

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 640**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009 E 09753933 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2310037**

54 Título: **Conglutina gamma como medicamento y suplemento dietético**

30 Prioridad:

30.05.2008 US 57235 P

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

03.11.2014

73 Titular/es:

**POLICLINICO SAN DONATO S.P.A.- ISTITUTO DI
RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO
(100.0%)
Via Morandi 30
20097 San Donato Milanese(MI), IT**

72 Inventor/es:

**TERRUZZI, ILEANA, MARINA y
LUZI, LIVIO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 517 640 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

Conglutina γ como medicamento y suplemento dietético

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los efectos de la conglutina γ en la vía IRS/AKT/P70S6k, así como en la activación de las MAP quinasas, Cbl, caveolina 3 y GSK3. Se muestra que la conglutina γ regula el metabolismo de la energía muscular, la síntesis de proteínas y la transcripción de genes de la MHC a través de la modulación de los mismos componentes de la señalización de la insulina. Por lo tanto, la conglutina γ se puede usar por vía oral para mejorar la diferenciación de las células musculares o el crecimiento muscular.

Estado de la técnica

15 La semilla del altramuz, una leguminosa comestible de la región mediterránea, es conocida como producto antidiabético en la medicina tradicional. Se encontró que la conglutina γ (Nº de acceso: CAC16394), una abundante glucoproteína de la semilla del altramuz, era capaz de unirse a la insulina de mamífero con una Kd de aproximadamente 7×10^{-5} M, causando una reducción significativa de la glucosa en plasma cuando se administraba por vía oral tras ensayos de sobrecarga de glucosa en ratas. Por estas razones, la conglutina γ se identificó como la molécula candidata responsable de la actividad biológica reivindicada, y la presente invención examina su mecanismo de acción celular mimético de la insulina. La insulina es la principal hormona responsable del control de la proteosíntesis, a través de la modulación de la vía IRS/AKT/P70S6k/PHAS1, la homeostasis de la glucosa, el transporte de la glucosa estimulante alcanzado, la captación de la glucosa y la síntesis de glucógeno a través de la activación de PKC, flotilina 2, caveolina 3 y Cbl, y la hipertrofia muscular a través del control de la transcripción de los genes de la MHC (cadena pesada de la miosina) específica del músculo a través de la vía de las ERK mediada por la insulina.

La conglutina γ de altramuz es una proteína monoglucosilada que consiste en dos subunidades unidas por disulfuro de 30 y 17 kDa. Esta unidad monomérica se somete a la asociación al tetrámero reversible dependiente del pH a valores de pH neutro a ligeramente alcalino (1, 2). La conglutina γ en su configuración nativa normalmente no es resistente a la proteólisis por tripsina (3), y otros autores han demostrado recientemente que la conglutina γ se une a la insulina *in vitro* con una Kd de aproximadamente 7×10^{-5} M y reduce significativamente la glucosa en plasma en los roedores a dosis que varían de 30 a 120 mg/kg de peso corporal (4). Una vez que la insulina se ha unido a su propio receptor, causa una serie de reacciones de fosforilación/desfosforilación que llevan la señal de la insulina del receptor a las vías metabólicas y mitogénicas finales (Fig. 1). La solicitud de patente WO2004071521 describe el uso de la conglutina de altramuz para el tratamiento de la diabetes de tipo II. En particular, se desvela que el tratamiento previo de las ratas con conglutina γ de altramuz reduce significativamente el aumento de los niveles de glucosa en plasma inducidos por una administración oral de glucosa de 2 g/kg.

40 La solicitud de patente WO2005/077400 desvela una mezcla de péptidos ricos en cisteína para la mejora de la homeostasis del tiol. En particular, los péptidos comprenden al menos el 6,5 % en peso de cisteína, y se pueden producir escindiendo las proteínas de conglutina γ de altramuz en péptidos que después se digieren en péptidos que tienen una cisteína terminal.

45 En la presente invención, se evaluó el efecto de la conglutina γ en un modelo *in vitro* de mioblastos murinos, valorando la fosforilación/activación de quinasas intracelulares comunes a la cascada de señalización de la insulina. Los resultados de la presente invención indican que, sorprendentemente, la conglutina γ comparte con la insulina efectos comunes sobre las quinasas intracelulares ensayadas en el presente documento, siendo así un agente mimético de la insulina.

50 De hecho, en la presente invención se demuestra que, sorprendentemente, la estimulación tanto con insulina como con conglutina γ produjo la activación persistente de quinasas de la vía sintética de proteínas, así como el aumento del transporte de glucosa, la translocación de GLUT4 y la regulación de la transcripción génica específica del músculo dependiente de las ERK. Estos resultados indican que la conglutina γ regula el metabolismo de la energía muscular, la síntesis de proteínas y la transcripción de los genes de la MHC a través de la modulación de los mismos componentes de la señalización de la insulina. En particular, la conglutina γ modula la diferenciación y el crecimiento de las células musculares.

Además, la presente invención muestra cómo la conglutina γ promueve el anabolismo muscular evaluando la modulación de las quinasas intracelulares de la proteína de la semilla de altramuz que participan en la cascada de señalización de la insulina y en el efecto anabólico de la insulina, en un modelo murino *in vivo*. Por lo tanto, dicha proteína de leguminosa se puede usar como agente terapéutico en muchas patologías como la diabetes y otras afecciones resistentes a la insulina.

65

Sumario de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es un extracto de enriquecido proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular.

Otro objetivo es el uso de un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ para la preparación de un medicamento en forma de suplemento dietético para mejorar el rendimiento de resistencia.

Otro objeto es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ , y aditivos y/o diluyentes apropiados para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular.

Otro objeto es el uso de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ , y aditivos y/o diluyentes apropiados como suplemento dietético para mejorar el rendimiento de resistencia. La composición puede ser para la administración oral o cualquier otra forma adecuada.

Otro objeto es una composición de suplemento dietético que comprende una cantidad eficaz de un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ , y aditivos y/o diluyentes apropiados para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular. La composición puede ser para la administración oral o cualquier otra forma adecuada.

El extracto enriquecido de proteína conglutina γ de la semilla de altramuz (en general, del 10 al 30 % en peso de proteínas totales) se prepara de acuerdo con cualquier método conocido por el experto en la materia, tal como de acuerdo con al referencia 25.

Descripción detallada de la invención

Leyendas de las figuras

La invención se describirá ahora mediante ejemplos no limitantes en referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: vías intracelulares de señalización de la insulina.

Figura 2: Panel A: patrón de SDS-PAGE en condiciones reductoras de la conglutina γ purificada (línea: 1) en comparación con el extracto total de proteína de altramuz (línea: 2). Se hicieron visibles dos bandas principales de Mr de aproximadamente 30 y 16-17 kDa. Los tamaños de estas bandas se ajustaron a los de las subunidades de conglutina γ grande y pequeña. Previamente, se encontró una banda menor de 48 kDa correspondiente al precursor de conglutina γ sin escindir [resultados no publicados]. Esta preparación de proteína se consideró suficientemente homogénea para ser adecuada para los ensayos celulares (M = marcadores). Panel B: la transferencia de proteína con anticuerpos específicos confirmó la identidad de las proteínas y la falta de diferencias aparentes entre la conglutina γ purificada (línea: 1) y la del extracto de proteína total (línea: 2), lo que sugiere que no se produjo modificación alguna durante el procedimiento de purificación. (M = marcadores).

Figura 3: transferencia representativa del contenido de proteína del sustrato del receptor de insulina 1 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 4: transferencia representativa del contenido de subunidad p85 de PI3K en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I) o conglutina γ (Cg), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 5: transferencia representativa del contenido de proteína AKT-1 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 6: transferencia representativa de la fosforilación de p70S6K en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 7: transferencia representativa de la fosforilación de PHAS-1 α en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 8: transferencia representativa de la fosforilación de PHAS-1 β en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 9: transferencia representativa del contenido de proteína eiF4-E en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 10: transferencia representativa del contenido de proteína PKC en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 11: transferencia representativa del contenido de proteína flotilina-2 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 12: transferencia representativa del contenido de proteína caveolina-3 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 13: transferencia representativa de la fosforilación de Cbl en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I) o conglutina γ (Cg), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 14: transferencia representativa de la fosforilación de ERK-1 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 15: transferencia representativa de la fosforilación de ERK-2 en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 16: transferencia representativa de la expresión de los genes de la MHC (contenido de proteína) en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 17: transferencia representativa del contenido de miogenina en miofibrillas C2C12 sin estimulación (C) o tras la estimulación con insulina (I), conglutina γ (Cg) o metformina (Mf), en los puntos temporales descritos en los métodos. Los resultados de los análisis de densitometría se expresan como unidades arbitrarias en relación con la cantidad de proteína diana a los 0 min. La cuantificación de proteína se ajustó para el nivel de tubulina α correspondiente.

Figura 18: se diferenciaron mioblastos C2C12 durante 74 h y se trataron como se describe en el apartado métodos. A) Se detectó por inmunofluorescencia la MHC en miotubos de control y estimulados con Mf, Cg e I, respectivamente (rojo). B) Se dispusieron imágenes de miotubos positivos en MHC sobre imágenes de núcleos teñidos con DAPI. C) Se hizo un recuento de los núcleos presentes en los miotubos positivos en MHC y se representó gráficamente la media. D) Se midieron los diámetros de los miotubos positivos en MHC y se representó gráficamente la media expresada en cm. E) Se midieron los diámetros de los miotubos positivos en MHC y se representó gráficamente la media expresada en cm. F) Se determinó el número de núcleos teñidos con DAPI presentes en las células positivas en MHC/el número de núcleos teñidos con DAPI totales por campo microscópico y se expresó en forma de porcentaje.

Fig. 19: diseño del ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) (descripción detallada en el

apartado de Métodos).

Fig. 20: efecto del tratamiento con conglutina γ e insulina en el IPGTT. El panel representa la media de la concentración de glucosa en sangre durante el IPGTT registrada en 3 ratones de cada grupo. Las líneas de los símbolos representan el ETM.

Fig. 21: Panel A: transferencia representativa del contenido de proteína receptor β de la insulina (IR- β) en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la expresión de la proteína IR- β en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 22: Panel A: transferencia representativa del contenido de proteína AKT1 en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la expresión de la proteína AKT1 en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 23: Panel A: transferencia representativa del contenido de proteína GSK-3 en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la expresión de la proteína GSK-3 en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 24: Panel A: transferencia representativa de la fosforilación de p70S6k en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la fosforilación de p70S6k en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los valores son proporciones de expresión de p70S6k fosforilada con respecto a la total. Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 25: Panel A: transferencia representativa del contenido de proteína Glut-4 en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la expresión de la proteína Glut-4 en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 26: Panel A: transferencia representativa de la fosforilación de p38 en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la fosforilación de p38 en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los valores son proporciones de expresión de p38 fosforilada con respecto a la total. Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 27: Panel A: transferencia representativa de la fosforilación de ERK1 y ERK2 en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la fosforilación de ERK1 y ERK2 en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los valores son proporciones de expresión de ERK1 y ERK2 fosforiladas con respecto a las totales. Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Fig. 28: Panel A: transferencia representativa del contenido de proteína eIF4E en el músculo gastrocnemio de ratones tomado de los cuatro grupos de estudio al final del IPGTT (120 min). Panel B: efecto de la insulina y la conglutina γ en la expresión de la proteína eIF4E en el músculo gastrocnemio murino recogido al final del estudio IPGTT (120 min). Los niveles relativos de la expresión de la proteína se normalizaron con respecto a la β -actina. Las veces de cambio para cada condición se calculan como la expresión media en todas las muestras tratadas dividida entre la expresión media en todas las muestras en la condición basal.

Materiales y métodos

Materiales. Los anticuerpos primarios monoclonales o policlonales anti-actina (1-19), anti-AKT (C-20), anti-caveolina-3 (A-3), anti-eIF4E (P-2), anti-flotilina-2 (H-90), anti-IRS1 (H-165), anti-miogenina, anti-p85 de quinasa PI3 (Z-8), anti-PKC (H-300), anti-tubulina β (TU-16), anti-ERK fosforilada (E-4), anti-MHC, anti-Cbl fosforilada (Tyr700) y anti-p70 S6 quinasa fosforilada (Thr421/Ser 424), anti-PHAS1, y los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). El resto de reactivos se adquirió en Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Los mioblastos C2C12 murinos se adquirieron en la Colección

Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC).

Purificación de la conglutina γ de altramuz. La conglutina γ se purificó como se ha descrito anteriormente mediante el uso de una combinación de cromatografía de intercambio de aniones y de cationes (1). Se liofilizó la proteína purificada y se volvió a suspender en los tampones apropiados antes de su uso. Para la estimación de las concentraciones de conglutina γ , se hicieron mediciones ópticas a 280 nm. Se usó el coeficiente de extinción de 1 para una solución de 1 mg/ml de acuerdo con (2).

Técnicas electroforéticas. Se realizó la SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 10 % NuPAGE Novex usando una minicelda XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Milán, Italia). Se usaron tampón de migración NuPAGE MES SDS y patrón previamente teñido SeeBlue Plus2 (Invitrogen, Milán, Italia). Este procedimiento garantizó la visualización de polipéptidos en el intervalo de Mr de 200 a 3 kDa. Los geles se tiñeron con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Milán, Italia).

Para el análisis de transferencia de proteínas, se transfirió el gel a membrana de transferencia de nitrocelulosa (Protran®, Whatman® Schleicher & Schuell) mediante transferencia de acuerdo con Towbin *et al.* (6) sobre una celda de transferencia electroforética Trans-blot (Bio-Rad, Milán, Italia). Se bloqueó la membrana con gelatina al 3 % durante 2 horas y se lavó tres veces con solución de gelatina al 0,25 %, en tampón PBS (NaPi 10 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM). A continuación, se empapó la membrana durante 2 horas en tampón PBS que contenía conglutina γ anti-conejo en la proporción de 1.500/1 (v/v). Se preparó el antisuero y se purificó por inmunoadfinidad como se ha descrito anteriormente. Las bandas se revelaron mediante el uso de conjugado de peroxidasa de rábano picante con antisuero de cabra anticonejo a 2.000/1 (v/v) (Bio-Rad, Milán, Italia) y peróxido de hidrógeno con 4-cloronaftol como sustrato.

