos de lipólisis, indicados por la flecha hacia abajo más prominente.

Además de inhibir el acceso del ATGL al CGI-58, ahora se cree que FSP27 afecta a la lipólisis mediada por ATGL en los adipocitos al: a) regular la actividad hidrolasa de ATGL, b) regular la expresión y distribución de G0S2, y/o c) que el agotamiento de FSP27 provoca la fragmentación de las gotículas lipídicas, lo que aumenta el área de superficie de las gotículas lipídicas, aumentando así el acceso de las lipasas.

El efecto de FSP27 sobre la actividad de la hidrolasa de TG de ATGL se determina mediante el siguiente protocolo: Células HeLa que expresan o no expresan de manera estable FSP27 se transfectan con ATGL y CGI-58. Los homogeneizados celulares se incuban con trioleína marcada con ^3H como sustrato y se mide su hidrólisis. Como se describe en las Figuras 1A-1D, el gen conmutador G0/S1, G0S2, regula la lipólisis mediada por ATGL mediante la inhibición de su actividad de la TG hidrolasa. La distribución de G0S2 es principalmente citosólica, pero en condiciones estimuladas, un pequeño porcentaje se distribuye a las LD (*Lipid Droplets* - Gotículas Lipídicas). Por lo tanto, se examina el efecto de la expresión de FSP27 o de sus dominios funcionales sobre la expresión y distribución de G0S2 en condiciones basales y/o estimuladas en los adipocitos humanos.

La depleción de FSP27 aumentó la lipólisis basal y estimulada en los adipocitos humanos.

Se usó ARNip codificado (Scr) no específico como control en todos los experimentos. La Figura 2A muestra los niveles relativos de ARNm en adipocitos humanos transfectados con ARNip. La Figura 2B muestra la inmunotransferencia y la cuantificación de los niveles de expresión proteica de FSP27 y β -tubulina (control de carga) de adipocitos humanos transfectados con ARNip. La Figura 2C muestra la cuantificación bioquímica de la lipólisis basal y estimulada basándose en la medición de la liberación de glicerol después de 2 horas. Los valores son medias $\pm$ error estándar; $*p < 0,05$ y $**p < 0,001$, $n=3$ (prueba t no pareada).

La expresión de FSP27 disminuyó la lipólisis mediada por TGL.

La Figura 3 muestra el glicerol liberado en medios de cultivo celular a partir de adipocitos humanos que expresan EGFP, FSP27-HA y/o ATGL. Las células de control se infectaron con un virus vacío que contenía EGFP. El glicerol liberado en 2,5 h se midió y se normalizó con respecto a la proteína total. Los valores son medias $\pm$ error estándar; $*p < 0,001$ y $**p < 0,05$, $n=3$ (prueba t no pareada).

FSP27 regula negativamente la expresión de ATGL y la lipólisis en los adipocitos humanos.

Los adipocitos humanos se cultivaron y se diferenciaron. La Figura 4A muestra dónde se extrajo el ARN de los adipocitos de control y tratados con ARNip, y los niveles de ARNm se midieron mediante PCR cuantitativa y se normalizaron mediante ARNm de GAPDH. Los datos muestran un promedio de tres experimentos independientes. La Figura 4B muestra que los lisados de proteínas de los adipocitos de control y tratados con ARNip se cargaron a 15 μg /carril y se sondearon con anticuerpos contra FSP27, ATGL o β -tubulina. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes.

FSP27 inhibe la actividad de transcripción del gen ATGL (promotor/potenciador) a través de Egr1.

Las Figuras 5A, 5B, 5D, 5F y 5G muestran dónde las células HEK293T cultivadas en placas de 12 pocillos se transfectaron con las construcciones promotoras de luciferasa ATGL de longitud completa (-2979/+21), mutadas en C $\rightarrow$ T o truncadas, ADNc para eGFP; ADNc para FSP27 y Egr1, así como ARNip y ARNip de Egr1 codificados, como se indica. Después de 48 h, las células se lavaron tres veces en PBS frío y se recolectaron en el tampón de lisis indicador. La actividad de la luciferasa en los lisados celulares se ensayó y se normalizó mediante fluorescencia de eGFP. Los datos se presentan para muestras por triplicado como media $\pm$ SD; $*p < 0,05$ según estimación mediante prueba t no pareada.

La Figura 5D muestra el efecto sinérgico entre Egr1 y FSP27 con $p < 0,05$. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces (Figuras 5A, 5B, 5D, 5G) y 2 veces (Figura 5F).

La Figura 5C es una representación esquemática de la región proximal del promotor ATGL con el sitio de unión de Egr1 consensuado. Los nucleótidos que se han elegido para la mutagénesis dirigida al sitio están subrayados.

La Figura 5E muestra que las células HEK293T que crecían en placas de 35 mm se transfectaron con ARNip codificado o Egr1. Los lisados celulares se recogieron 48 h después de la transfección, se separaron con un 12,5 % de PAGE y se inmunotransmitieron con anticuerpos contra Egr1 y actina. El experimento se repitió al menos 2 veces.

FSP27 protegió a los adipocitos humanos contra la resistencia a la insulina inducida por FFA.

La Figura 6A muestra dónde la insulina estimuló la fosforilación de AKT en adipocitos humanos después de la inactivación de FSP27 mediada por ARNip. La Figura 6B muestra la fosforilación de AKT estimulada por insulina en adipocitos humanos después de un tratamiento nocturno con PA/BSA 100 μ M en presencia o ausencia de FSP27-CFP o EGFP (Control). La Figura 6C muestra que la expresión de FSP27-HA protege a los adipocitos diferenciados de los fibroblastos embrionarios (MEF) de ratón WT contra la inhibición mediada por PA/BSA 100 μ M de la fosforilación de AKT estimulada por insulina. La Figura 6D muestra que la expresión de PA/BSA o FSP27-HA 100 μ M no tuvo ningún efecto sobre la activación de AKT estimulada por insulina en adipocitos diferenciados de MEF de ATGL-KO.

FFA alteran la señalización de la insulina y promueven la resistencia a la insulina en adipocitos primarios humanos.

La depleción de FSP27 en adipocitos humanos aumentó la expresión de ATGL y la lipólisis y, por lo tanto, aumentó los niveles de FFA, y se determinó si la depleción de FSP27 afecta a la señalización inducida por insulina. De hecho, la inactivación de FSP27 disminuyó la estimulación mediada por insulina de la fosforilación de AKT (Figura 6A). Además, la sobreexpresión de FSP27 protegió a los adipocitos humanos contra la resistencia a la insulina inducida por FFA (Figura 6B).

Además, los adipocitos derivados de MEF de ATGL-KO pero no de WT eran resistentes a la resistencia a la insulina inducida por FFA (Figura 6C y Figura 6D).

La Figura 7 muestra que la lipólisis basal fue significativamente mayor en los depósitos viscerales en comparación con la subcutánea. La liberación de glicerol se midió en 12 depósitos subcutáneos y 15 depósitos adiposos de epiplón y se normalizó hasta un total de μ g de proteína. Los datos se presentan como $\pm$ EEM. (Error Estándar de la Media)

El aumento de la lipólisis en el tejido adiposo visceral se correlaciona negativamente con la expresión de FSP27.

La Figura 8A muestra que FSP27 basal era significativamente mayor en el depósito subcutáneo. ARNm de FSP27 se midió en 27 muestras pareadas de depósitos subcutáneos y de epiplones. Los datos se presentan como $\pm$ EEM. (Error Estándar de la Media) La Figura 8B muestra que la proteína FSP27 basal se midió en 13 depósitos de epiplón subcutáneos pareados. Los datos se presentan como $\pm$ EEM. (Error Estándar de la Media)

Efecto de la depleción de FSP27 sobre la señalización de la insulina en los adipocitos.

La activación de Akt está regulada por PIP3, y los niveles de PIP3 están estrechamente regulados por el fosfatidilinositol (PI)-3K y las fosfatasas, como PTEN, que antagoniza la señalización de la PI3K/Akt al desfosforilar la PIP3. La fosforilación de PTEN se mide en Ser³⁸⁰/Thr³⁸²/Thr³⁸³. Además, se mide la fosforilación de IRS-1 y AS160 y se compara con la expresión de FSP27.

La expresión de FSP27 fue menor en el depósito adiposo visceral de una cohorte de sujetos humanos obesos, como se muestra en las Figuras 8A-8B. La fosforilación de IRS-1 y AS160 se mide en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de sujetos humanos obesos y se compara con la expresión de FSP27.

Las Figuras 9A-9B muestran que la inactivación de FSP27 mediada por ARNip aumenta la lipólisis y altera la señalización de la insulina. La Figura 9A muestra la inactivación de FSP27 en el tejido adiposo subcutáneo, el aumento de la tasa de liberación de glicerol en el medio. Los datos se presentan como $\pm$ EEM (n = 7). La Figura 9B muestra que el agotamiento de FSP27 mediado por ARNip disminuyó la fosforilación de Akt.

La participación de las vías de estrés JNK y p38 activadas en la inhibición de Akt agotada en FSP27 en los adipocitos y las células musculares y hepáticas. La depleción de FSP27 aumenta la lipólisis y la liberación de FFA en los adipocitos humanos. Dado que los FFA aumentan el contenido de ceramida, lo que se ha demostrado que activa la MLK3, la quinasa ascendente de las vías JNK y p38, la activación de estas vías. JNK y p38 se activan por fosforilación en Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ y Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², respectivamente, el agotamiento de FSP27 aumenta la lipólisis y la liberación de FFA en los adipocitos humanos. Dado que los FFA aumentan la ceramida, lo que activa MLK3, una quinasa ascendente para JNK y p38. La fosforilación de JNK y p38 por la MLK3 en Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ y Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², respectivamente, provoca una regulación negativa de la señalización del receptor de insulina en las células adiposas, musculares y hepáticas para promover la resistencia a la insulina).

FSP27 recombinante mejora la señalización de la insulina en el tejido adiposo visceral.

La Figura 10A muestra el tratamiento del depósito visceral con una disminución de la lipólisis basal con FSP27 recombinante. La Figura 10B muestra la cuantificación de la fosforilación de AKT estimulada por insulina. Los datos se presentan como $\pm$ EEM. (Error Estándar de la Media) *p < 0,05.

FSP27 (120-220) protege contra la resistencia a la insulina inducida por FFA en los adipocitos humanos.

La insulina estimuló la fosforilación de AKT en los adipocitos humanos. El dominio FSP27 central que está asociado con la acumulación de TG, aa 120-220, se expresó usando lentivirus, con EGFP como control. Las células se trataron durante la noche con PA/BSA 100 μ M. Las manchas (*blots*) de la Figura 11 muestran la fosforilación de AKT en condiciones basales y estimuladas por insulina. FSP27 (120-220) protegió a los adipocitos humanos de la inhibición de la fosforilación de AKT por la PA exógena.