Protocolo experimental. Se cultivaron mioblastos C2C12 a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en un medio de crecimiento (GM) que contenía DMEM suplementado con FBS al 20 % (v/v) (suero bovino fetal), penicilina-estreptomicina al 1 % y L-glutamina al 1 %. Se inició la diferenciación celular colocando cultivos celulares con una confluencia del 70 % en DMEM suplementado con HS al 1 % (suero de caballo) y antibióticos (DM). Para preparar cultivos de miotubos, se cultivaron mioblastos en DM durante 72 horas. Las células usadas como control (C) se cambiaron de nuevo a GM durante el experimento. Se reemplazaron otros tres grupos de células en GM con la adición selectiva, respectivamente, de insulina (I; 100 nM), conglutina γ (Cg; 0,5 mg/ml) y metformina (Mf; 400 μ M). Para cada condición experimental, las células se lisaron a los 0, 5, 10, 20 y 30 minutos después de la adición de estímulos.

Para el análisis de inmunofluorescencia, se estimularon mioblastos C2C12 diferenciados como se ha descrito anteriormente con insulina, conglutina γ y metformina durante 30 minutos. En las células diferenciadas inmunoteñidas con anti-MHC, se determinaron los núcleos teñidos con DAPI por miotubo, y la longitud y el diámetro de los miotubos, y se expresaron los valores medios.

Estudio in vivo. Para este protocolo, se utilizaron ratones C57B1/6 de tipo silvestre. Se realizó el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) mediante la inyección de glucosa (2 g/kg de peso corporal) i.p. en tres grupos de ratones mantenidos en ayunas durante la noche. Treinta minutos antes de la administración de la glucosa, se inyectó conglutina γ (120 mg/kg de peso corporal) i.p. en el grupo de ratones de "conglutina". En el grupo de ratones de "insulina", se administró insulina (0,5 U/kg de peso corporal) i.p. al mismo tiempo de la inyección de glucosa (punto temporal 0). Se determinaron los niveles de glucosa en sangre antes (30 y 0 minutos) de la inyección y 30, 60, 90 y 120 min después de la inyección. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola y se usaron los plasmas para medir la concentración de glucosa mediante el reflectómetro de glucosa. Al final del estudio, se extrajo el músculo gastrocnemio. Se sacrificó un grupo de ratones en ayunas durante la noche (basal) antes del estudio y se extrajo el músculo gastrocnemio. Como control, se usó un grupo de animales que había recibido solución salina en lugar de insulina o conglutina γ (solución salina).

Análisis de inmunotransferencia. Se homogenizaron miofibrillas C2C12 en tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 %, ortovanadato de sodio 1 mM (Na₃VO₄), EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, 1 mg/ml de aprotinina, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de pepstatina) y se agitaron durante 1 h a 4 °C. Se retiró el material insoluble en detergente de la suspensión celular por centrifugación a 12.000 xg durante 30 min. Se resolvieron alícuotas de 30 μ g de sobrenadantes proteicos de las diferentes muestras mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sodio) al 8 % (IRS1, MHC, miogenina y p-CBL), al 10 % (p85 de PI3K, AKT1, p-p70 S6K y PKC), al 12 % (eIF-4E, p-ERK1, p-ERK2, caveolina-3 y flotilina-2) y al 15 % (PHAS1). Se transfirieron las proteínas sometidas a electroforesis a membranas de nitrocelulosa usando un sistema Mini Trans-Blot de Bio-Rad. Se bloquearon las transferencias con 50 mg/ml de leche desnatada en polvo en Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM durante 1 h a temperatura ambiente, y después se incubaron durante la noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios en 10 mg/ml de leche desnatada en polvo, TRIS/HCl 20 mM, pH 7,4 y NaCl 100 mM y Tween 20 al 0,3 %. Tras varios lavados, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios específicos de cada especie. Se visualizaron las bandas inmunorreactivas mediante un método de quimioluminiscencia mejorado (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.).

Se separó la membrana y se volvió a sondear con un anticuerpo contra la actina o la tubulina para confirmar la igualdad de carga de proteína por muestra. Se realizó la medición cuantitativa de las bandas inmunorreactivas mediante el análisis densitométrico usando el software Scion image (Scion Corporation, Frederick, MD, EE.UU.).

Análisis de inmunotransferencia de biopsias musculares. Se congeló el músculo gastronemio extraído en nitrógeno líquido inmediatamente después de la escisión y, a continuación, se almacenó a -80 °C. Se interrumpió un gramo de tejido con 1,5 ml de tampón RIPA enfriado con hielo y se homogeneizó con un homogeneizador Dounce, manteniendo la temperatura a 4 °C durante todos los procedimientos, y después se incubó en hielo durante 30 minutos. Se transfirió el homogeneizado a tubos de microcentrifugación, se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante líquido que contenía la proteína total de tejido de músculo esquelético de ratones se sometió a SDS-PAGE e inmunotransferencia usando detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) como se describe en "Análisis de inmunotransferencia" del apartado de Métodos.

Análisis de inmunofluorescencia. Para la inmunofluorescencia, se fijaron las células en paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 %, y se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1 %. A continuación, se tiñeron las células por inmunotinción con rodamina anti-MHC conjugada y los núcleos revelados con la tinción de DAPI.

Resultados

Homogeneidad de la conglutina γ de altramuz. La Fig. 2A muestra el patrón de SDS-PAGE en condiciones reductoras de la conglutina γ purificada en comparación con el extracto de proteína de altramuz total. Se hicieron visibles dos bandas principales de Mr de aproximadamente 30 y 16-17 kDa. Los tamaños de estas bandas se ajustaron a los de las subunidades de conglutina γ grande y pequeña. Previamente, se encontró una banda menor de 48 kDa correspondiente al precursor de conglutina γ sin escindir. Esta preparación de proteína se consideró suficientemente homogénea para ser adecuada para los ensayos celulares. La transferencia de proteína con anticuerpos específicos (Fig. 2B) confirmó la identidad de las proteínas y la falta de diferencias aparentes entre la conglutina γ purificada y la del extracto de proteína total, lo que sugiere que no se produjo modificación alguna durante el procedimiento de purificación.

Análisis de proteína de señalización de la insulina. En sus trabajos anteriores, los autores de la presente invención centraron su investigación en las vías moduladas por la insulina implicadas en el anabolismo proteico, la homeostasis de la glucosa, la expresión génica y la regulación de la traducción de ARNm, en diferentes tejidos. (7-9). Para evaluar el efecto mimético a la insulina de la conglutina γ , observaron la capacidad tanto de la insulina como de la proteína de altramuz para estimular las mismas vías *in vitro*. La metformina, el fármaco antidiabético oral de primera línea seleccionado para el tratamiento de la diabetes de tipo II, se usó como control positivo. La Fig. 3 ilustra los patrones típicos de IRS-1 observados en las transferencias Western de miotubo C2C12 en diferentes puntos temporales de estimulación con insulina, conglutina γ o metformina (curso temporal). La insulina estimuló al máximo el contenido de proteína IRS-1 en el plazo de 20 minutos en ~32 %, pero la estimulación de proteína fue superior (~35 %) a los 10 minutos cuando se realizó mediante conglutina γ . La metformina ejerció un aumento gradual de la activación de IRS-1, que alcanzó el máximo a los 30 minutos (~76 %).

La insulina potenció la activación de p85 de quinasa PI3 (Fig. 4) en 5 minutos (~62 %), y el efecto duró hasta el final del experimento (~56 %). El efecto de la conglutina γ fue más lento pero potente, con un efecto máximo a los 30 minutos (~40 %). La Fig. 5 muestra la activación de Akt-1, una diana corriente debajo de la PI3-quinasa implicada en la vía de señalización de la insulina que conduce a la utilización de glucosa, a la síntesis de glucógeno y proteínas, y a la traducción dependiente de CAP. La insulina y la conglutina γ modificaron la concentración de proteína Akt-1 a los 20 minutos (~13 % y 33 %, respectivamente), mientras que la metformina ejerció su efecto máximo a los 5 minutos (~20 %).

Para explorar la vía que participa en la síntesis de proteínas, los autores investigaron si la insulina y la conglutina γ eran capaces de inducir la fosforilación de p70S6K, PHAS-1 y eIF-4E en miotubo C2C12. Como se observa en la Fig. 6, la insulina indujo una fosforilación de p70S6K en 5 minutos (~40 %) hasta 30 minutos (~94 %). La conglutina γ ejerció un estímulo máximo sobre la fosforilación de la p70 S6 quinasa en 5 minutos (67 %) que persistió, pero disminuyó gradualmente hasta los 30 minutos (~50 %). La metformina ejerció un efecto máximo sobre la fosforilación de p70S6K en 10 minutos (~46 %) que disminuyó hasta los 30 minutos (~32 %).

PHAS-1 aparece en la transferencia como una banda que migra rápidamente designada arbitrariamente α (PHAS-1A) y una banda β que migra más lentamente (PHAS-1B), que representa la forma más activa de la enzima. Las figuras (Fig. 7 y 8) muestran que la densidad de las bandas α y β se aumentó más en las células estimuladas con conglutina γ , insulina y metformina con respecto al control.

La Figura 9 representa la cantidad de eIF4E tras la estimulación con insulina o conglutina γ en miotubo C2C12. La

insulina aumentó la concentración de proteína eIF4E con un efecto persistente de 5 a 20 minutos (~45 %). Este efecto disminuyó pero duró hasta el final del experimento (~30 %). La conglutina γ estimuló la concentración de proteína eIF4E en 5 minutos (~21 %), y el efecto aumentó hasta los 30 minutos (~68 %). La metformina no fue capaz de ejercer una activación de la enzima eIF4E. El transportador de glucosa de las células musculares y adiposas está regulado por la insulina a través de eventos posteriores a la traducción. La PKC, una quinasa corriente abajo del receptor de la insulina y la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa, desempeña un papel muy importante en la activación de la respuesta del transporte de glucosa, pero esta vía no basta para producir la translocación de GLUT4. Una vía independiente de PI3K separada, que implica la fosforilación de tirosina de CBL estimulada por la insulina, promueve la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. La expresión de la flotilina-2 y la caveolina-3 es necesaria para la activación y la modulación de esta vía. Los autores estudiaron la activación de las proteínas implicadas en estas vías, con insulina y conglutina γ . La conglutina γ aumentó la concentración de PKC (Fig. 10) en los mismos valores a los 10 (~28 %) y 20 minutos (~26 %), que se redujo hasta ~20 % al final del experimento. El efecto de la insulina fue previo (5 minutos) y máximo a los 20 minutos (~32 %). La metformina fue capaz de estimular la concentración de proteína más que los otros dos estímulos. También aumentó la concentración de proteína flotilina-2 de los 5 a los 30 minutos en todas las condiciones ensayadas, como se representa en la Fig. 11, con un máximo a los 10 minutos mediante la insulina (~60 %) y la conglutina γ (~52 %). La metformina no ejerció ninguna activación de la flotilina-2. La concentración de proteína caveolina-3 fue aumentada tanto por la conglutina γ como por la insulina con un estímulo máximo a los 10 minutos (~22 %) y 30 minutos (~34 %), respectivamente, como se representa en la Fig. 12. La metformina ejerció una estimulación superior al resto de estímulos, que fue de hasta y superior al 70 % hacia el final del experimento. Los datos presentados en la Fig. 13 muestran la capacidad de la conglutina γ y de la insulina para fosforilar al máximo a Cbl a los 10 minutos (~64 %) y 30 minutos (~56 %), respectivamente. También se examinaron las ERK como quinasas candidatas necesarias para la estimulación de la transcripción de genes y la síntesis de glucógeno mediante la insulina. Los autores usaron su modelo experimental para aclarar la posible implicación de la conglutina γ en la modulación de la actividad de ERK1 y ERK2. Tanto la insulina como la conglutina γ fueron capaces de modificar la concentración de ERK1 y ERK2 con respecto al grupo de control, como se muestra en la Fig. 14 y Fig. 15. La conglutina γ aumentó gradualmente la activación de ERK2 hasta un máximo (~27 %) a los 30 minutos, mientras que la activación de ERK1 alcanzó un máximo a los 20 minutos (~17 %), seguido de una reducción. La insulina provocó una activación máxima de ERK1 a los 20 minutos (~27 %) que duró hasta el final del experimento. En cuanto a la estimulación de ERK2 por la insulina, fue anterior (10 minutos ~20 %) y alcanzó un máximo a los 30 minutos (~28 %). La metformina ejerció una activación superior tanto el ERK1 como en ERK2 con respecto a los otros dos estímulos.

La insulina, tras unirse a su receptor, regula la expresión de varios genes (10). Para evaluar si la conglutina γ es capaz de ejercer un control en la transcripción génica a través de la vía de ERK1/2, los autores estudiaron la expresión de los genes de la MHC específica del músculo, cuya actividad es responsable de un proceso de diferenciación tisular. Como se muestra en la Fig. 16, sorprendentemente, la conglutina γ (como la insulina) fue capaz de aumentar la expresión de MHC (~155 % y ~600 %, respectivamente) con respecto a las células musculares diferenciadas no estimuladas, pero la metformina no fue capaz de inducir la misma expresión génica.

Además, los autores estudiaron la expresión de la miogenina, un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en la activación de los genes de la MHC específicos del músculo. La Fig. 17 muestra el solapamiento de la activación de la miogenina por la insulina y la conglutina γ . También en este caso, la metformina no ejerció ningún efecto.

Para validar el efecto de los estímulos en la expresión de MHC y la diferenciación de los mioblastos, así como para investigar si dichos estímulos implementan el reclutamiento de mioblastos en los miotubos, o la hipertrofia de los miotubos, se estimularon células C2C12 diferenciadas con conglutina γ , insulina y metformina durante 30 minutos y 2 horas respectivamente. Se observó que los mioblastos diferenciados de tres días formaron miotubos hipernucleados con un aumento del tamaño celular. Las imágenes de los miotubos positivos en MHC detectados por inmunofluorescencia (Figura 18 A) dispuestos sobre núcleos teñidos con DAPI (Fig. 18 B) mostraron que el número de núcleos presente en los miotubos positivos en MHC (Fig. 18 C), el diámetro (Fig. 18 D) y la longitud (Fig. 18 E) de los miotubos, así como el índice de fusión aumentan gradualmente en las células estimuladas con Mf, Cg o I en comparación con las células musculares diferenciadas no estimuladas.

Estos estudios fueron impulsados por el conocimiento de que las semillas de altramuz se prefieren como fármaco antidiabético en la medicina tradicional. Desde el primer hallazgo a principios de los años 30 (11, 12), varios autores han intentado aislar los componentes del altramuz con propiedades hipoglucemiantes. Entre los componentes del altramuz, se identificaron los alcaloides de altramuz y otras fracciones solubles. La reciente publicación de los presentes inventores indica que en la conglutina γ se encuentra el compuesto activo que reduce la glucosa en sangre (4).