La Figura 12 muestra la representación esquemática de FSP27 y sus dominios funcionales: Dominio terminal CIDE-N y dominio terminal CIDE-C. El extremo N de FSP27 es de los aminoácidos 1 a 120 y el extremo C es de los aminoácidos 121 a 239. El agrandamiento de las gotículas lipídicas (LD - *Lipid Droplets*) mediado por FSP27 consiste en dos pasos independientes, la agrupación seguida de la fusión de las LD. Los aminoácidos 172-210 son necesarios y suficientes para la agrupación de LD mediada por FSP27. La agrupación de las LD no tiene ningún efecto sobre su tamaño ni sobre los niveles de TG celular. La agrupación de LD va seguida de su agrandamiento. Los aminoácidos 120-210 son suficientes para la agrupación y el agrandamiento de los LD.

La Figura 13 muestra que la secuencia de FSP27 está conservada en vertebrados; por ejemplo, más del 90 % de la secuencia conservada en FSP27 en humanos, ratones, monos, perros, vacas y ranas.

Generación de ratones transgénicos que sobreexpresan FSP27 humana específica del tejido adiposo.

La supresión de la lipólisis en el tejido adiposo mediada por FSP27 puede proteger contra la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2.

FSP27 se clonó en el vector ROSA26-CMV-LoxSTOPlox y los ratones generados sobreexpresan FSP27 de forma condicional. Estos ratones se cruzan con ratones Adipoq-cre para sobreexpresar específicamente FSP27 en el tejido adiposo (AT), (AT-FSP27tg). Basándose en los datos mostrados en las Figuras 6A-6D, ahora se cree que un aumento de 2 a 3 veces en la expresión de FSP27 en WAT es suficiente para proporcionar un efecto protector de FSP27 contra la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas (HFD).

Para determinar si la sobreexpresión de FSP27 también altera otras proteínas asociadas con la protección de las gotículas lipídicas y la lipólisis, se analizan las proteínas PLIN1, ATGL y HSL y/o la fosforilación en estados basales y estimulados; luego siguió con la identificación de cualquier alteración en la lipólisis de los adipocitos. La deposición de grasa y los metabolitos lipídicos en el músculo y el hígado se miden en los animales de experimentación. Para estimar los grupos intracelulares de FSP27, se aíslan y cuantifican los grupos de gotículas lipídicas de FSP27. La cantidad de FSP27 se expresa en relación con el número y/o el área de superficie de los adipocitos.

Homeostasis de la glucosa y fenotipo metabólico:

Los compañeros de camada (*littermates*) son sometidos a caracterización fisiológica a las 6, 12 y 26 semanas. Los pesos corporales y la composición corporal se miden mediante imágenes de resonancia magnética. Tanto en condiciones de alimentación como en ayunas, el nivel circulante de glucosa, insulina, FFA, glicerol, GH, IGF-1 y adipocinas (leptina, resistina y adiponectina) se determina con kits enzimáticos o de ELISA disponibles en el mercado. Se evalúan las pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT - *glucose tolerance testing*) intraperitoneal (2 g/kg de peso corporal) y la prueba de tolerancia a la insulina (ITT - *insulin tolerance test*) intraperitoneal (0,75-1,25 U/kg de peso corporal). Se colocan cohortes separadas de ratones en una dieta baja (10 %) o alta (60 %) en grasas (HFD) (D1245 0B y D12492, Research Diets) durante 12 semanas y se estudian de manera similar. Los cambios en la tasa metabólica y el gasto energético se miden mediante el Sistema Integral de Monitoreo de Animales de Laboratorio (CLAMS, Columbus Instrument). Los ratones se aclimatan durante 24 h y después se monitorizan durante un período de alimentación de 48 h seguido de un período de ayuno de 24 h. También se miden la actividad (determinada por las interrupciones del haz infrarrojo), la ingesta de alimentos, el gasto energético (normalizado a la masa corporal magra) y la producción de calor. El índice de intercambio respiratorio (RER - *Respiratory exchange ratio*) (VCO_2/VO_2) se calcula a partir de los datos de intercambio de gases para las fases claras y oscuras. Tras completar la evaluación fisiológica, los ratones se sacrifican. Se recolectan y pesan la sangre, los músculos esqueléticos (cuádriceps, EDL y tibial anterior), el hígado, el corazón, los riñones, los depósitos subcutáneos (SC), perigonales (PG) y de grasa parda, el cerebro y el páncreas y/o los islotes aislados. Los tejidos se preparan para histología y se extraen el ARNm y la proteína para su posterior análisis.

Señalización de insulina, absorción de glucosa y lipólisis:

Los resultados de la pinza hiperinsulinémica-euglucémica y la ITT se confirman al evaluar la señalización de la insulina en los tejidos sensibles a la insulina, incluidos el tejido adiposo (AT - *adipose tissue*), los músculos y el hígado. Quince minutos después de la inyección intravenosa de insulina, se aíslan los tejidos y los intermediarios de señalización de la insulina (por ejemplo, IR, IRS1, Akt, PI3K y mTORC1 y, cuando sea relevante, sus homólogos

fosforilados) se analizan mediante análisis western blot. Para medir la absorción de glucosa y la lipólisis de los adipocitos primarios, las almohadillas de grasa se digieren enzimáticamente. La tasa lipolítica se cuantifica mediante la liberación de glicerol y FA, y la absorción de glucosa se determina mediante la absorción de [³H] 2-desoxi-D-glucosa. Dado que se cree que el tamaño de los adipocitos varía en estos modelos de ratones, cuantificaremos la lipólisis “por adipocito” y cuantificaremos “por unidad de área de superficie de adipocito”.

Histología del tejido adiposo, lípidos ectópicos y cuantificación de citocinas:

La histología del AT se lleva a cabo para examinar la morfología de los adipocitos y la infiltración de macrófagos. Se cuantifican el tamaño de los adipocitos y la infiltración de macrófagos. La deposición de grasa ectópica en el músculo y el hígado se visualiza mediante histología y se cuantifican el triacilglicerol, el diacilglicerol y las ceramidas. Se determinan los niveles circulantes y la expresión del ARNm de las citocinas proinflamatorias (IL1 β , TNF α , IL6), ya que se ha demostrado que los FFA modulan la activación de los macrófagos y la expresión de las citocinas proinflamatorias. Además, se ha demostrado que TNF α aumenta la lipólisis de una manera dependiente de FSP27.

Respuesta protegida a la insulina y la glucosa en ratones transgénicos con FSP27 humano específicos del tejido adiposo alimentados con alto contenido de grasa (AT-HFSP27tg).

La Figura 14A muestra la prueba de tolerancia a la insulina (ITT), mientras que la Figura 14B muestra la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones AT-HFSP27Tg. Los machos (5 meses de edad, n = 3/grupo) fueron alimentados con Diet aAlta en Grasas (60 %) durante 3 meses. Datos: media $\pm$ EEM. Los gráficos en la parte inferior de las curvas muestran el área bajo las curvas. Estos datos muestran que la sobreexpresión de FSP27 en los adipocitos previene la resistencia a la insulina inducida por la dieta.

Individuos sin FSP27 (FSP27^{-/-}) son intolerantes a la glucosa y a la insulina.

La Figura 15A muestra la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), mientras que la Figura 15B muestra la prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en ratones FSP27^{-/-}, Machos (4 meses); n = 3/grupo) Datos: media $\pm$ EEM; p < 0,05 en ratones Fsp27^{-/-} vs tipo salvaje (WT - *Wild type*) mice. Los gráficos en la parte inferior de las curvas muestran el área bajo las curvas.

Insulina plasmática y NEFA en ratones FSP27^{-/-} con una dieta regular (RD)

Los niveles de insulina en sangre en ayunas y ácidos grasos no esterificados (ácidos grasos libres) fueron más altos en los ratones sin FSP27, como se muestra en la Figura 16A y la Figura 16B.

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica tal como se describe en la presente memoria puede formularse con cualquier excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Una composición descrita en la presente memoria puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y de si necesita ser estéril para vías de administración tales como inyección. Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar de una manera adecuada, que incluye, pero no se limita a, por vía tópica (es decir, transdérmica), por vía subcutánea, mediante perfusión localizada, bañando directamente las células diana, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), formuladas como elixires o soluciones para una administración tópica conveniente, formuladas como formas de dosificación de liberación sostenida o mediante otro método o combinación de los anteriores, como se conocería. un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003, incorporado en la presente memoria como referencia).

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria son útiles para tratar animales, tales como seres humanos. Un método para tratar a un paciente humano según la presente descripción incluye la administración de una composición, tal como se describe en la presente memoria.

Las expresiones “farmacéutico” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano. Un portador o diluyente puede ser un material sólido, semisólido o líquido que sirve como vehículo, excipiente o medio para la sustancia terapéutica activa. Algunos ejemplos de diluyentes o portadores que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, propilenglicol, parafina líquida, parafina blanda blanca, caolín, dióxido de silicio ahumado, celulosa microcristalina, silicato de calcio, sílice, polivinilpirrolidona, alcohol cetosteárilico, almidón, almidones modificados, goma arábiga, fosfato de calcio, manteca de cacao, ésteres etoxilados, aceite de teobroma, aceite de cacahuete, alginatos, tragacanto, gelatina, jarabe, metilcelulosa, polioxietilensorbitán monolaurato, lactato de etilo, hidroxibenzoato de metilo y propilo, trioleato de sorbitán,

sesquioleato de sorbitán y alcohol oleílico, y propulsores tales como tricloromonofluorometano, diclorodifluorometano y diclorotetrafluoroetano.

Soluciones de las composiciones descritas en la presente memoria como bases libres o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. Formas farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles. En ciertos casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y, opcionalmente, puede conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (es decir, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, tales como, pero sin limitarse a, azúcares o cloruro de sodio.

Composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir composiciones formuladas para una aplicación medicinal, tal como una pomada, pasta, crema o polvo. Ungüentos incluyen todas las composiciones oleaginosas, de adsorción, de emulsión y solubles en agua para aplicación tópica, mientras que las cremas y lociones son aquellas composiciones que incluyen solo una base de emulsión. Medicamentos administrados por vía tópica pueden contener un potenciador de la penetración para facilitar la adsorción de los ingredientes activos a través de la piel. Potenciadores de la penetración adecuados incluyen glicerina, alcoholes, alquilmetilsulfóxidos, pirrolidonas y luarocapram. Posibles bases para las composiciones para aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema fría y vaselina, así como cualquier otra base adecuada de absorción, emulsión o pomada soluble en agua. Preparaciones tópicas también pueden incluir emulsionantes, agentes gelificantes y conservantes antimicrobianos según sea necesario para conservar la composición y proporcionar una mezcla homogénea. La administración transdérmica de las composiciones también puede comprender el uso de un "parche". Por ejemplo, el parche puede suministrar una o más composiciones a una tasa predeterminada y de manera continua durante un período de tiempo fijo.

Se prevé además que las composiciones descritas en la presente memoria puedan administrarse mediante un aerosol. El término aerosol se refiere a un sistema coloidal de partículas sólidas o líquidas finamente divididas dispersas en un propulsor de gas licuado o presurizado. El aerosol típico comprende una suspensión de ingredientes activos en un propulsor líquido o una mezcla de un propulsor líquido y un disolvente adecuado. Propulsores adecuados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Recipientes adecuados pueden variar según los requisitos de presión del propulsor. La administración del aerosol puede variar según la edad, el peso y la gravedad y respuesta de los síntomas del sujeto.

Dosificación

La cantidad de dosificación real de una composición descrita en la presente memoria administrada a un paciente animal o humano puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la idiopatía del paciente y la vía de administración. Dependiendo de la dosis y la vía de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad eficaz puede variar según la respuesta del sujeto. Los compuestos de la presente descripción son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificaciones. El médico responsable de la administración puede, en cualquier caso, determinar la concentración del ingrediente o principios activos en una composición y las dosis apropiadas para el sujeto individual.

Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar de tal manera que se pueda obtener una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los que preparan tales formulaciones farmacéuticas pueden contemplar factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la vida media biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas y, por lo tanto, puede ser deseable una variedad de dosis y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, de aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, a aproximadamente

1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo que pueda derivarse de los mismos. En ejemplos no limitativos de un intervalo derivable a partir de los números listados en la presente memoria, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente. Las dosis pueden depender de muchos factores y, en cualquier caso, pueden ser determinadas por un profesional adecuado. Por lo tanto, las dosis descritas en la presente memoria no pretenden ser limitantes.

En algunas realizaciones, las composiciones incluyen además un ingrediente activo adicional. Los expertos en la materia pueden conocer la preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto o ingrediente activo adicional a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003, que se incorpora aquí como referencia. Además, para la administración en animales (por ejemplo, humanos), se puede entender que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales tal como lo exige la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

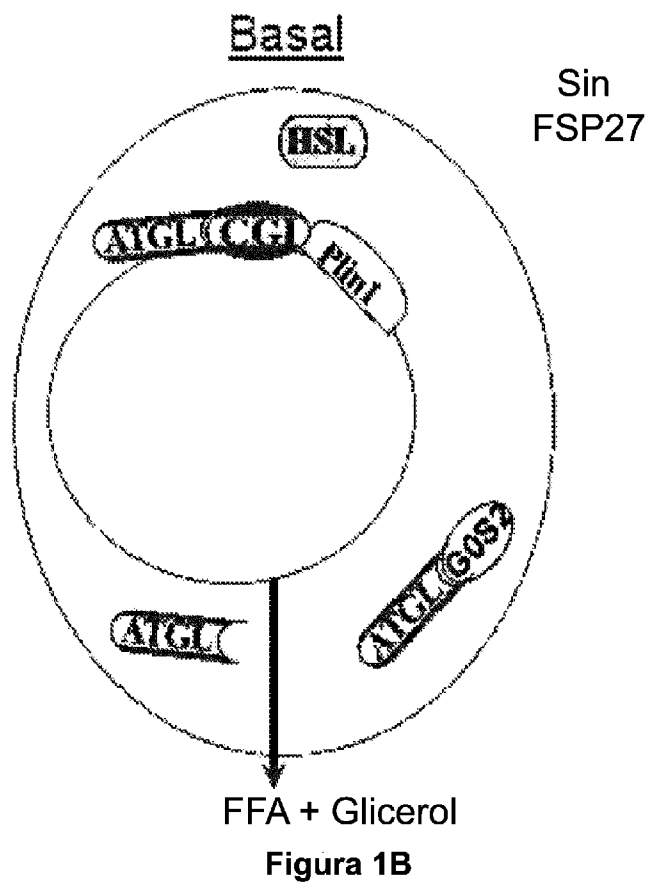
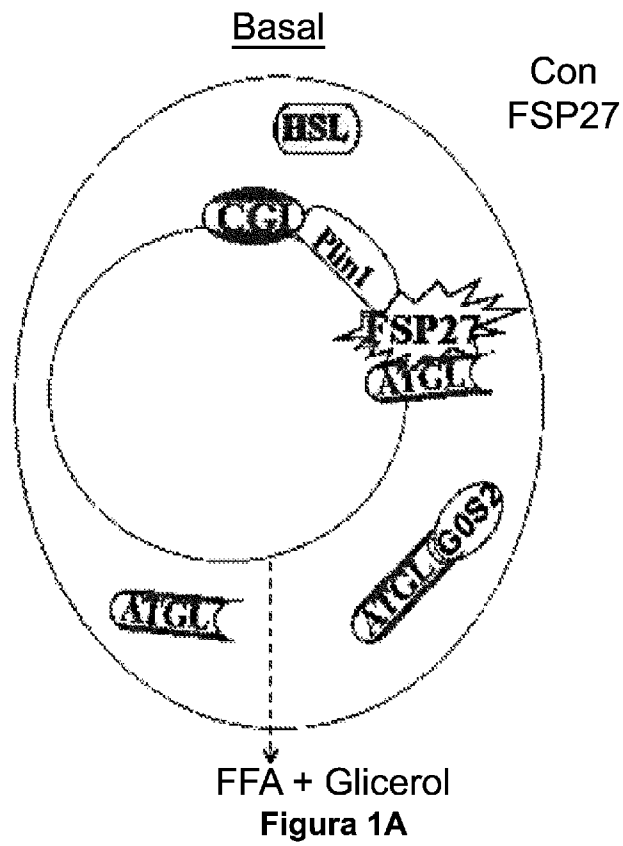
Envasado de la composición

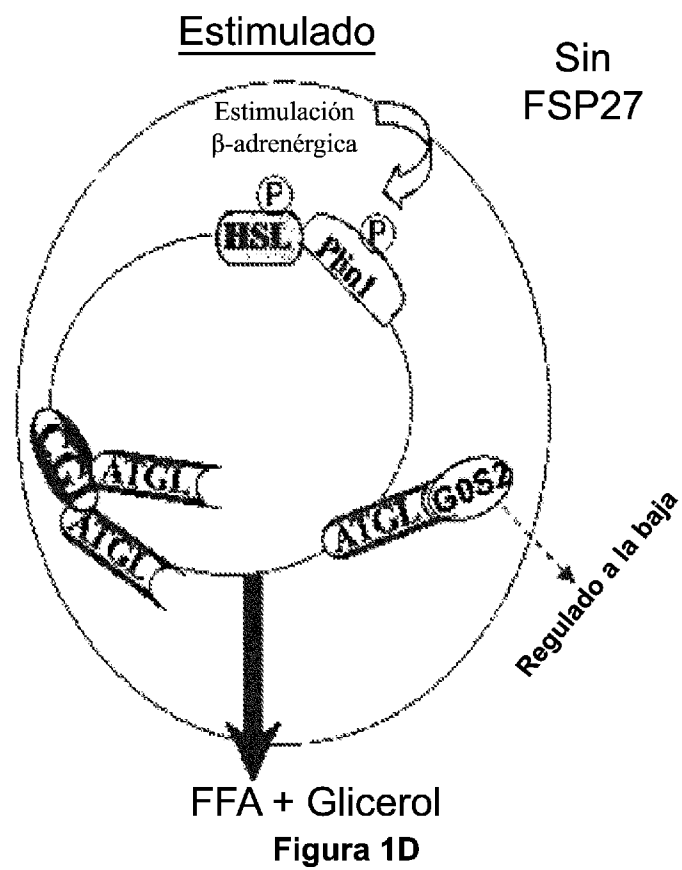
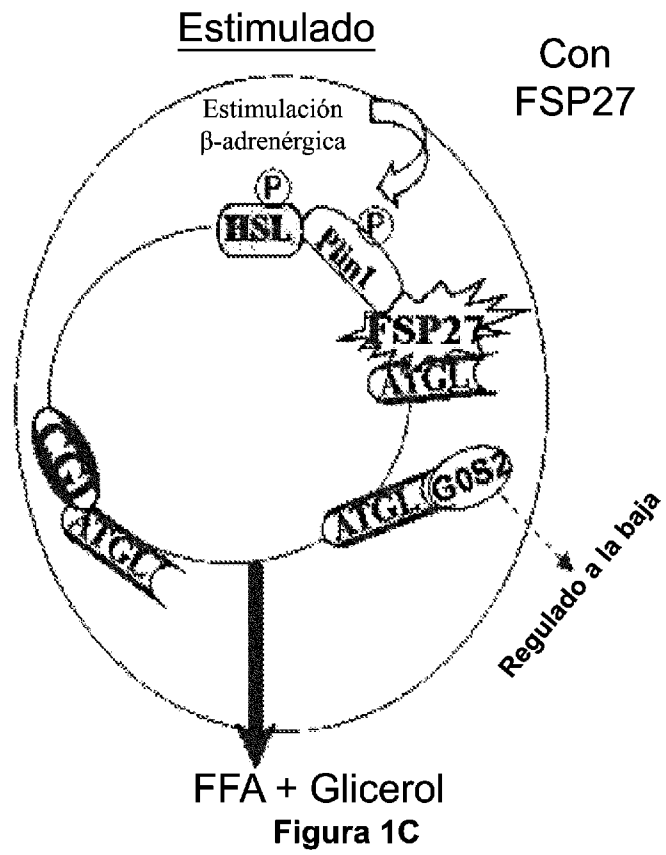
Tras la formulación, la composición se envasa de una manera adecuada para su suministro y uso por parte de un usuario final. En un ejemplo, la composición se coloca en un dispensador apropiado y se envía al usuario final. Los ejemplos de recipiente final pueden incluir una botella con bomba, una botella exprimible, un frasco, un tubo, una cápsula o un vial.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden incorporarse como partes de un kit o kits. Un ejemplo no limitativo de un kit de este tipo comprende los ingredientes para preparar una composición, en donde los recipientes pueden o no estar presentes en una configuración combinada. En ciertas realizaciones, los kits comprenden además un medio para administrar la composición, tal como un aplicador tópico o una jeringa. Los kits pueden incluir además instrucciones para usar los componentes del kit. Las instrucciones para usar los componentes del kit se graban generalmente en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto o en el etiquetado del recipiente del kit o de los componentes del mismo. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, tal como una unidad flash, un CD-ROM o un disquete. En otras realizaciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, tal como a través de Internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde la que se pueden descargar las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se graba en un sustrato adecuado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende uno o más medicamentos de FSP27, o una o más modificaciones farmacéuticamente aceptables de FSP27 de los mismos, opcionalmente junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes,
5 la composición comprende un ácido nucleico que codifica una proteína FSP27 capaz de promover la modulación de la lipólisis en los adipocitos;
10 en donde la proteína FSP27 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene las SEQ ID NO: 2-7,
para su uso en el tratamiento terapéutico de una o más de: diabetes mellitus, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinismo, alteración de la producción de insulina, alteración de la sensibilidad a la insulina, síndrome metabólico, síndrome de resistencia a la insulina, obesidad, lipidosi,
15 dislipidemia, hígado graso y lipodistrofia.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína FSP27 es de origen natural.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína FSP27 es una proteína
20 recombinante.
4. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína FSP27 comprende un dominio FSP27 central que está asociado con la acumulación de TG.
- 25 5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína FSP27 comprende un dominio FSP27 central, está asociada con la acumulación de TG y comprende aa 120-220.
6. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína FSP27 es una proteína humana.
30
7. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición se formula para administrarse al sujeto por vía parenteral.
- 35 8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 está unido operativamente a un promotor/potenciador constitutivo, un promotor específico de adipocitos o un promotor inducible.
9. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición comprende un plásmido, comprendiendo el plásmido el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 unido operativamente a un
40 promotor/potenciador.
10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición comprende un vector viral, comprendiendo el vector viral el ácido nucleico que codifica la proteína FSP27 unido operativamente a un promotor/potenciador.