En la actualidad, los autores investigan el efecto de la conglutina γ en la activación de las siguientes vías de quinasas intracelulares diferentes:

1) **IRS-1/PI-3-quinasa.** La incubación de células con conglutina γ provoca la activación de la vía intracelular

finalmente implicada en la translocación de GLUT-4 y el transporte de glucosa (5). En concreto, la conglutina γ genera una activación del 30 % de IRS-1 con un máximo a los 20 minutos (Fig. 3). La insulina también alcanza el máximo a los 30 minutos en la activación de IRS-1 (aumento de ~35 % por encima del valor basal). Se observó un patrón similar para la fosforilación de la subunidad p85 de la quinasa PI-3 (Fig. 4) con la diferencia de un

5 **2) p70 S6 quinasa/eIF-4E.** La fosforilación de p70 S6 quinasa y eIF-4E se ha asociado con la estimulación de la síntesis de proteínas. El factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF4E liberado como resultado de la fosforilación de PHAS-1, actúa en la etapa limitante de la velocidad de la iniciación de la traducción y promueve la exportación del ARN mensajero (ARNm) de varios genes implicados en el ciclo y el crecimiento celular (13).
10 Los datos actuales muestran que la incubación de mioblastos de ratón con conglutina γ estimula la activación de la p70 S6 quinasa y del eIF-4E como se muestra en las Fig. 6 y 9. Además, la conglutina γ es capaz de estimular la activación de PHAS-1 (FIG 7, 8). La fosforilación de AKT-1 se encuentra corriente arriba de la fosforilación de la p70 S6 quinasa, así como de la activación de eIF-4E, y la insulina y la conglutina γ muestran efectos comparables sobre su fosforilación con una modesta estimulación por encima de la basal en cualquier punto temporal (Fig. 5).

15 **3) Erk-1/Erk-2.** Tanto la conglutina γ como la insulina muestran una activación potente de las vías de las quinasas intracelulares correlacionada con la actividad mitogénica de la célula y la señalización nuclear. Tanto Erk-1 como Erk-2 son activadas por la conglutina γ hasta una estimulación máxima de ~35 % a los 20 min, mientras que la insulina alcanza una activación máxima a los 30 minutos (Fig. 14, 15).

20 **4) GLUT4 de flotilina-2/caveolina-3.** El reclutamiento de los almacenes intracelulares en la membrana plasmática es una etapa crítica para la captación de glucosa tras la estimulación con insulina. En las células del músculo esquelético, la flotilina-2 y la caveolina-3 modulan de manera coordinada la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina, localizada en los dominios perinucleares que contienen flotilina-2, a dominios selectivos del sarcolema. Tras la estimulación con la insulina, los microdominios caveolares que contienen caveolina-3 y el receptor de insulina, se alejan de la membrana plasmática hacia el citoplasma e interactúan temporalmente con los dominios que contienen flotilina-2/GLUT4 antes de alcanzar el sarcolema. Los receptores de insulina se desplazan de los dominios que contienen caveolina-3 a los dominios que contienen flotilina-1, en cuya superficie se encuentra GLUT4. Tras el cambio, la GLUT4, junto con la flotilina-2, se desplaza al sarcolema, promovida por la fosforilación de tirosina estimulada por la insulina de CBL (14). Los presentes resultados muestran que la conglutina γ aumenta tanto la concentración de flotilina-2 como de caveolina-3 (Fig. 11 y 12) y la fosforilación de CBL (Fig. 13), desempeñando un papel importante en el transporte vesicular de GLUT4 y en la regulación del metabolismo de la energía muscular, a través de la modulación de los componentes clave de la señalización de la insulina.

35 La potente actividad similar a la insulina de la conglutina γ es sorprendente, pues su estructura terciaria no es similar a la de la insulina ni a la de ningún compuesto mimético de la insulina conocido. No obstante, la conglutina γ comparte con la insulina algunas características fisicoquímicas: 1) *in vitro*, la conglutina γ se une con una gran afinidad a la propia insulina. Esto puede explicar en parte la sorprendente actividad de tipo insulina mostrada en el presente estudio; 2) al igual que la insulina, la conglutina γ es capaz de unirse a iones metálicos incluyendo Zn^{++} ,
40 Cu^{++} , Cd^{++} y Co^{++} en un orden de afinidad decreciente (15). Todavía no se ha evaluado la relevancia de esta capacidad de unión a iones metálicos en relación con la acción biológica de la conglutina γ . Por el contrario, hay una diferencia llamativa con la insulina, la conglutina γ es muy resistente a la digestión por enzimas gástricas, manteniendo su actividad tras la absorción, aunque todavía no existen estudios farmacocinéticos de la conglutina γ . Obviamente, esta última propiedad hace que esta proteína natural sea muy atractiva como tratamiento contra la diabetes, no solo de tipo 2, sino también de tipo 1. Más allá de las propiedades ya mostradas como agente hipoglucemiante en plasma (4), el descubrimiento de este nuevo mecanismo de acción hace que la conglutina γ sea adecuada como compuesto sensibilizante de la insulina, bien como fármaco o como integrador alimentario en la obesidad y muchas otras afecciones resistentes a la insulina, como el síndrome metabólico (16), el ovario poliquístico (17) y la lipodistrofia por VIH (18).

50 La conglutina γ no es la única proteína vegetal que conserva propiedades de unión a la insulina. En dos artículos de los años 90, un grupo japonés demostró una inusual actividad de unión a la insulina de una proteína de soja, denominada globulina 7S básica (Bg7S) (19, 20). Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios adicionales sobre los efectos de esta proteína en el nivel de glucosa en sangre. Curiosamente, en el transcurso de la labor de purificación y caracterización realizada por los autores en las proteínas de semillas de altramuz, que se remonta a mediados de los años 70, los autores identificaron una proteína de altramuz, distinta de la conglutina γ , sobre la que más tarde se encontró que tenía un 64 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la Bg7S de soja. Los efectos hipoglucemiantes de la semilla de altramuz y la presencia de una proteína relacionada con Bg7S en el altramuz hacen que sea razonable especular sobre la existencia de una familia de proteínas vegetales que comparten propiedades físicoquímicas con la insulina de los mamíferos.

60 Aunque ya se sabía desde hacía mucho tiempo que la insulina modula el metabolismo intracelular mediante la regulación de la actividad de varias vías de señalización intracelular, en los últimos años, se han producido grandes avances en la comprensión de los mecanismos mediante los cuales la insulina regula la transcripción génica. Se ha observado que la insulina regula, de manera tanto positiva como negativa, la expresión de cientos de genes que

codifican proteínas implicadas en una amplia variedad de actividades biológicas. En particular, mediante el estudio de los efectos de la hiperinsulinemia en la regulación de los genes de la cadena pesada de miosina (MHC) en el músculo esquelético humano (21), se demostró que la insulina ejerce una influencia rápida en el nivel transcripcional de la proteína MHC, lo que indica que la insulina puede contribuir a la regulación de la expresión de los genes de la MHC. En la presente invención, los autores encuentran que la insulina es capaz de aumentar más de seiscientas veces la expresión de los genes de la MHC con respecto al grupo de control. Además, la expresión del gen MHC es regulada positivamente por la conglutina γ con respecto a las células musculares diferenciadas no estimuladas. En general, los presentes resultados demuestran que los genes de la MHC expresados en los tejidos musculares son regulados transcripcionalmente tanto por la insulina como por la conglutina γ , mientras que la metformina no es capaz de producir el mismo efecto.

La expresión de genes específicos del músculo que controlan el progreso de la diferenciación de las células musculares está regulada por una serie de proteínas específicas del músculo. En particular, la miogenina, un factor de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice básico, desempeña un papel fundamental en la activación del gen MHC específico del músculo y es imprescindible para el desarrollo del músculo esquelético. La miogenina está ausente en las células no diferenciadas y se sobreexpresa en los mioblastos con un destino miogénico y en la diferenciación terminal muscular. En la presente solicitud, los autores proporcionaron evidencias de que tanto la conglutina γ como la insulina fueron capaces de mejorar la diferenciación de los mioblastos C2C12 murinos según lo demuestra el aumento en la acumulación de marcadores de diferenciación tales como la MHC y la miosina. Por otra parte, los datos actuales indican que la conglutina γ , como la insulina, permite el reclutamiento de los mioblastos, mejorando su fusión en los miotubos multinucleados y potenciando el aumento de su longitud y diámetro. Los datos actuales demuestran que la conglutina γ y la insulina influyen en la diferenciación de las células musculares y contribuyen a la regulación del crecimiento muscular. Entonces, la conglutina γ o los derivados funcionales de la misma se pueden usar como integradores dietéticos y aditivos alimentarios.

La insulina ayuda al organismo a usar la glucosa para obtener energía. El ensayo de tolerancia a la glucosa (Fig. 19) se usa para estudiar la capacidad de la conglutina γ para ayudar a la glucosa a entrar en las células en ratones. Durante el IPGTT (Fig. 20), hubo un aumento en los niveles de glucosa en plasma en los tres grupos de estudio inmediatamente después de la administración de la glucosa, aunque los ratones de "conglutina" resultaron tener niveles más altos de glucosa. La concentración de glucosa en sangre disminuyó rápidamente tras la insulina y más lentamente tras la administración de conglutina, pero, en ambas condiciones, al final del estudio (120 min), se volvió a la misma concentración basal (~120 mg/dl). Por lo tanto, la conglutina γ parece capaz de facilitar la entrada de la glucosa en el músculo de los ratones imitando el efecto de la insulina. Para evaluar si la conglutina γ usa el mismo receptor de la insulina para actuar en esta vía, se estudió el efecto de la proteína de semilla de altramuz sobre IR- β . Los histogramas de la Fig. 21 muestran una tendencia hacia el aumento del contenido de proteína IR- β en el músculo del ratón tratado con conglutina γ e insulina con respecto al grupo basal y de solución salina. Estos datos podrían indicar que la insulina y la conglutina γ realizan su acción a nivel celular mediante la activación de un receptor común.

El músculo esquelético representa un tejido que es sensible a Akt, cuya acción se ha relacionado con el desarrollo, la regeneración y la hipertrofia del músculo esquelético a través de varias vías que culminan en la estimulación de la síntesis de proteínas, la inhibición de la atrofia y la prevención de la muerte celular.

Se encontró, a través de la desactivación selectiva de genes, que Akt1 es necesaria para la iniciación y el mantenimiento de la diferenciación de los mioblastos, y que la pérdida de Akt1 inhibe la actividad del factor de transcripción miogénica MyoD, demostrando que Akt1 promueve y mantiene la diferenciación muscular.

Los autores evaluaron la expresión de AKT1 en el músculo murino, y la Fig. 22 (panel B) muestra que la conglutina γ , así como la insulina, fue capaz de aumentar la expresión de AKT1 con respecto al músculo sin tratar.

Cleasby *et al.* (22) han encontrado que la sobreexpresión de AKT produce una hipertrofia muscular significativa en seres humanos, que coincide con el aumento de la fosforilación de la p70S6 quinasa y la acumulación de glucógeno. En particular, la Akt-1 aumenta la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3).

Los autores realizaron un análisis Western de lisados de músculo gastrocnemio para determinar el estado de fosforilación de las moléculas de señalización claves corriente abajo de Akt. Los datos muestran que la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 y de la p70S6k fue aumentada tanto por la conglutina γ como por la insulina, como se muestra en la Fig. 23 y 24, respectivamente.

La Glut4 es una proteína que funciona como un transportador de la glucosa facilitador regulado por la insulina. En ausencia de insulina, esta proteína de membrana integral es secuestrada dentro de las células de tejido muscular y adiposo. A los pocos minutos de la estimulación con insulina, la proteína se desplaza a la superficie celular y comienza a transportar la glucosa a través de la membrana celular.

El ejercicio también induce un aumento en la isoforma GLUT4 de la glucosa: la proteína GLUT4 es reclutada del

interior de las células y se desplaza a la superficie celular, donde media el transporte de la glucosa en las células musculares. Se demostró la capacidad de una sesión de ejercicio para mejorar la captación de glucosa del músculo esquelético *in vivo* en seres humanos. Este aumento adaptativo en el transportador de GLUT4 hace posible un almacenamiento de glucógeno más rápido tras la reducción del glucógeno como consecuencia del ejercicio.

5 Además, el ejercicio ha demostrado producir la activación de p38 MAPK, que fosforila y activa a PGC-1 α en el citosol. La PGC-1 α activada se desplaza en el núcleo y coactiva los factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas mitocondriales, induciendo así el aumento en la biogénesis mitocondrial.

10 El estudio en el músculo murino confirma el efecto anteriormente mencionado de la insulina y demuestra, además, la capacidad de la conglutina γ para imitar estos efectos, facilitando el almacenamiento del glucógeno intracelular a través de la activación de GLUT4 y la fosforilación de p38 MAPK, como se muestra en la Fig. 25 y 26, respectivamente.

15 Estudios previos en el músculo esquelético de rata han establecido que el ejercicio físico, un factor de estrés fisiológico, y la insulina, un estimulante metabólico y factor de crecimiento, modulan la c-Jun quinasa NH₂-terminal (JNK) y las vías de señalización de las quinasas reguladoras extracelulares (ERK1 y ERK2).

20 En particular, trabajando con cardiomiocitos ventriculares de rata, Gillespie-Brown *et al.* (23) demostraron que la MEK1 constitutivamente activa estimula la expresión de genes característicos de la hipertrofia. Aunque todavía se desconoce el mecanismo de participación de la señalización de ERK en la hipertrofia del músculo esquelético, Shi *et al.*, (24) especulan que puede funcionar a través de la acreción proteica mediante la mediación de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico eIF4E.

25 En el presente estudio, los autores evaluaron la activación de ERK1/2 y de eIF4E y, como se muestra en la Fig. 27 y 28, tanto la insulina como la conglutina son capaces de aumentar la fosforilación de ERK y la activación de eIF4E.

Los datos sugieren que la conglutina γ aumentó la biogénesis mitocondrial y el aporte de glucosa en el músculo esquelético mejorando así el rendimiento de resistencia.