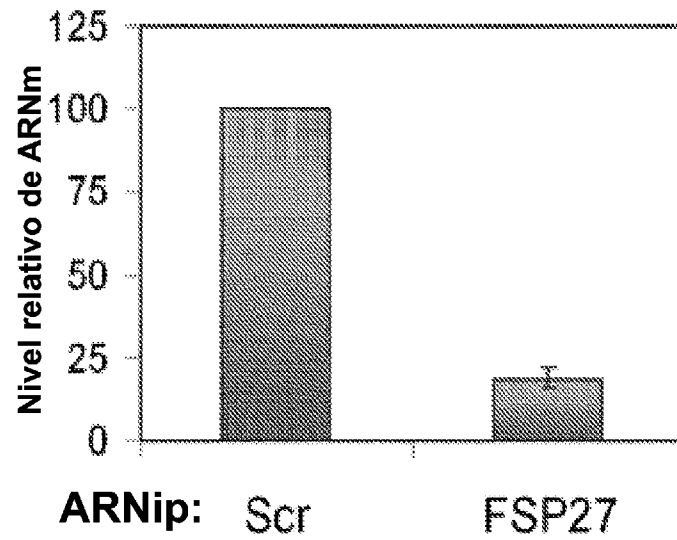


Figura 2A

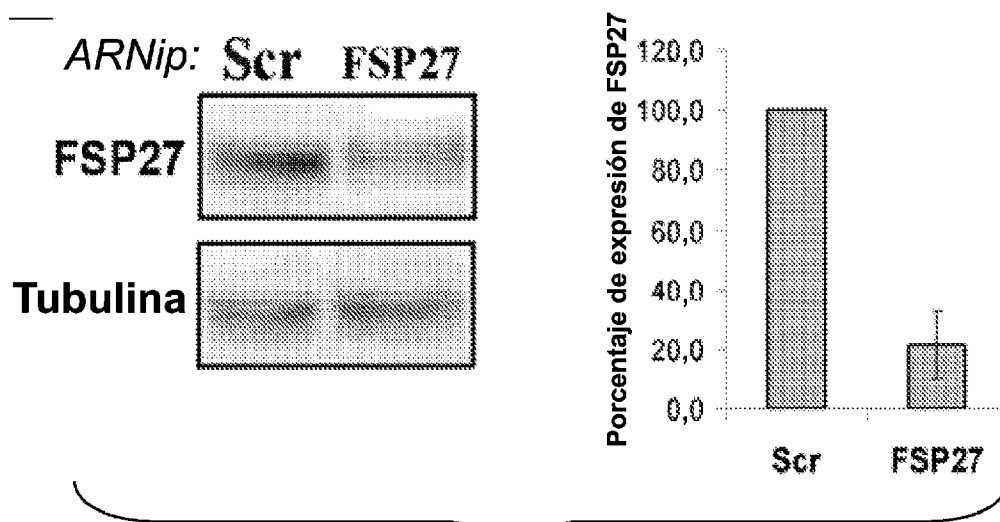


Figura 2B

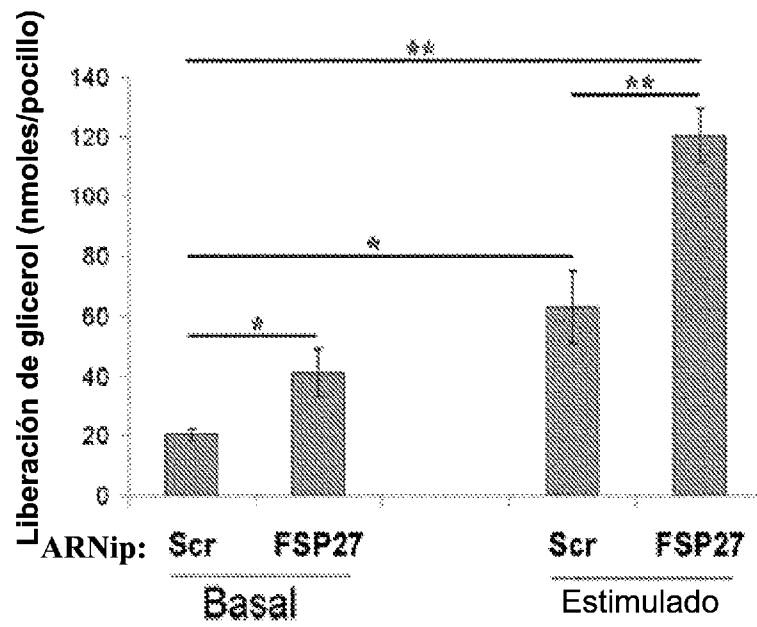


Figura 2C

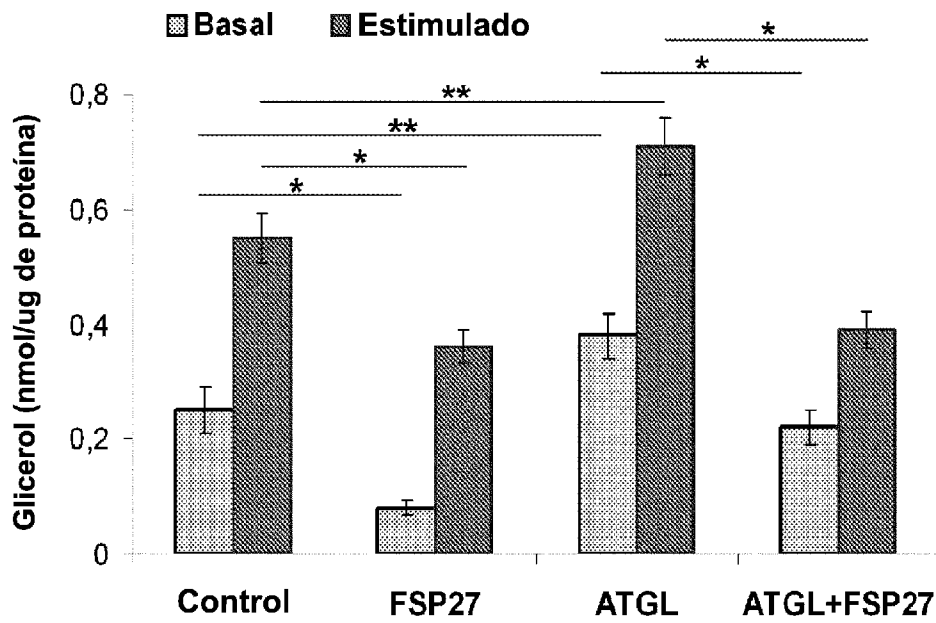


Figura 3

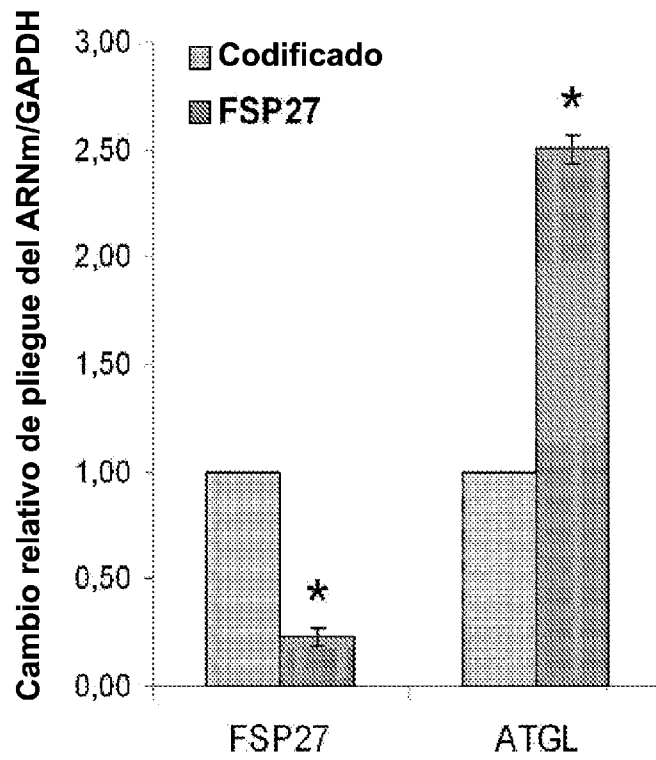


Figura 4A

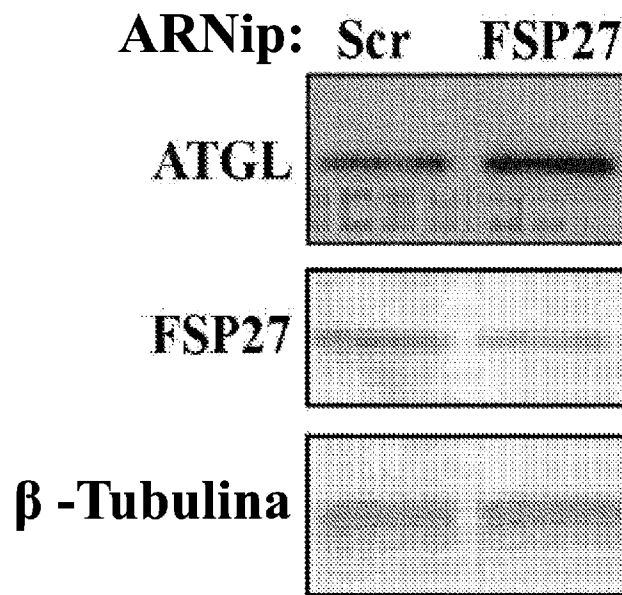


Figura 4B

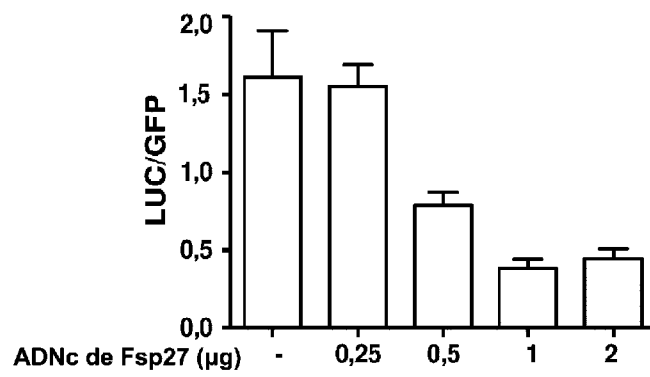


Figura 5A

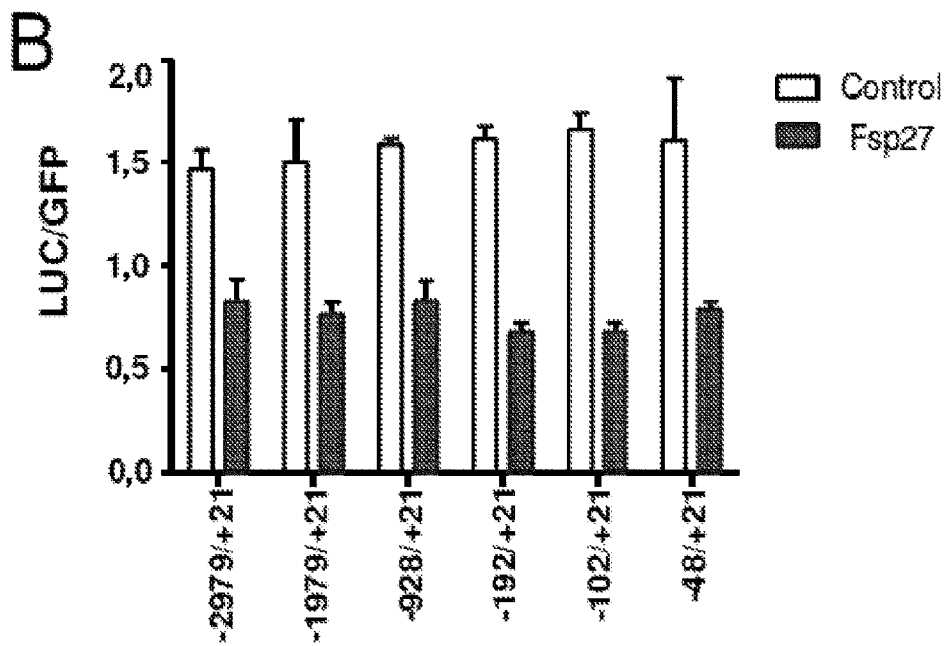