30

Referencias

1. Duranti M., *et al.*, *Eur J Biochem.* 1 de junio de 1994; 222(2): 387-93.
2. Duranti M., *et al.*, *J Agric Food Chem.* Abril de 2000; 48(4):1118-23.
- 35 3. Duranti M., *et al.*, *Eur J Biochem.* 1995; 230(3): 886-91.
4. Magni C. *et al.*, *J Nutr Biochem.* Noviembre de 2004; 15(11):646-50.
5. Saltiel A. R., Kahn C. R. *Nature* 414: 799-806, 2001.
6. Towbin H, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. septiembre de 1979; 76(9):4350-4.
7. Terruzzi I, *et al.*, *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 190:135-45.
- 40 8. Pellegatta F., *et al.*, *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47:643-9.
9. Terruzzi I., Pellegatta F., Luzi L. *Acta Diabetol.* 2005; 42:139-46.
10. Culjkovic B., *et al.*, *J Cell Biol.* 2006; 175: 415-26.
11. A. Ferranini y M. Pirolli, *Folia Medica* 23 (1937), pág. 729-748.
12. G. Orestano, *Arch Farmacol. Sperim.* 70 (1940), pág. 113-117).
- 45 13. Mounier C., Posner B, I. *Can J Physiol Pharmacol.* Julio de 2006;84(7):713-24.
14. Fecchi K., *et al.*, *FASEB J.* 2006, 20(6):705-7.
15. Duranti M., *et al.*, *Phytochemistry.* Marzo de 2001; 56(6):529-33.
16. Grundy S. M. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:399-404.
17. Santana L. F., *et al.*, *Gynecol Endocrinol.* Agosto de 2004; 19(2):88-96.
- 50 18. Luzi L, *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Febrero de 2003;284(2):E274-80.
19. Komatsu S., Hirano H. *FEBS Lett.* 9 de diciembre de 1991; 294(3):210-2.
20. Watanabe Y., *et al.*, *Eur J Biochem.* 15 de agosto de 1994; 224(1):167-72.
21. Houmard J. A., *et al.*, *J Appl Physiol.* Enero de 1999; 86(6):1828-32.
22. Cleasby M. E., *et al.*, *Mol Endocrinol.* Enero de 2007; 21(1):215-28.
- 55 23. Gillespie-Brown, *et al.*, *J Biol Chem.* 24 de noviembre de 1995; 270(47):28092-6.
24. Li X, *et al.*, *Chin Med J (Engl).* Mayo de 2002; 115(5):65 8-63.
25. Sirtori, C. R., *et al.*, *J Nutr.* Enero de 2004; 134(1):18-23.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.
- 10 2. Uso de un extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o una proteína conglutina γ en forma de un suplemento dietético para mejorar el rendimiento de resistencia.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o la proteína conglutina γ de acuerdo con la reivindicación 1, y aditivos y/o diluyentes apropiados para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el extracto enriquecido de proteína conglutina γ o la proteína conglutina γ está comprendido en una composición que comprende una cantidad eficaz de dicho extracto enriquecido de proteína conglutina γ o de dicha proteína conglutina γ , y aditivos y/o diluyentes apropiados en forma de un suplemento dietético.
- 25 5. Una composición de suplemento dietético que comprende una cantidad eficaz del extracto enriquecido de proteína conglutina γ de semillas de altramuz que tiene un % en peso de conglutina γ de entre el 10 y el 30 % o la proteína conglutina γ de acuerdo con la reivindicación 1, y aditivos y/o diluyentes apropiados para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular.