Figura 5B

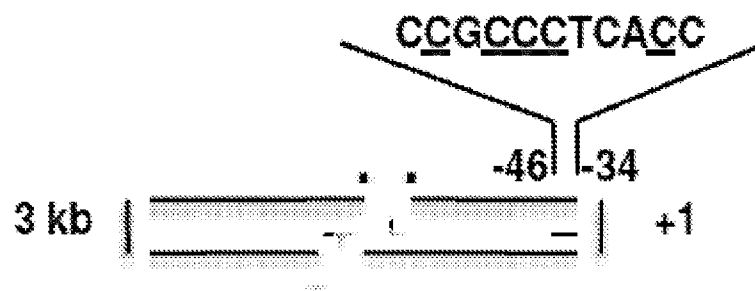


Figura 5C

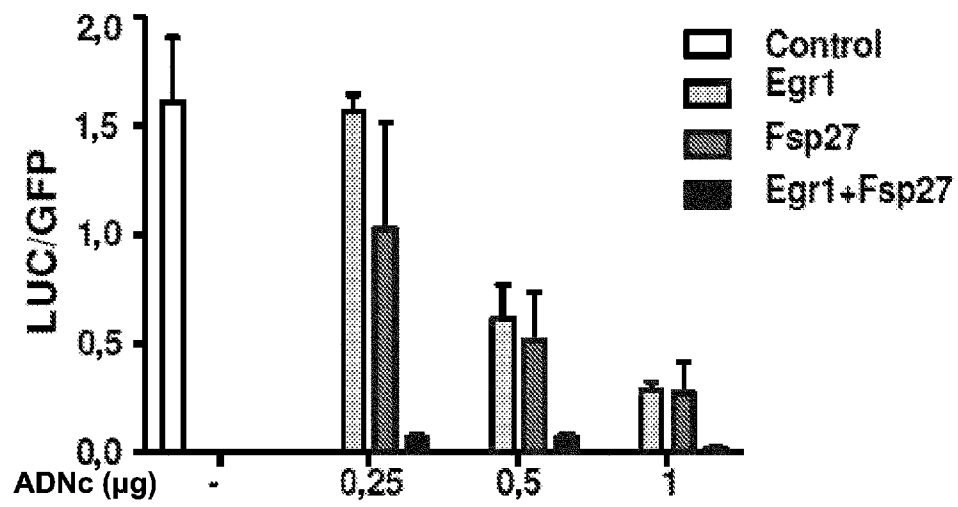


Figura 5D

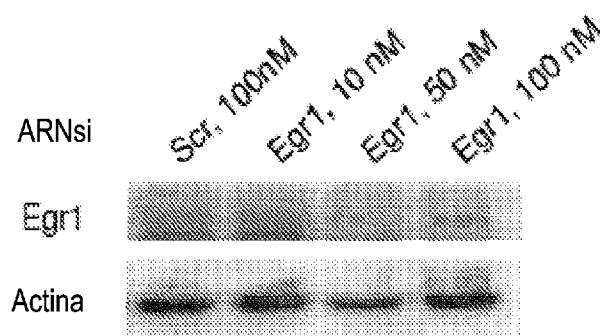


Figura 5E

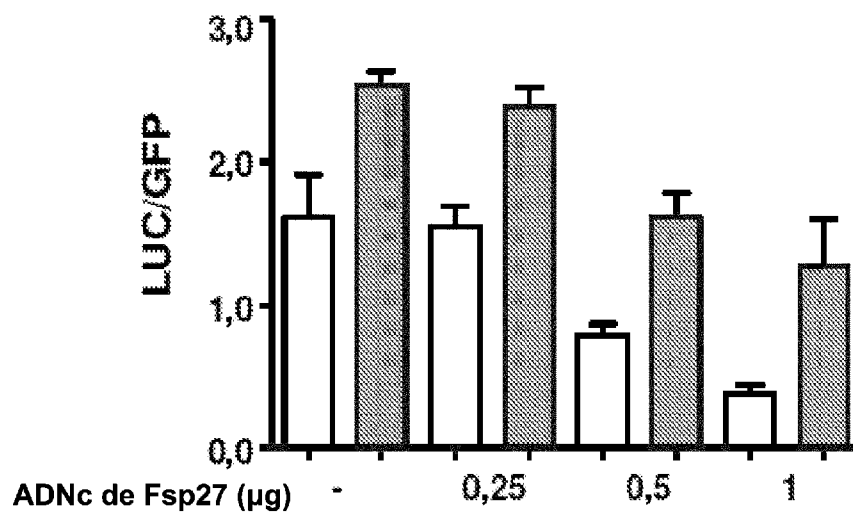


Figura 5F

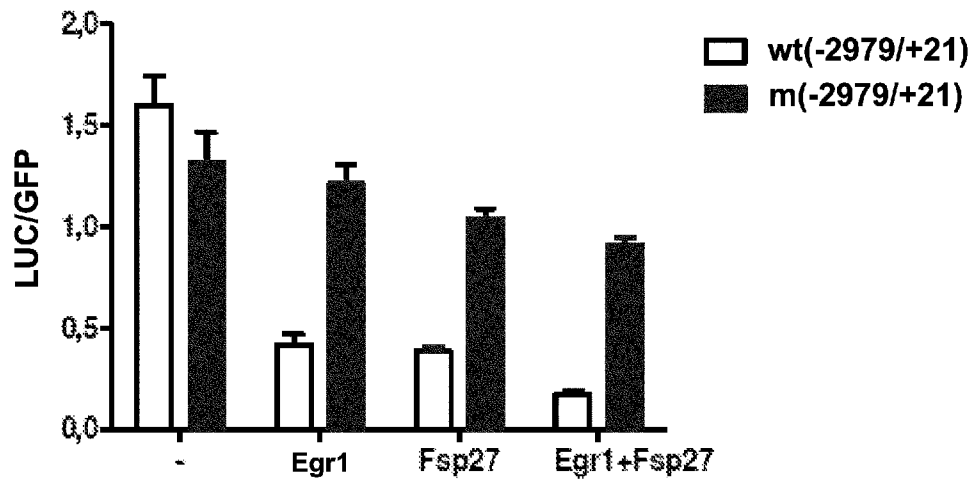


Figura 5G

ARNip Scr	+	-	+	-
ARNip de FSP27	-	+	-	+
Insulina (1 nM)	-	-	+	+

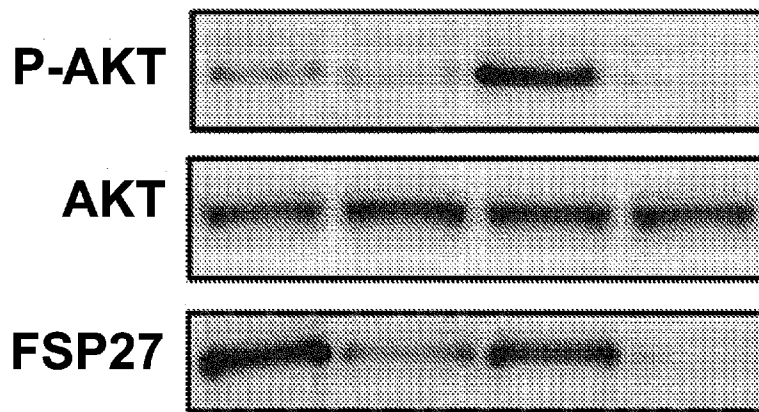


Figura 6A