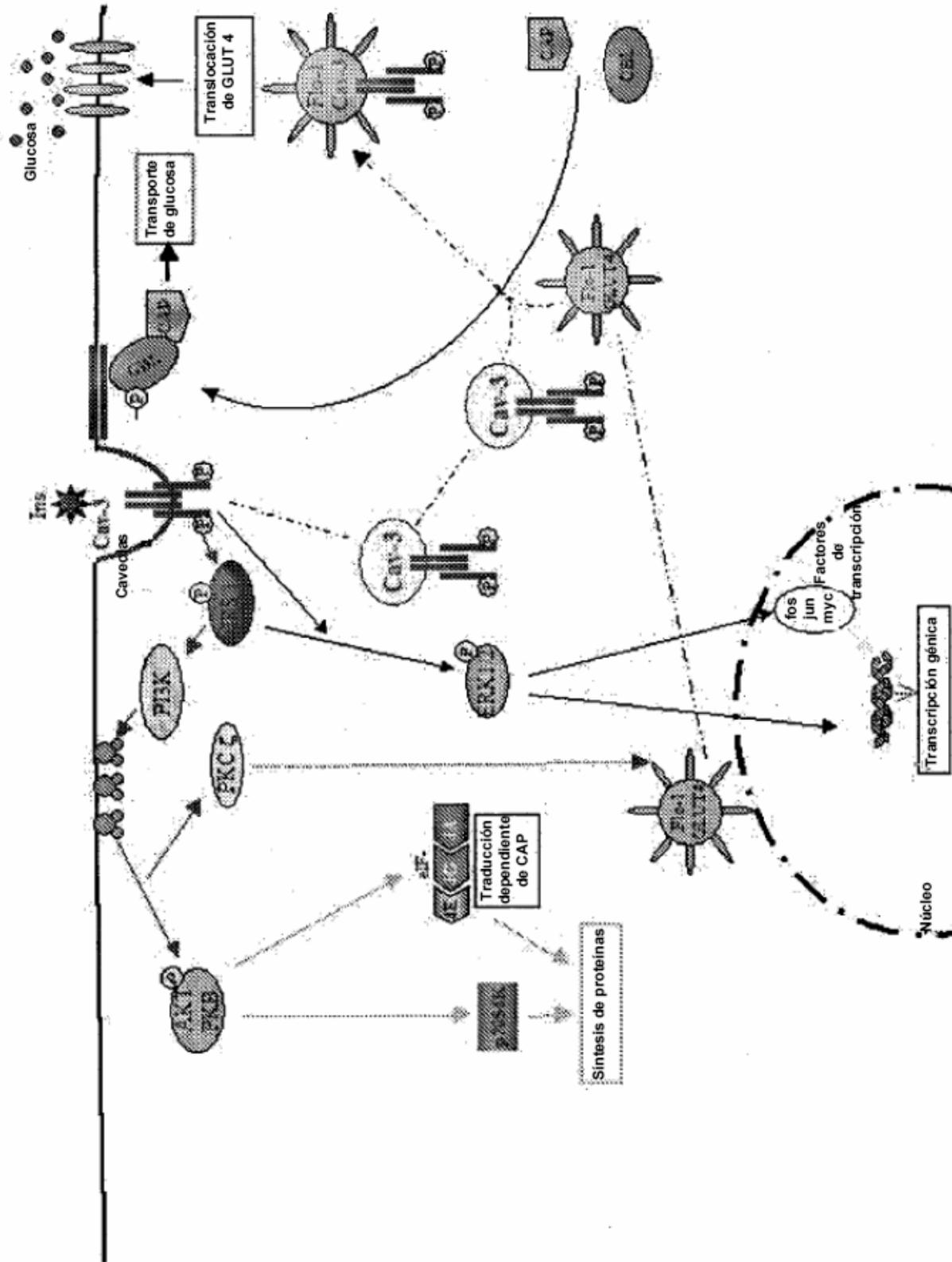


Fig. 1

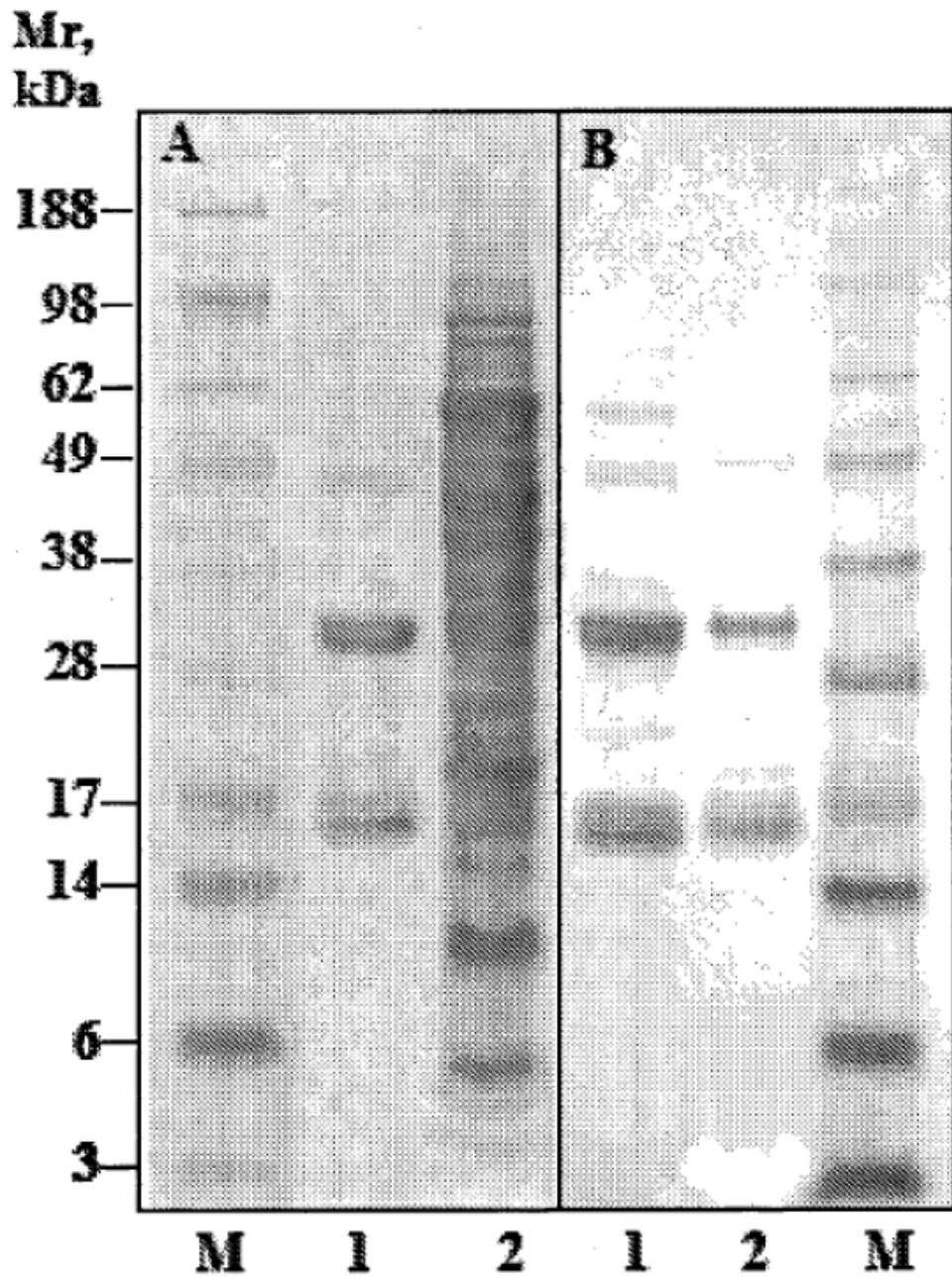


Fig. 2

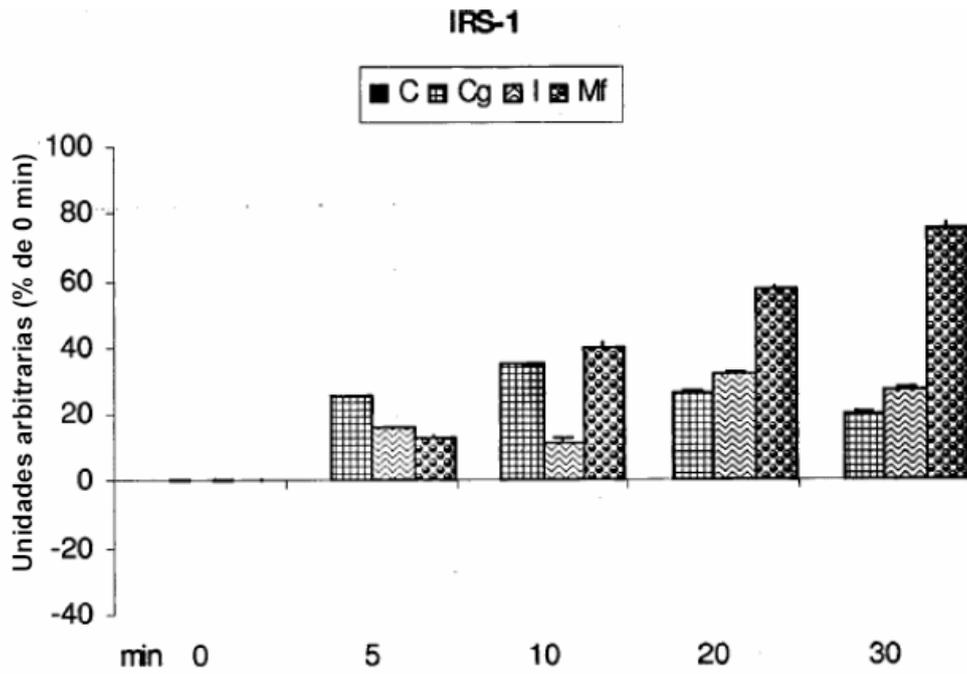


Fig. 3

p85 de PI3-K

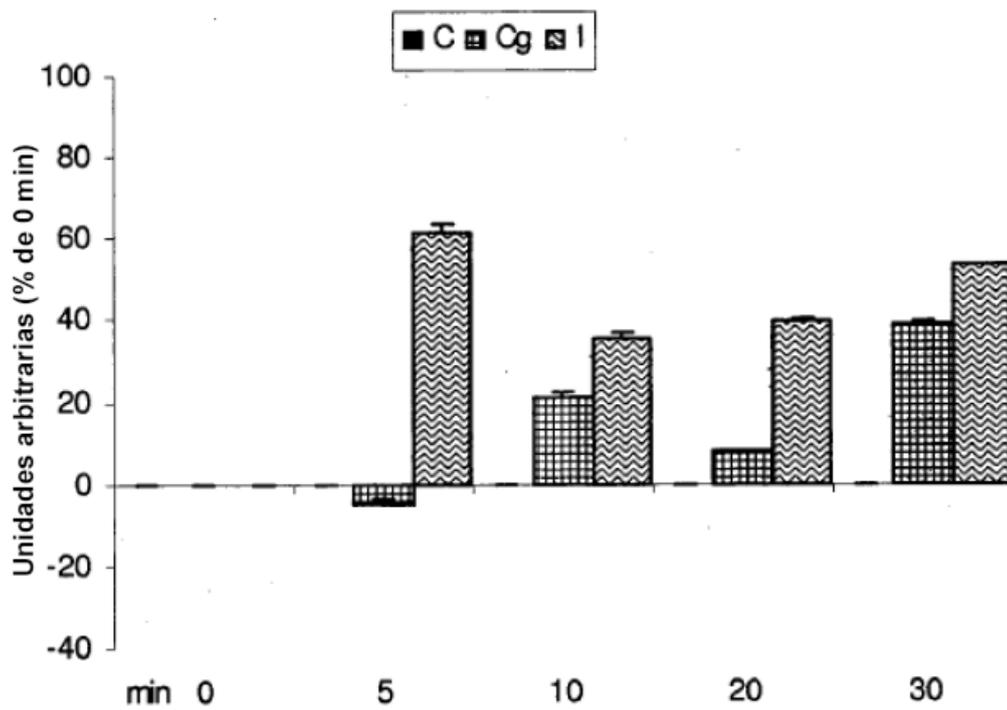


Fig. 4

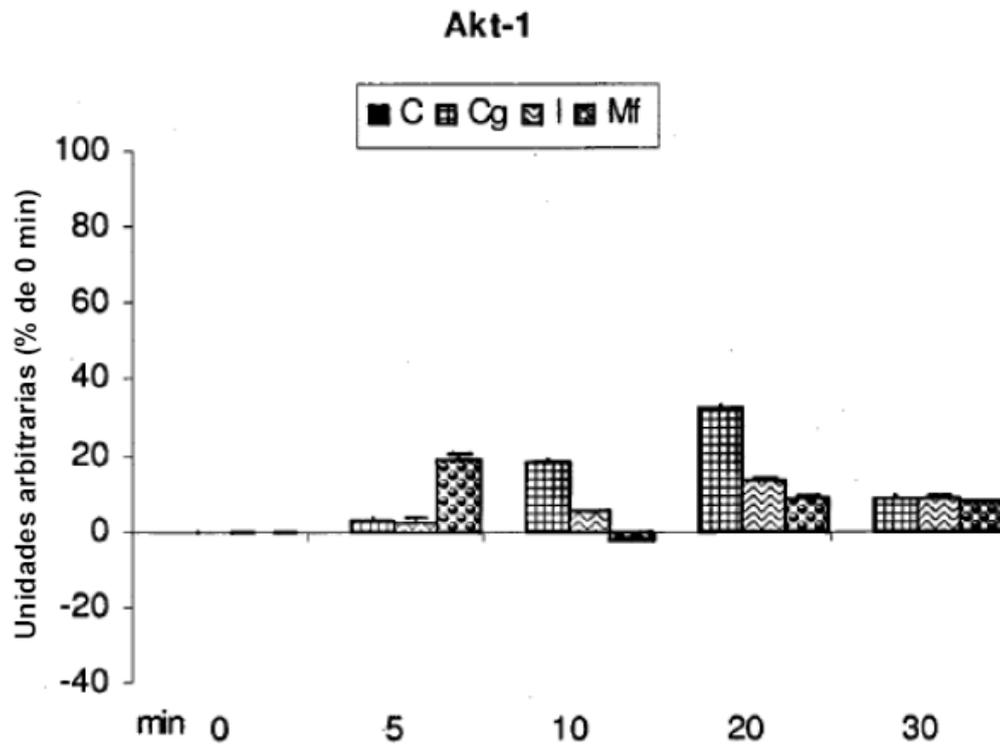


Fig. 5
p-p70S6k

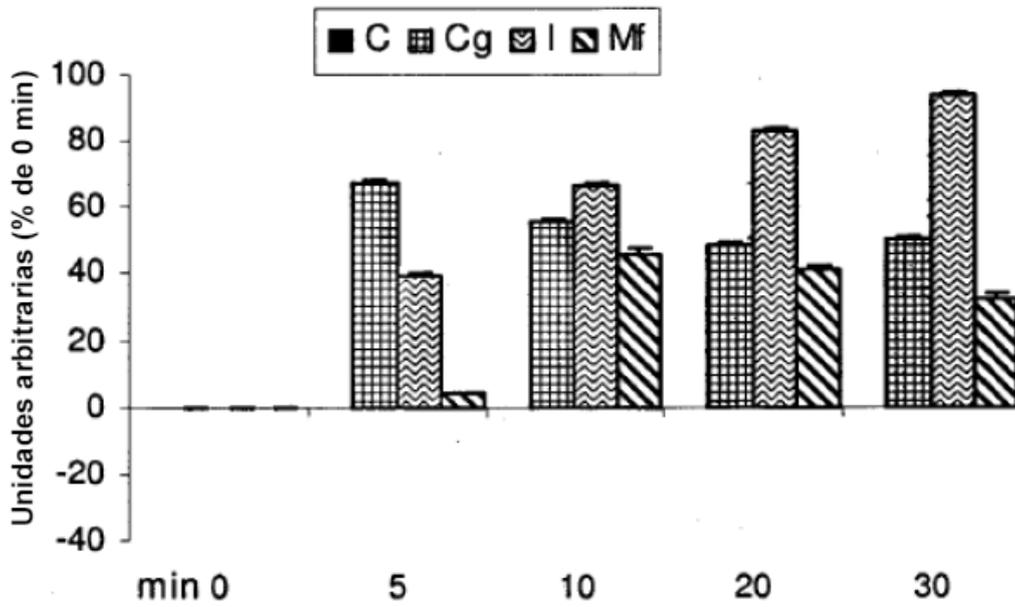


Fig. 6

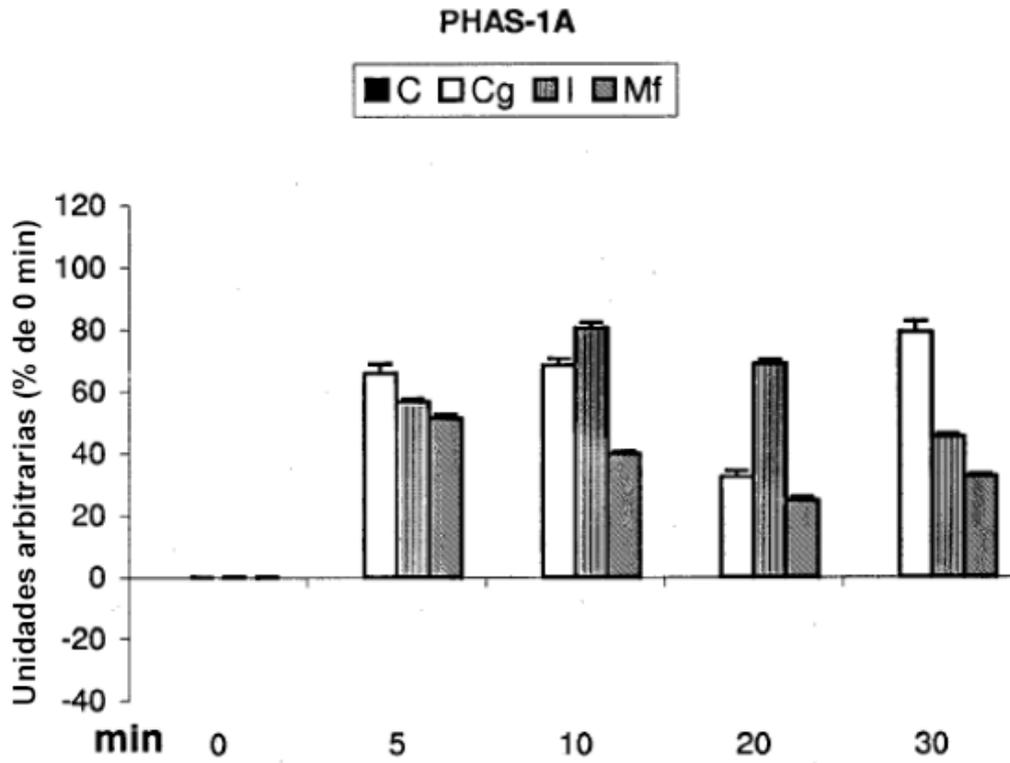


Fig. 7
PHAS-1B