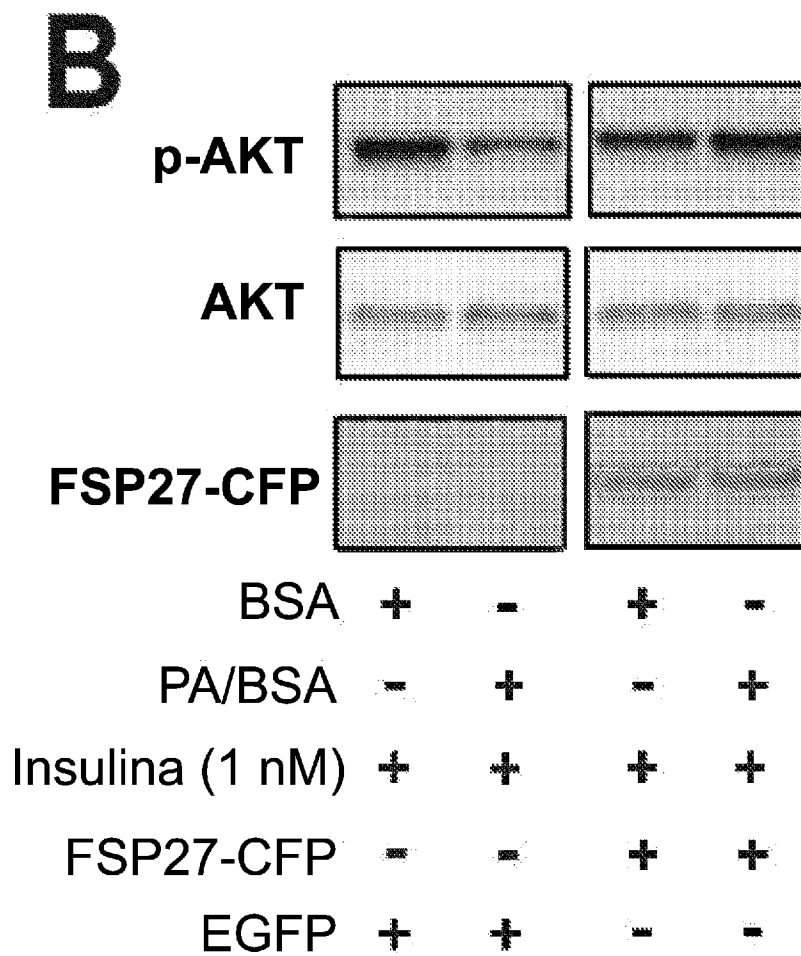


Figura 6B

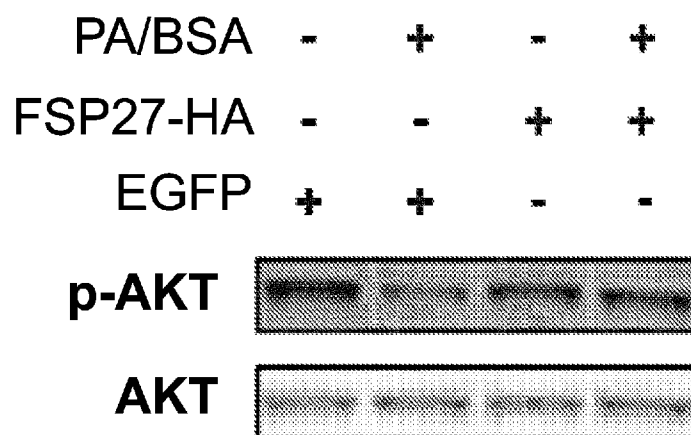


Figura 6C

PA/BSA	-	+	-	+
FSP27-HA	-	-	+	+
EGFP	+	+	-	-



Figura 6D

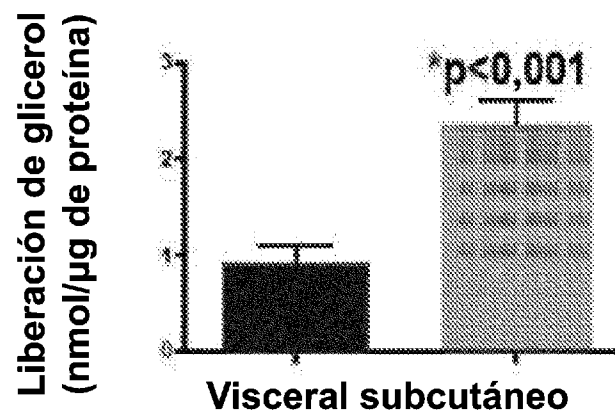


Figura 7

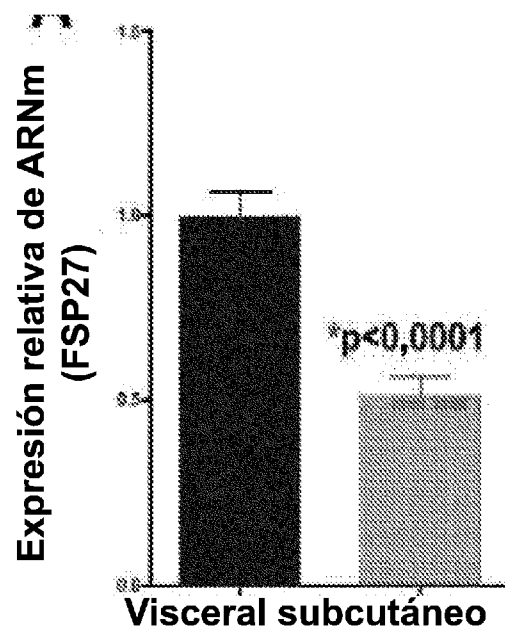


Figura 8A

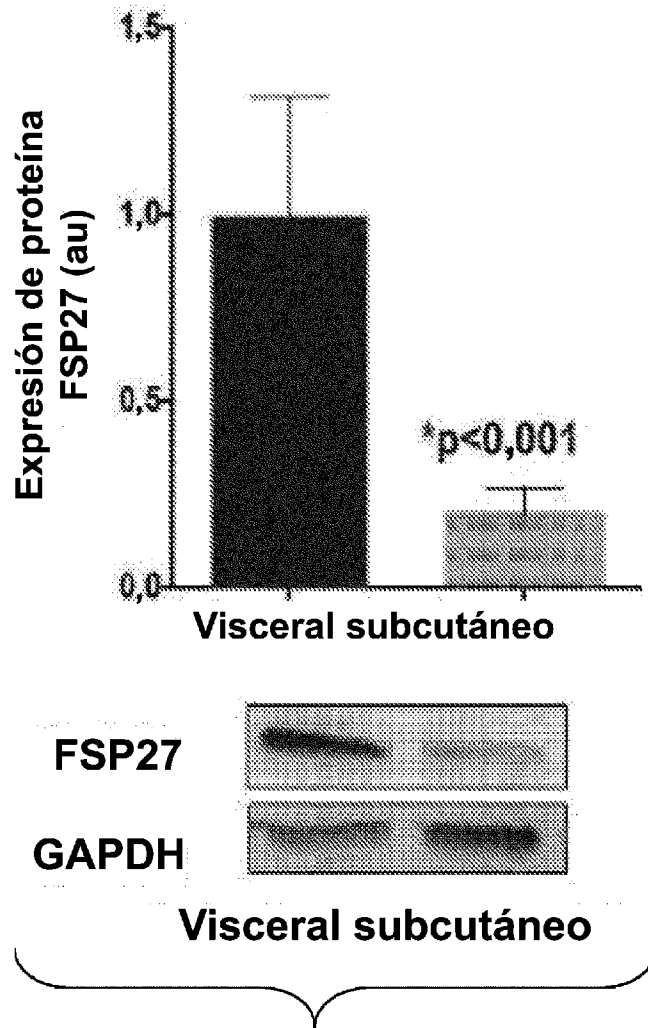


Figura 8B

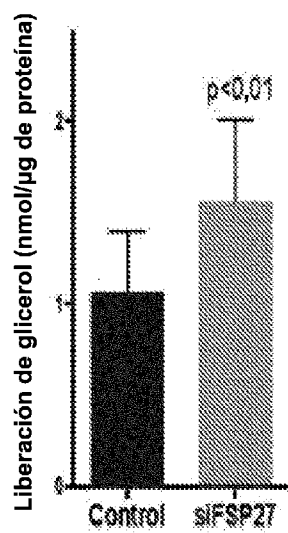


Figura 9A

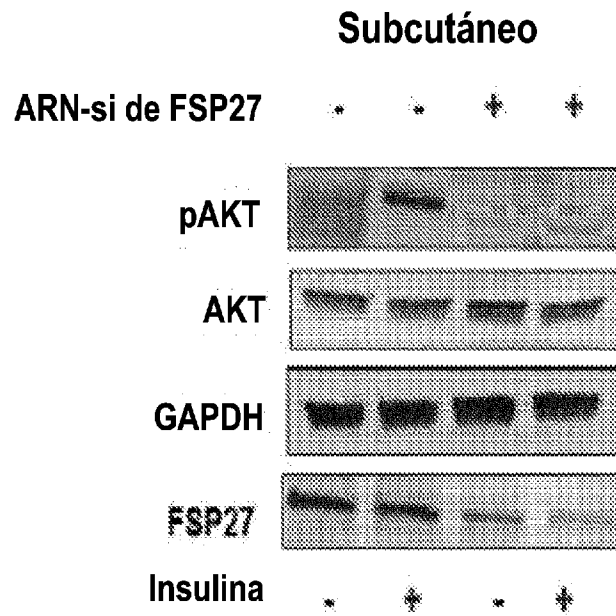