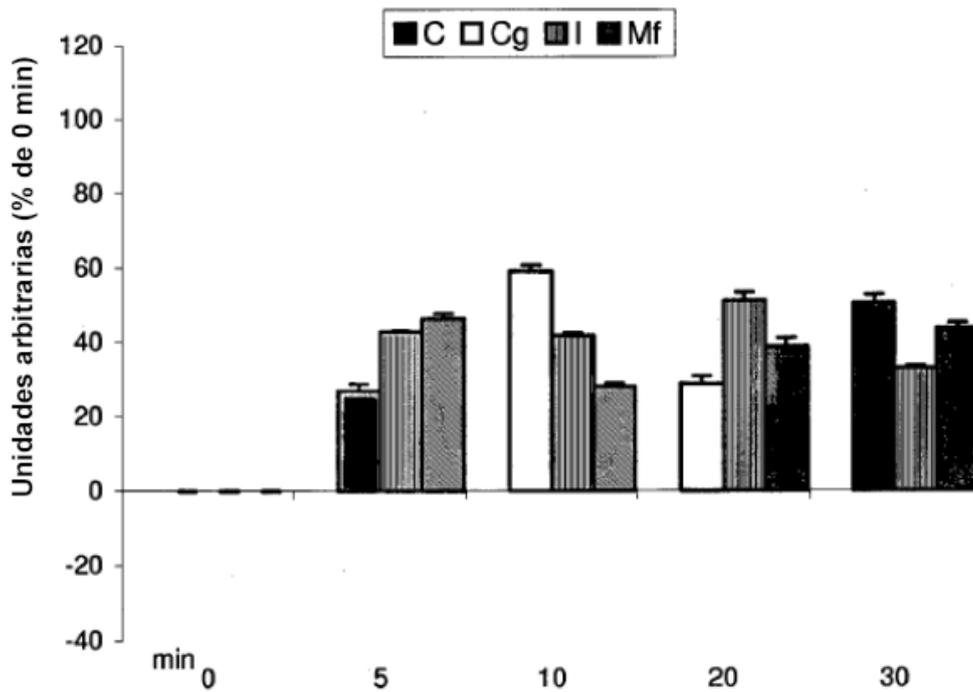


Fig. 8

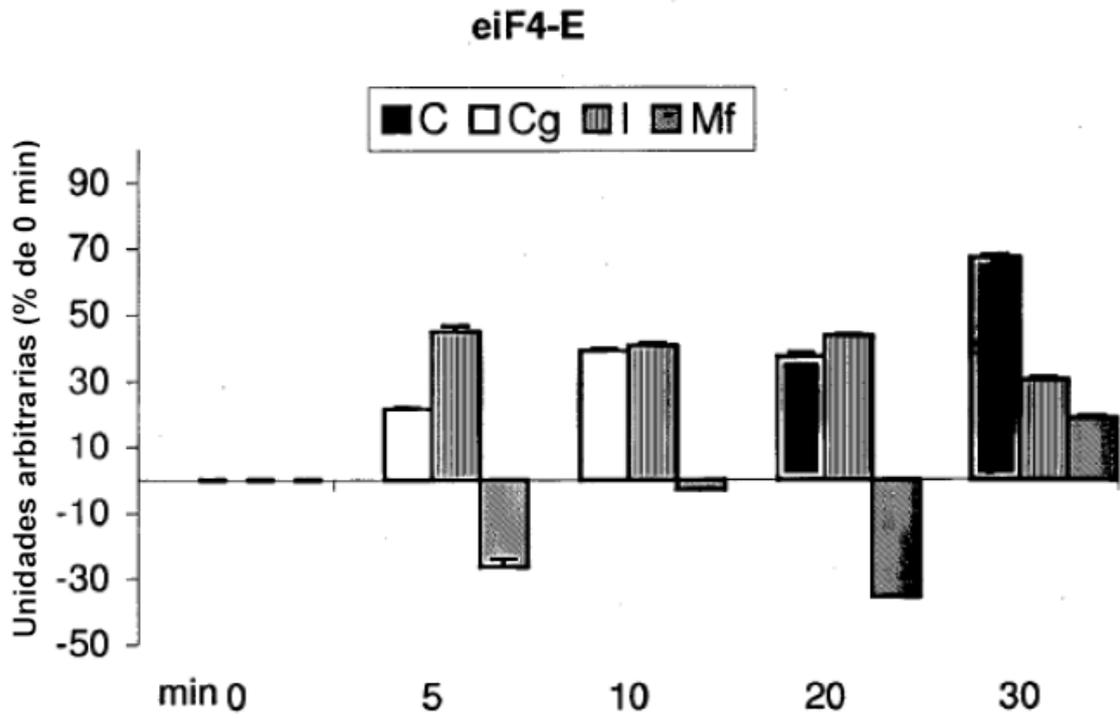


Fig. 9

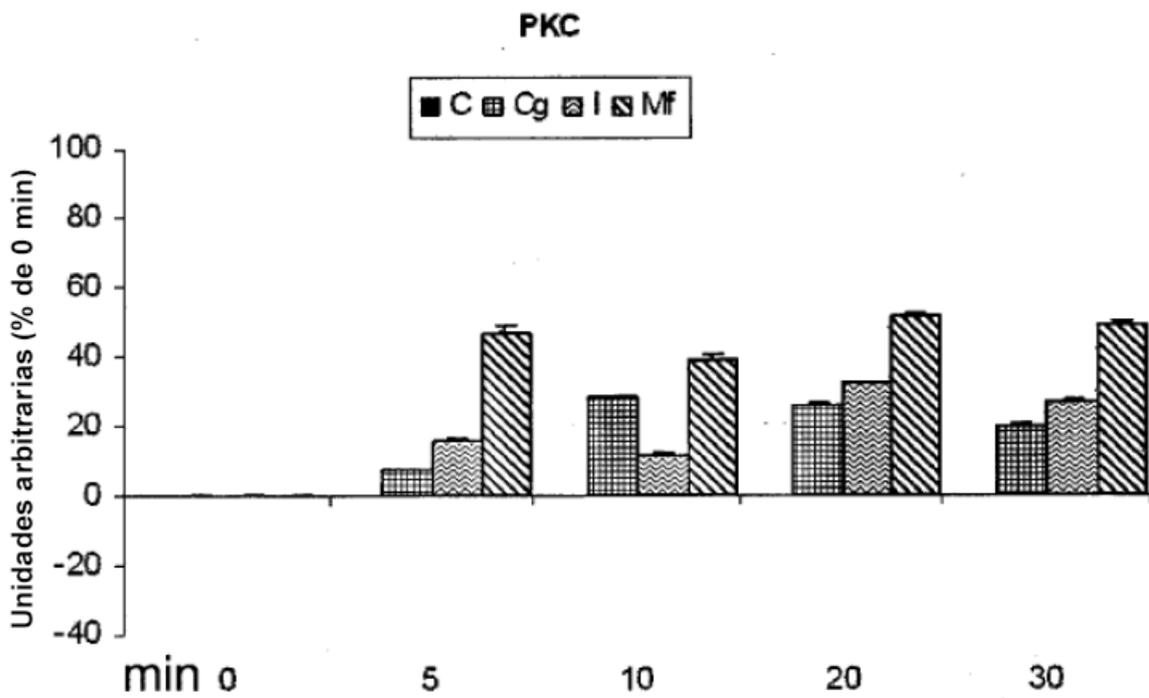


Fig. 10

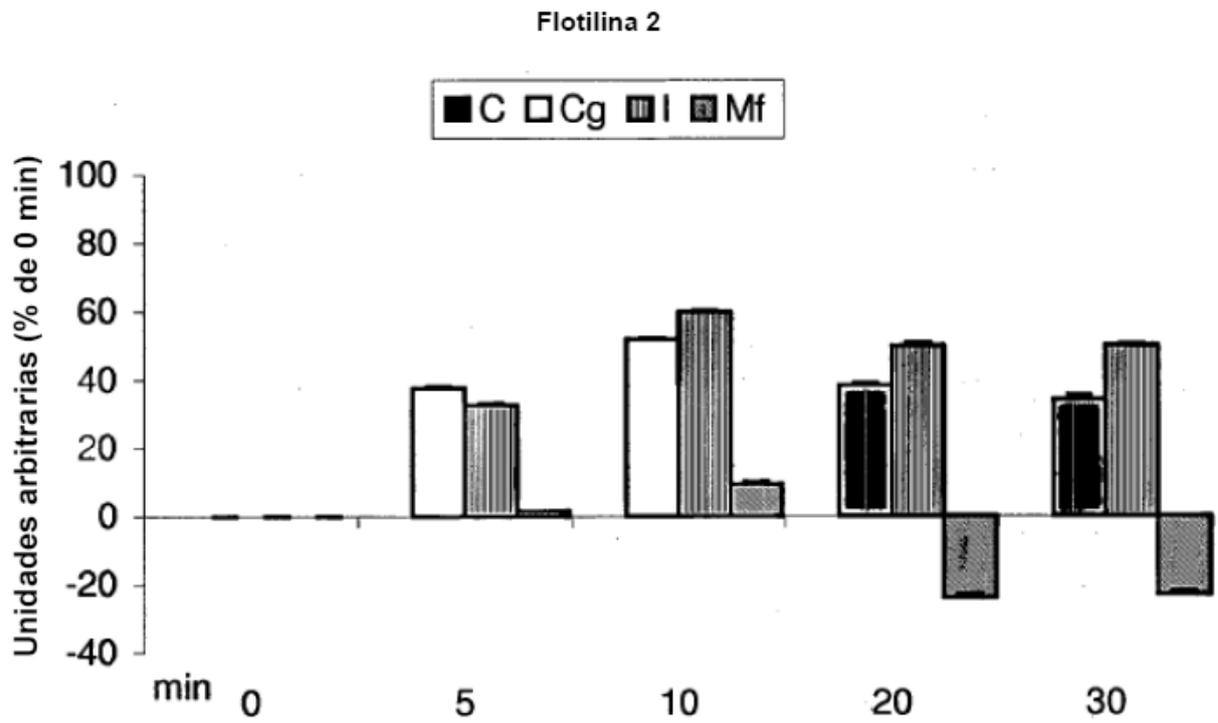


Fig. 11

Caveolina 3

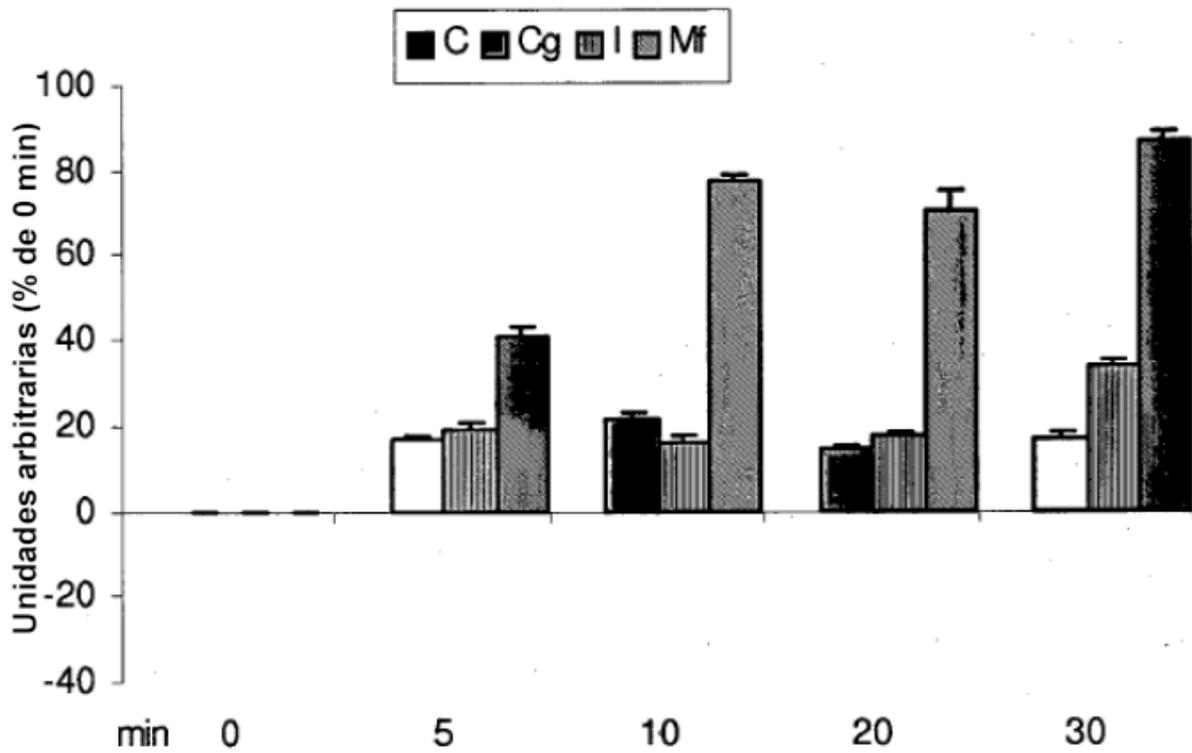


Fig. 12

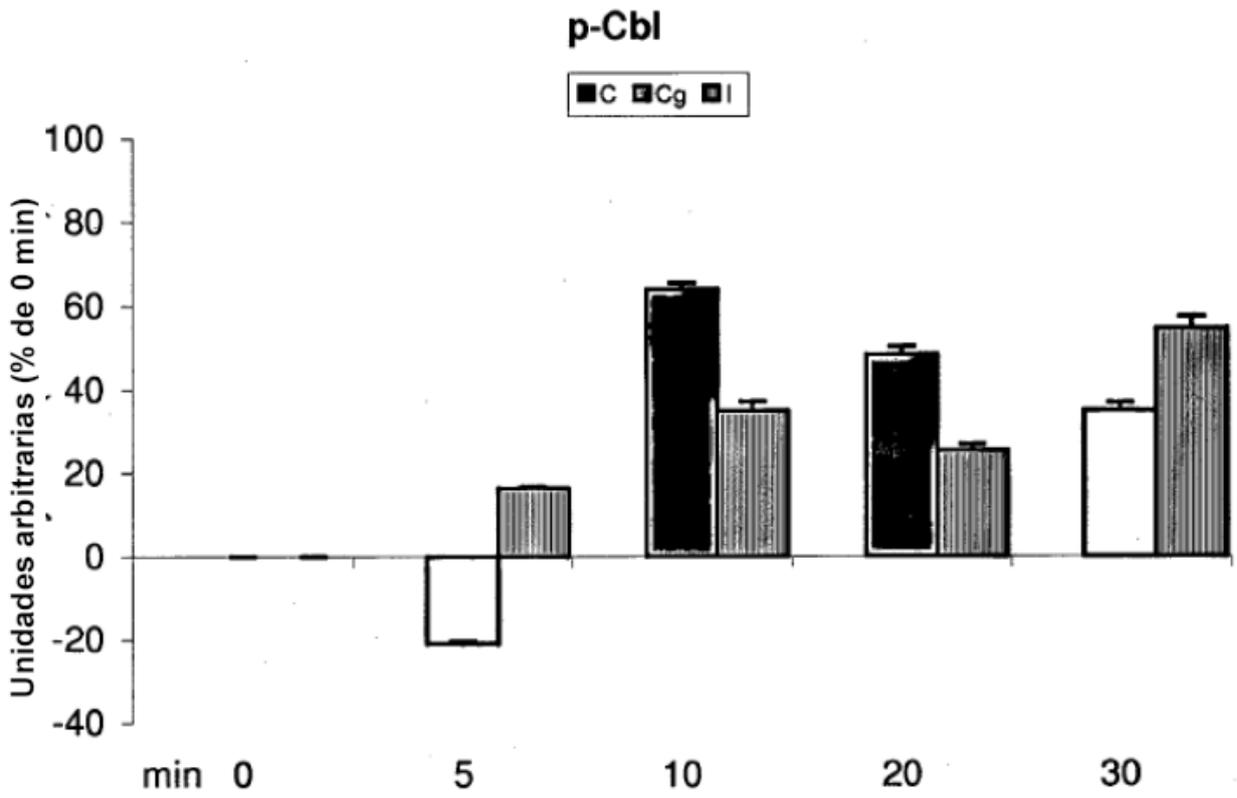


Fig. 13
p-ERK 1

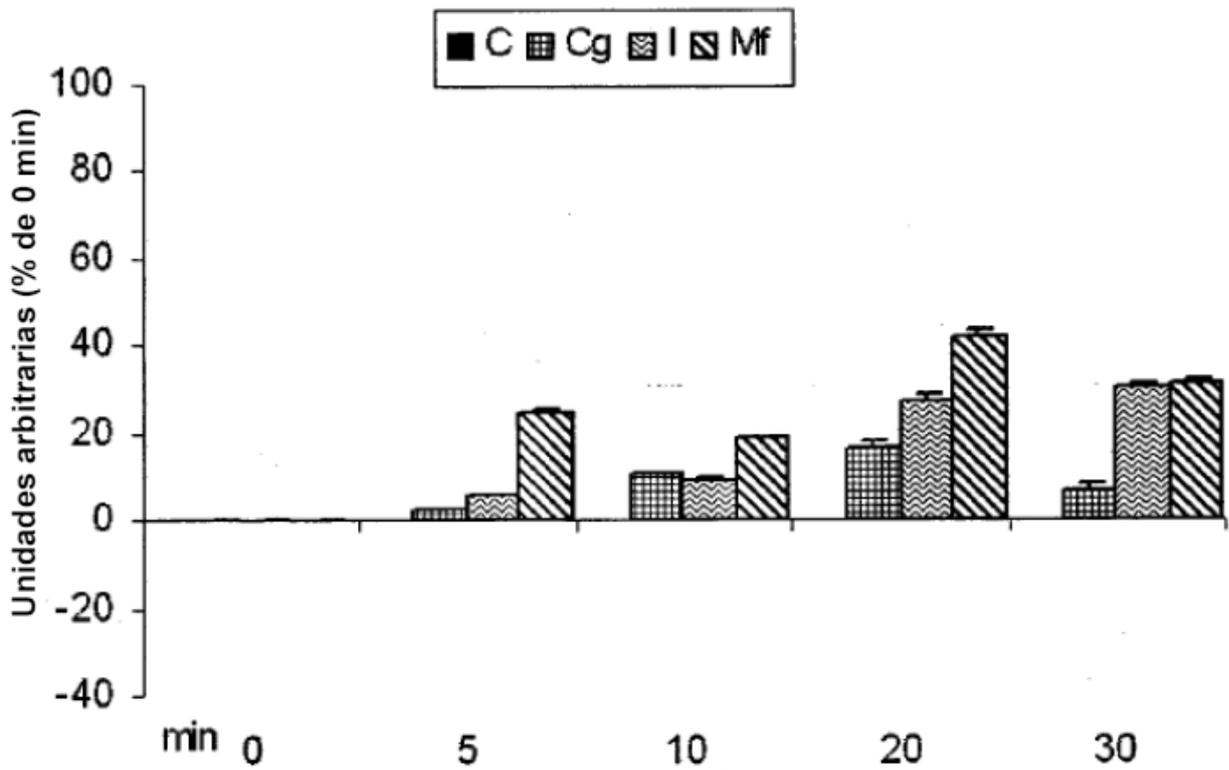


Fig. 14

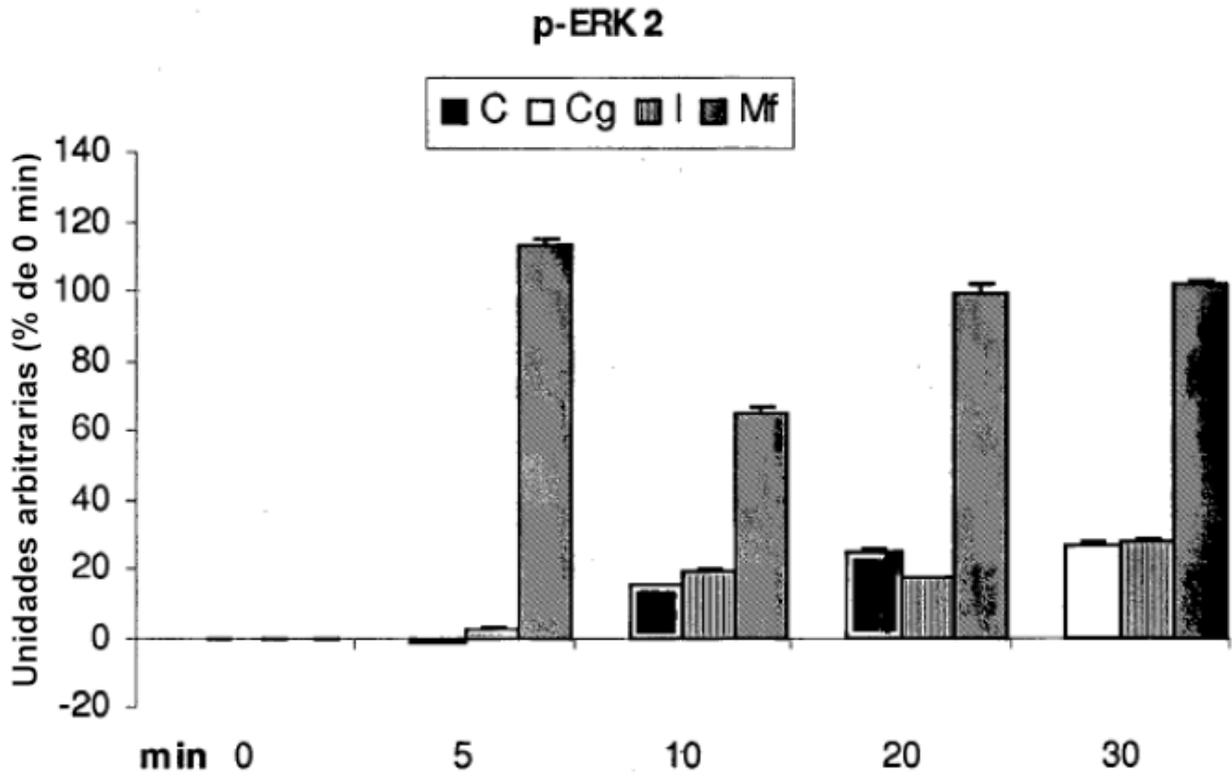


Fig. 15
MHC

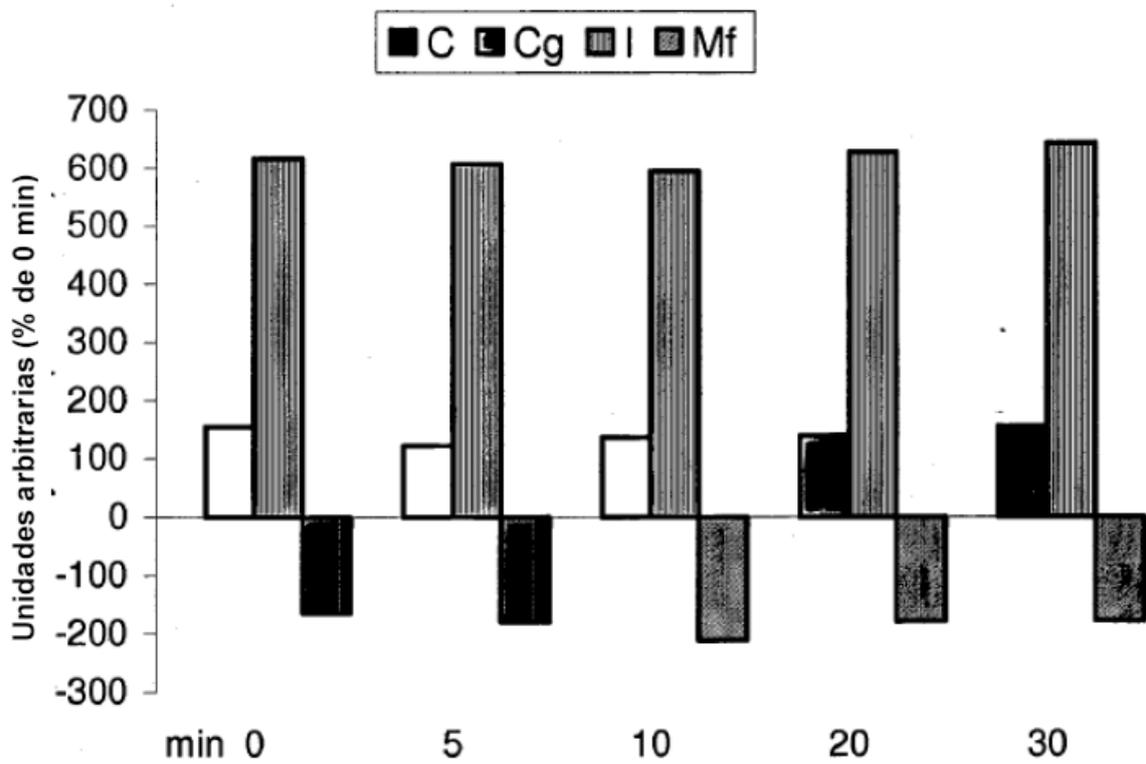


Fig. 16

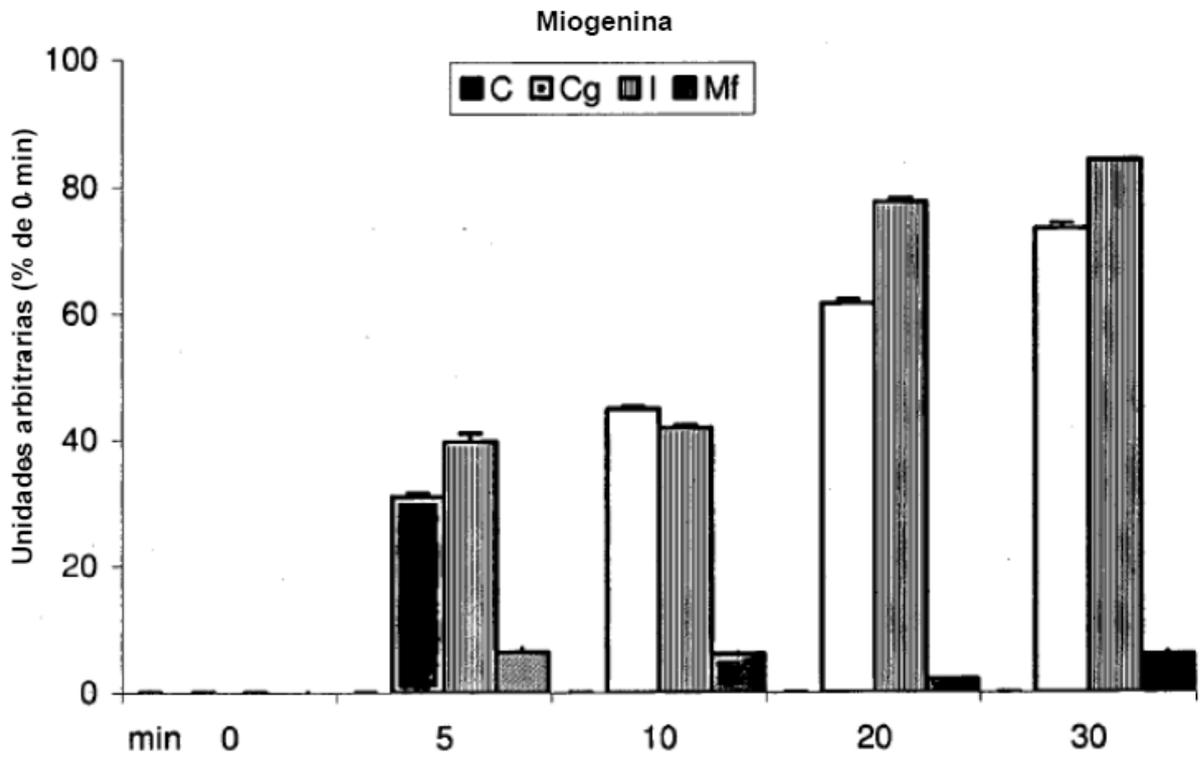


Fig. 17

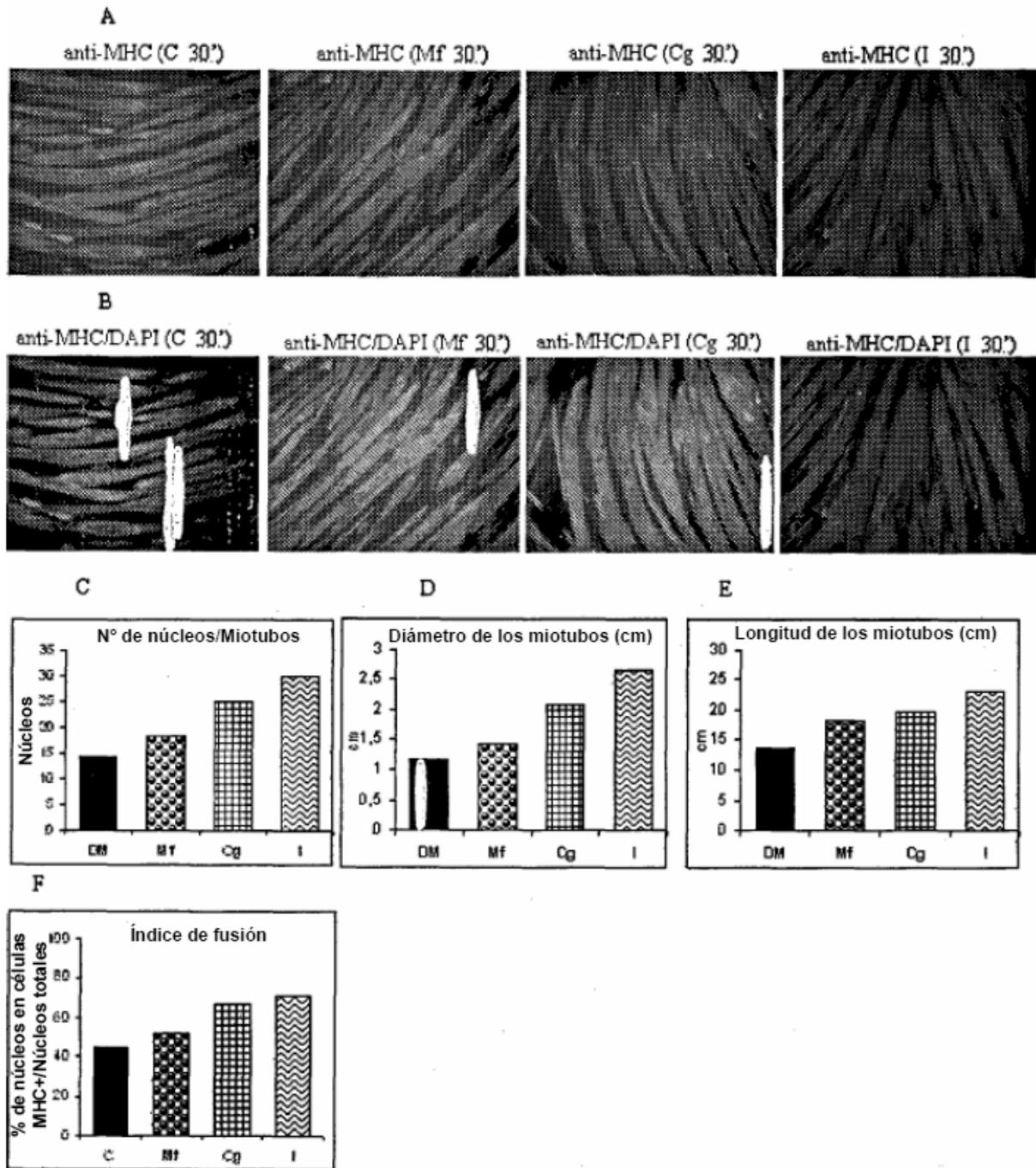


Fig. 18

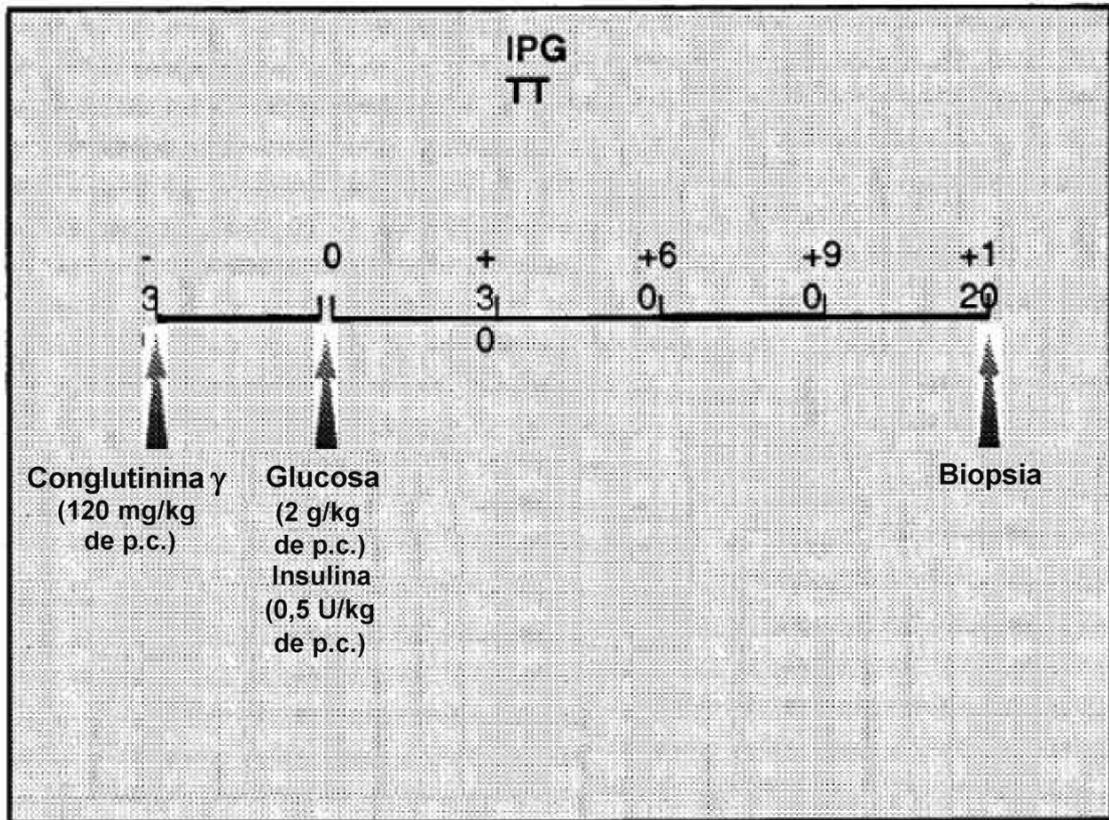


Fig. 19

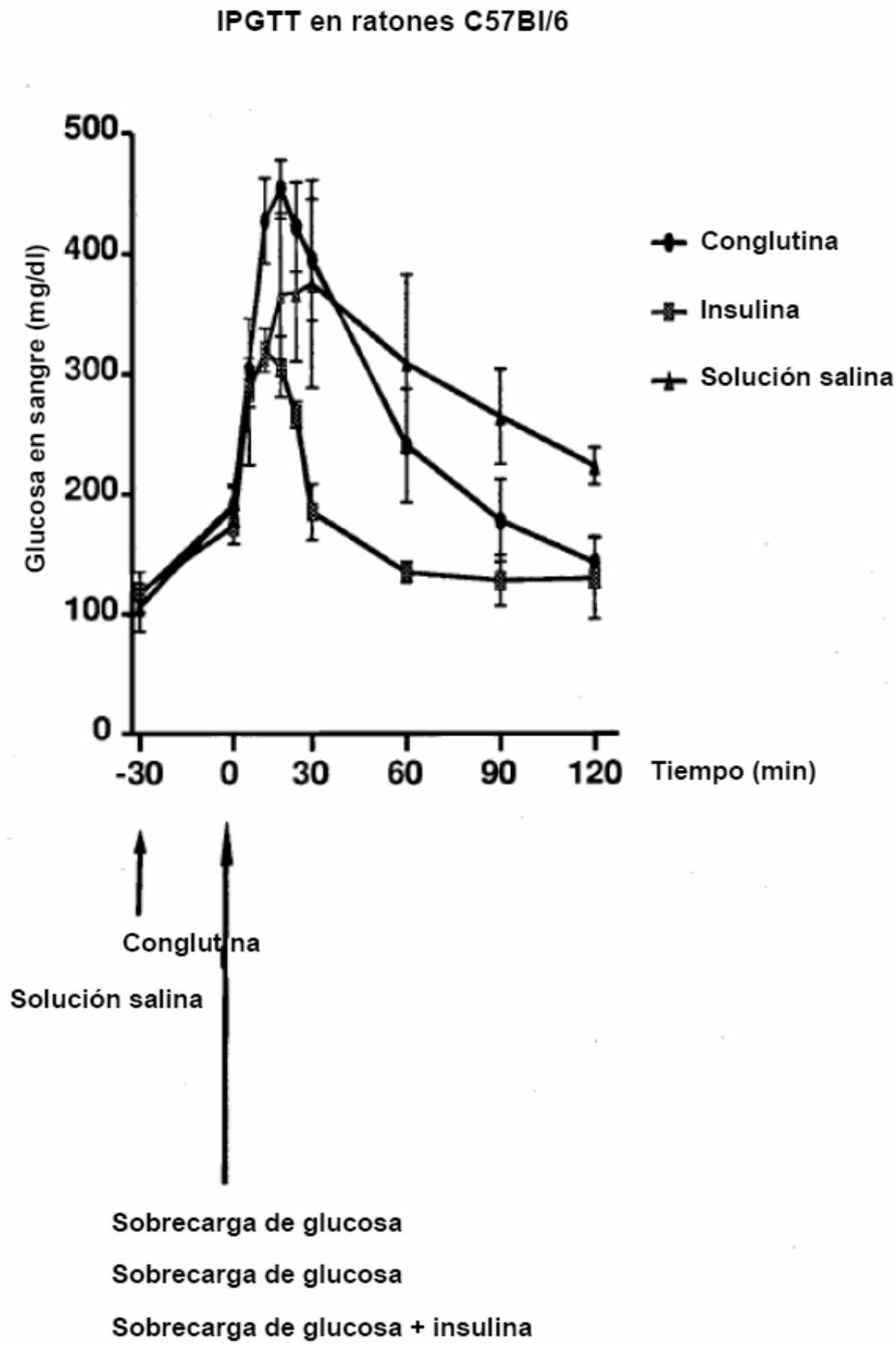


Fig. 20

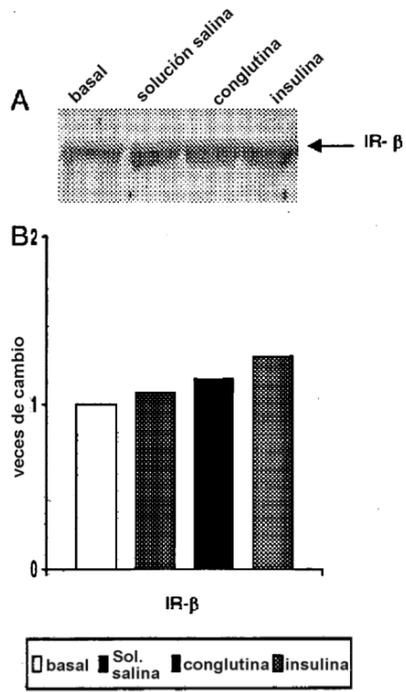


Fig. 21