Figura 9B

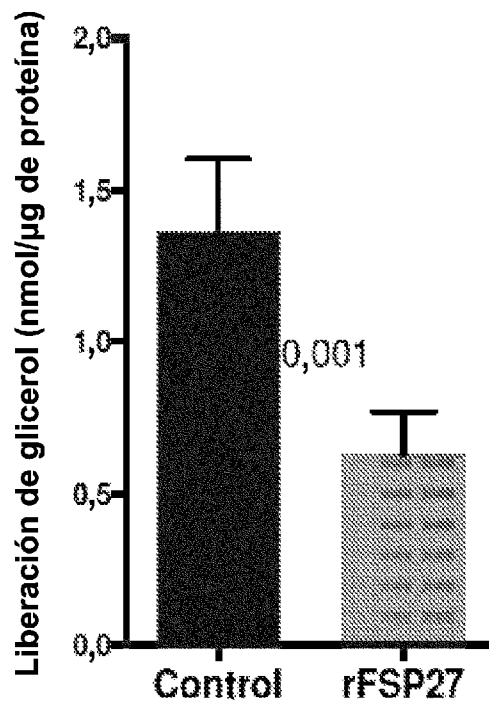


Figura 10A

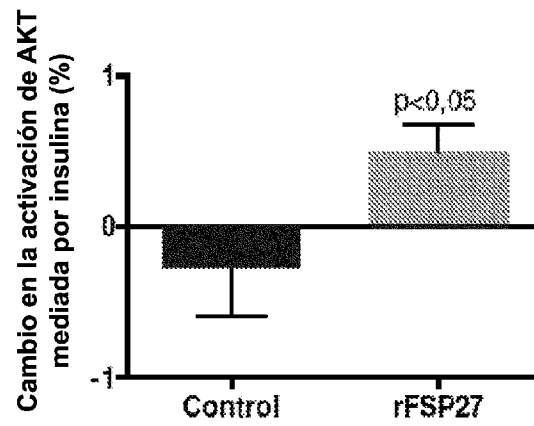


Figura 10B

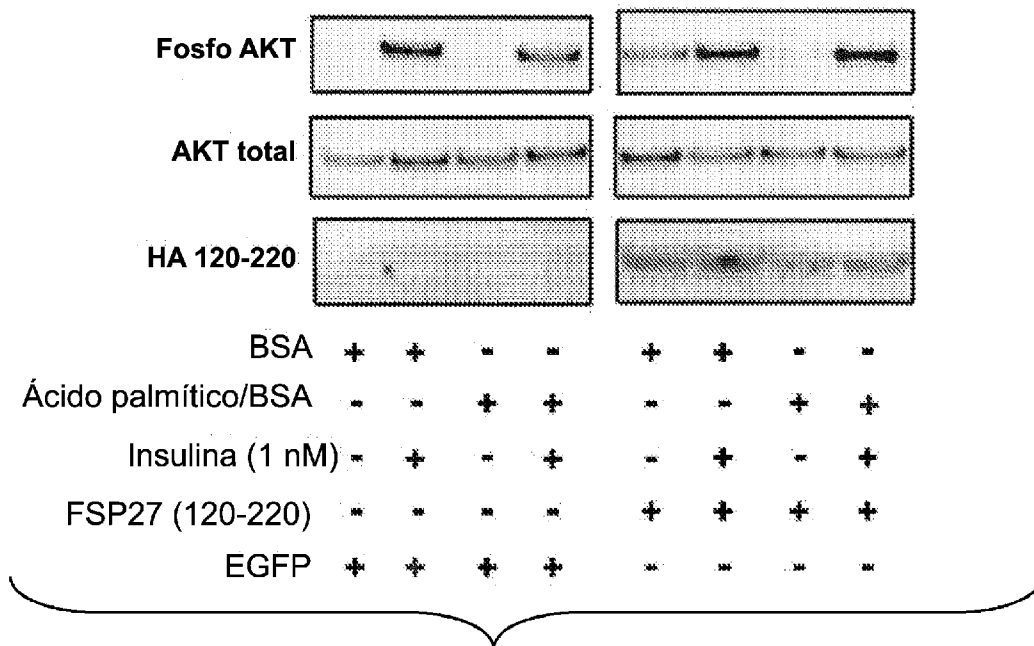


Figura 11

Agrandamiento de LD

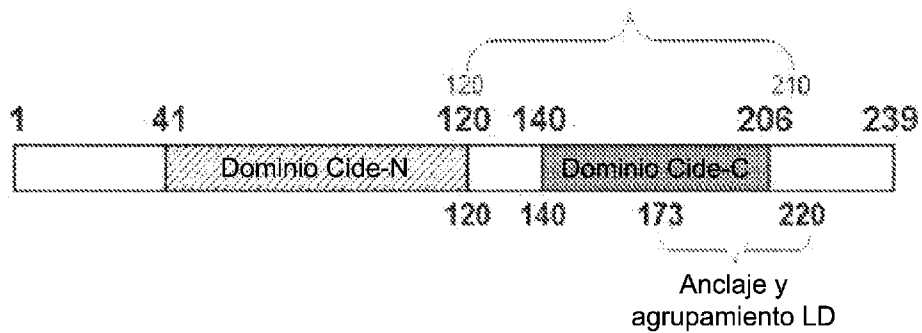
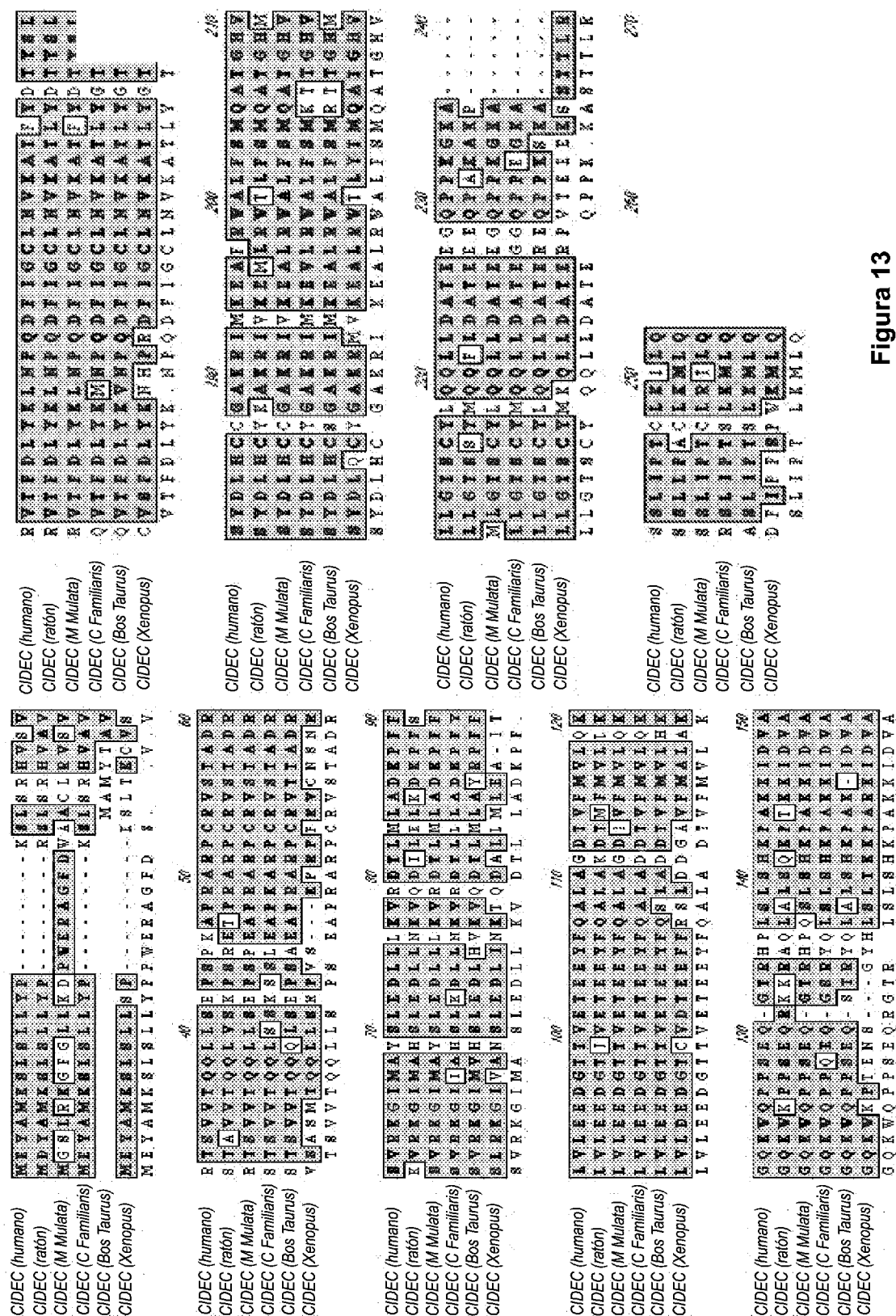


Figura 12



Prueba de tolerancia a insulina

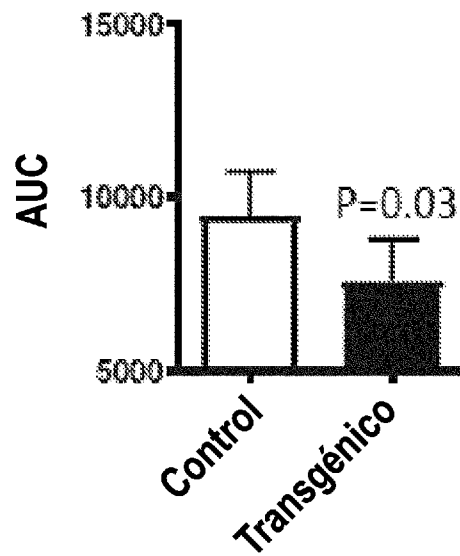
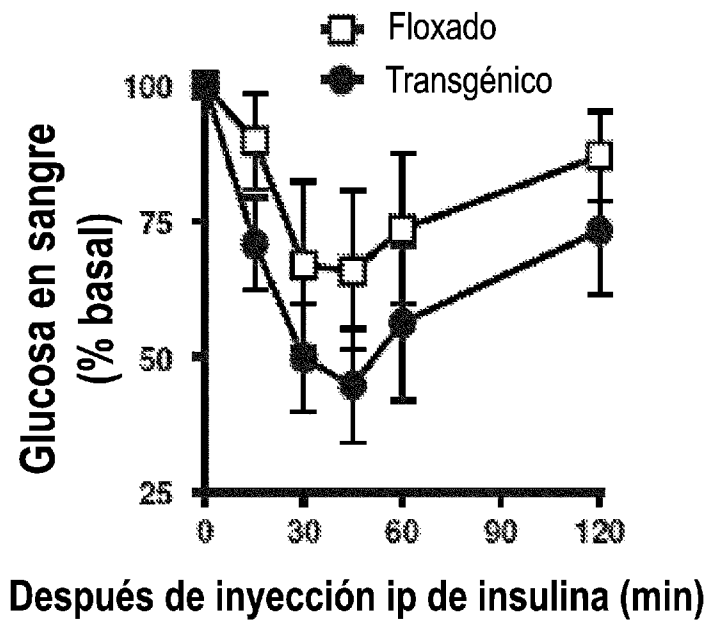