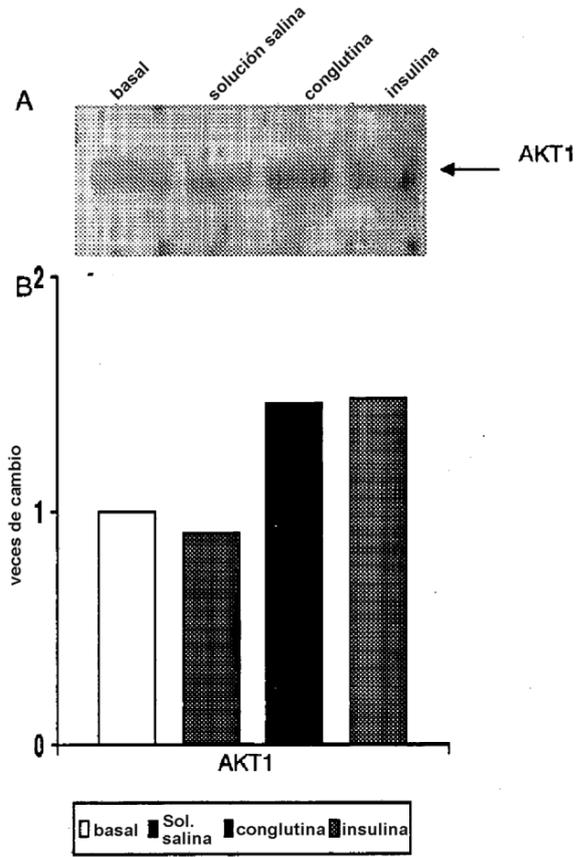


Fig. 22

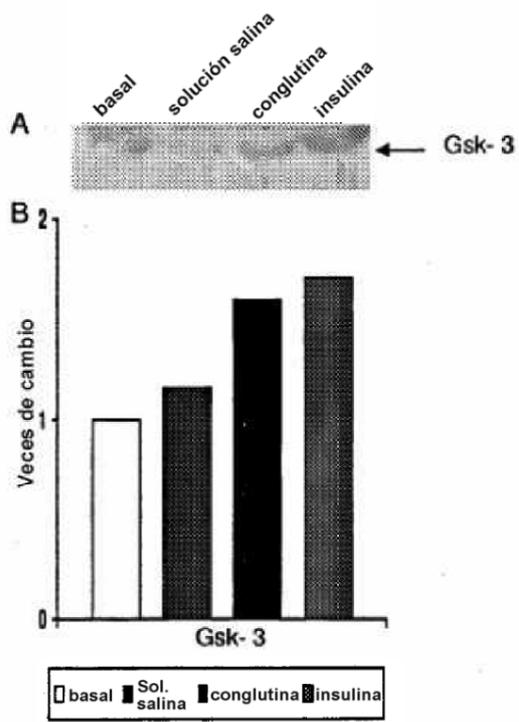


Fig. 23

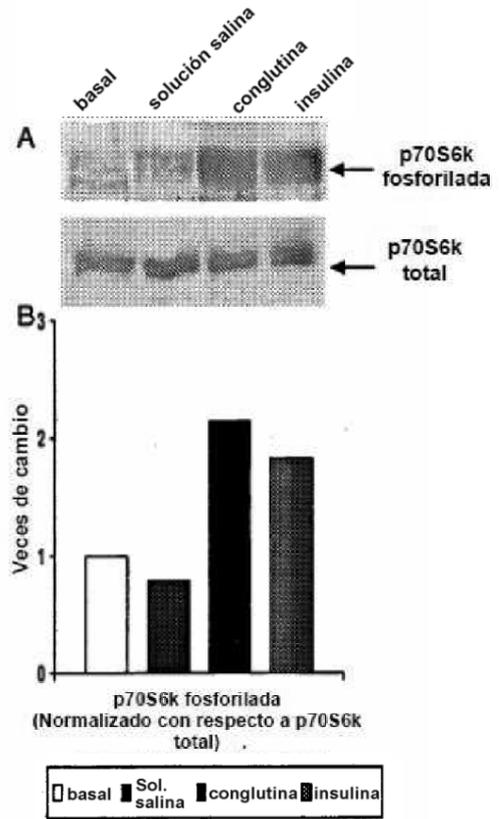


Fig. 24

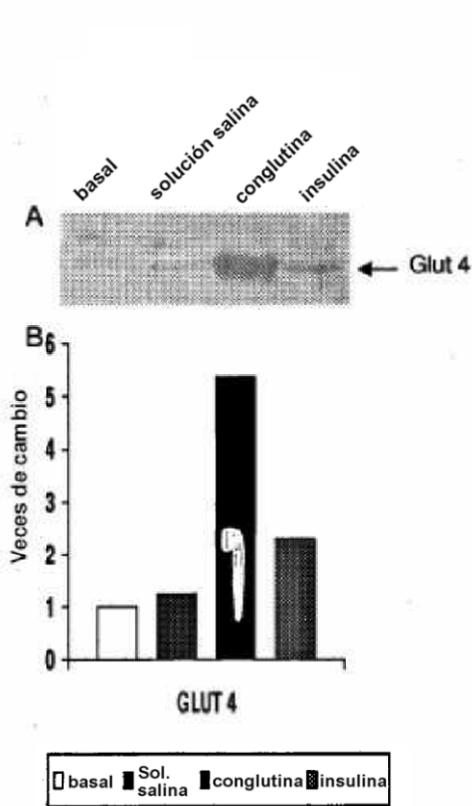


Fig. 25

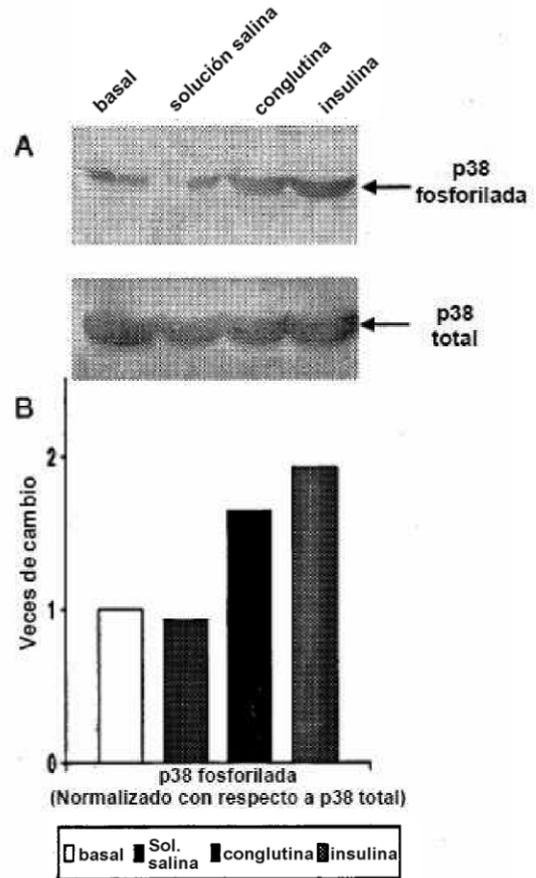


Fig. 26

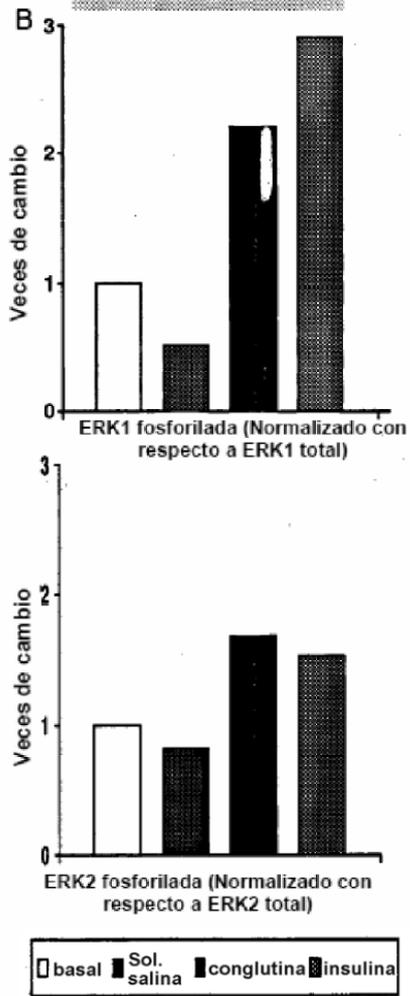
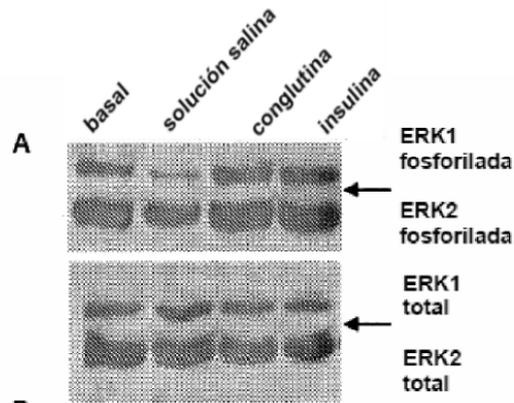


Fig. 27

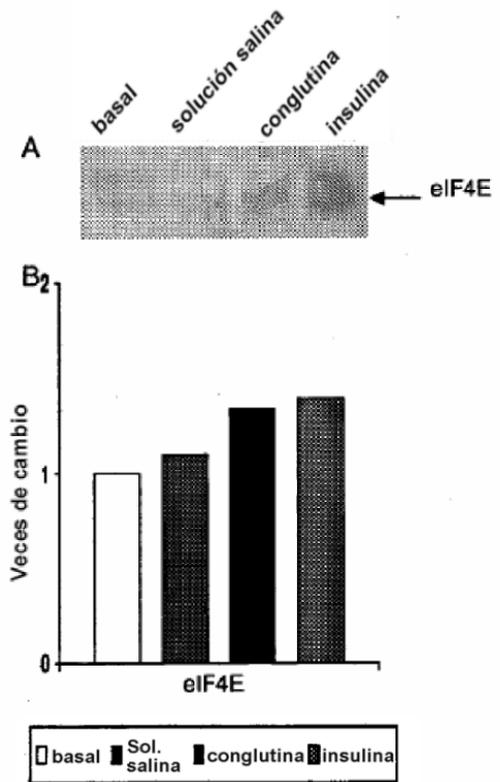


Fig. 28