Figura 14A

Prueba de tolerancia a glucosa

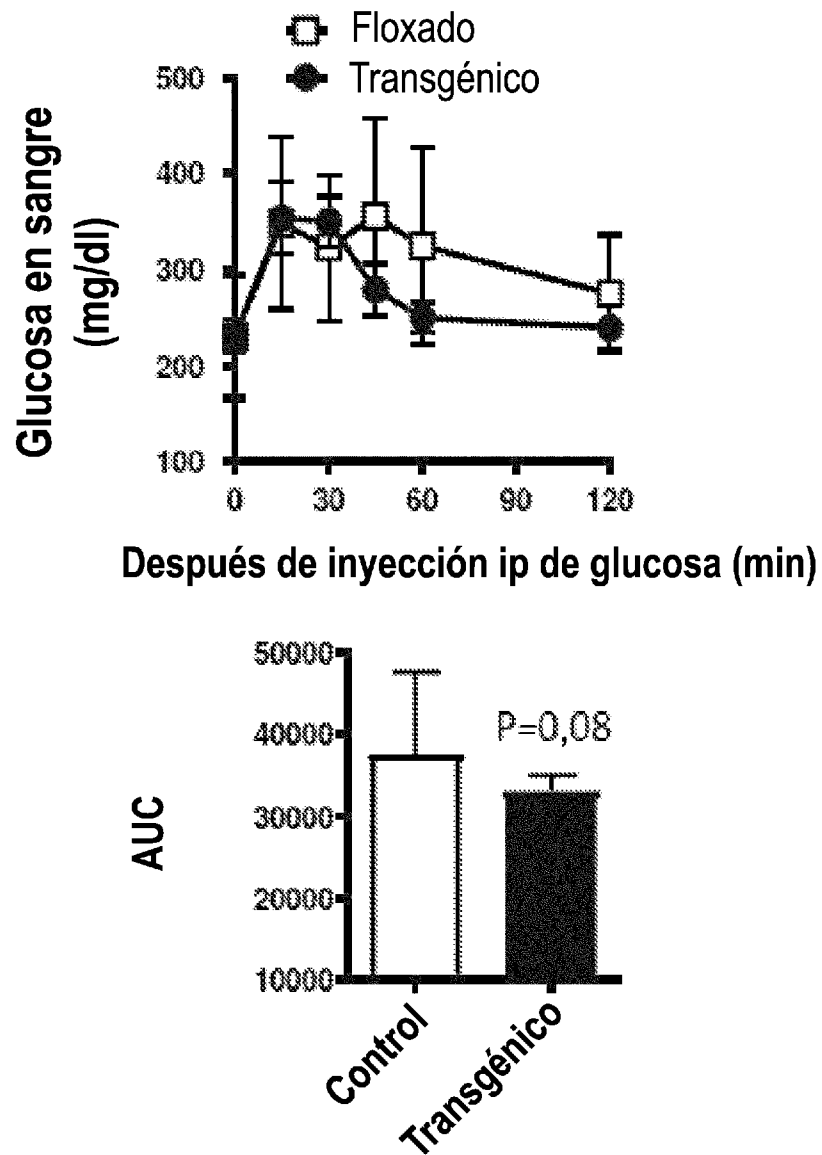


Figura 14B

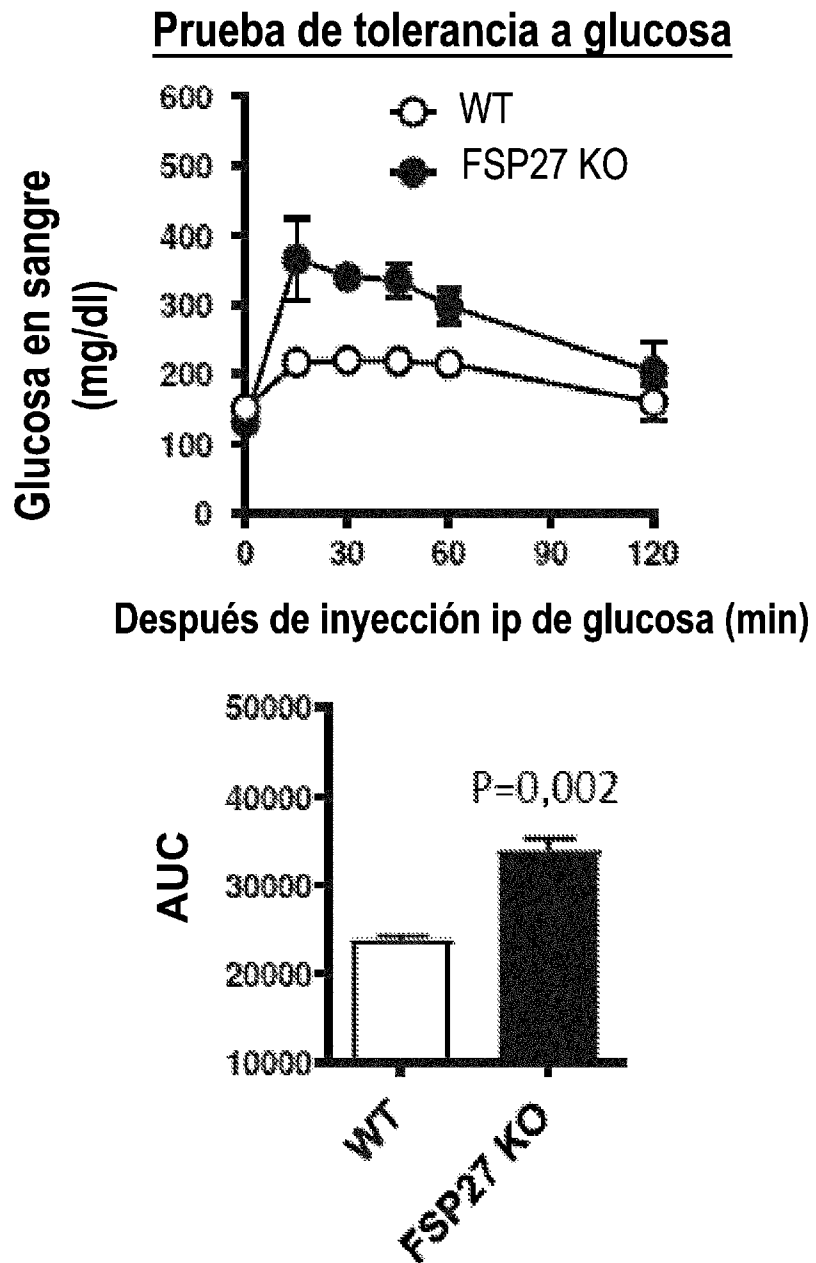


Figura 15A

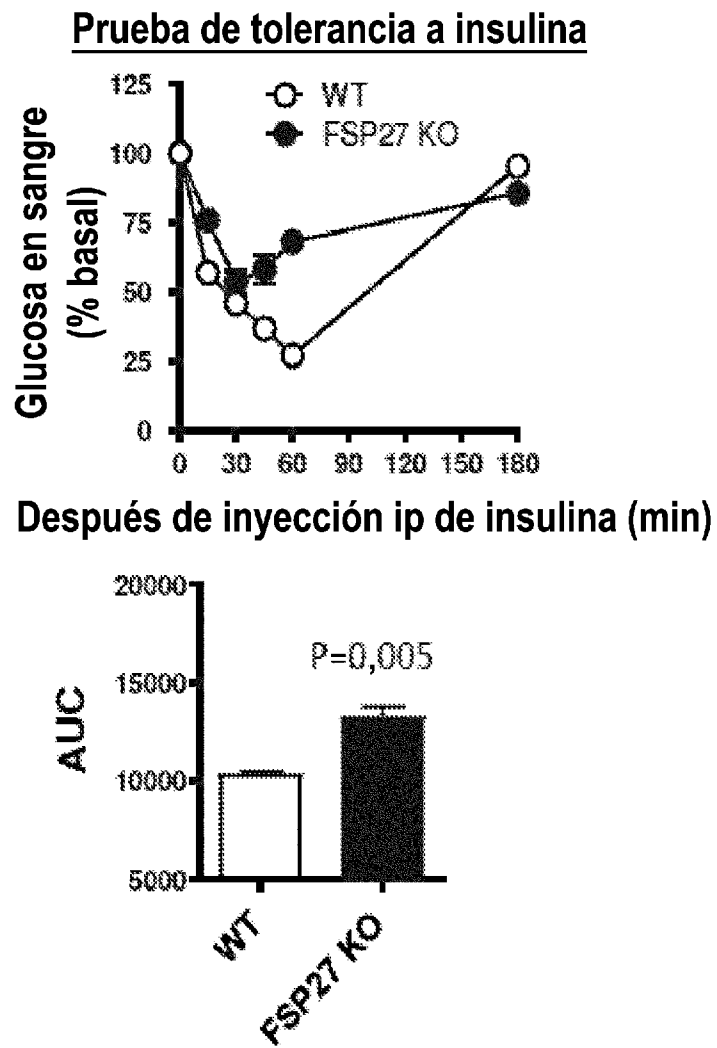


Figura 15B

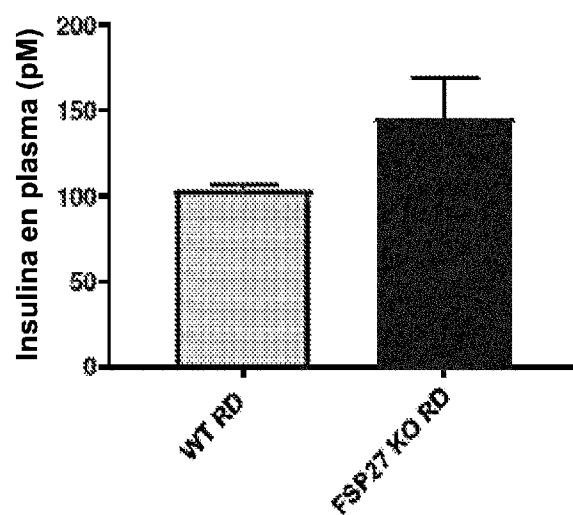


Figura 16A

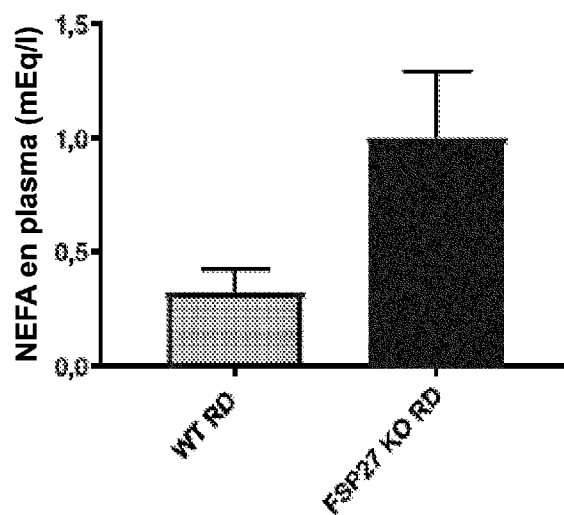


Figura 16B