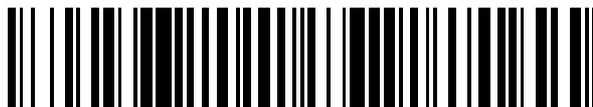


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 368**

21 Número de solicitud: 201330998

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.02.2015**

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
RED FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y  
NUTRICIÓN (CIBEROBN) (50.0%)**  
Hospital Clínico Universitario Santiago de  
Compostela, Edificio D 1ª planta, C/ Choupana  
s/n  
15706 Santiago de Compostela (A Coruña) ES;  
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (12.0%);  
UNIVERSITAT DE BARCELONA (12.0%) y  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE  
GIRONA (26.0%)

72 Inventor/es:

**MORENO NAVARRETE, Jose Maria;**  
**FERNÁNDEZ-REAL, José Manuel;**  
**FRÜHBECK MARTÍNEZ, Gema y**  
**VILLAROYA GOMBAU, Francesc**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MOLÉCULAS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE TRASTORNOS  
METABÓLICOS ASOCIADOS A OBESIDAD Y RESISTENCIA A INSULINA**

57 Resumen:

Moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina.

La invención propone el uso de inhibidores de la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), tales como anticuerpos específicos frente a dicha proteína o ARN de silenciamiento, para el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina, preferiblemente de la disfunción del tejido adiposo asociada a dichas condiciones patológicas.

ES 2 529 368 A1

**MOLÉCULAS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE**  
**TRASTORNOS METABÓLICOS ASOCIADOS A OBESIDAD Y RESISTENCIA A**  
**INSULINA**

**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se encuadra en el campo clínico de los trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina, específicamente dentro de las moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de dichos trastornos; así como dentro de los métodos de diagnóstico de la disfunción del tejido adiposo asociada a los mismos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

La disfunción del tejido adiposo inducida por obesidad está caracterizada por hipertrofia e hiperplasia de las células residentes y un enriquecimiento de células inflamatorias que se infiltran en él (Wormser D., *et al.*, 2011, *Lancet*, 377:1085-1095; Ouchi N., *et al.*, 2011, *Nat. Rev. Immunol.*, 11:85-97). En este contexto proinflamatorio, la funcionalidad del tejido adiposo depende de la resistencia o adaptación de los adipocitos a este ambiente celular hostil.

15

Recientes investigaciones han demostrado la relación entre endotoxemia metabólica y resistencia a la insulina (Cani PD., *et al.*, 2007, *Diabetes*, 56:1761-1772; Cani PD., *et al.*, 2008, *Diabetes*, 57:1470-1481; Lassenius MI, *et al.*, 2011, *Diabetes Care*, 34: 1809-1815; Osto M., *et al.*, 2011, *Endocrinology*, 152:804-815). Las acciones proinflamatorias del lipopolisacárido bacteriano (LPS) son conocidas por inhibir la vía de señalización de la insulina e inhibir la adipogénesis (Chung S., *et al.*, 2006, *Endocrinology*, 147:5340-5351; Creely SJ., *et al.*, 2007, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292: E740-E747). Varios mediadores de la respuesta a LPS (como TLR4 y CD14) están aumentados en el tejido adiposo en asociación con trastornos metabólicos e inflamación sistémica. La anulación del gen de TLR4 y de CD14 ha sido descrita para mejorar la funcionalidad del tejido adiposo en paralelo al incremento de la acción insulínica (Schäffler A., Schölmerich J., 2010, *Trends Immunol.*, 31:228-235; Fernández-Real JM., *et al.*, 2011, *Diabetes*, 60:2179-2186).

25

30

Por otro lado, la proteína de unión a lipopolisacárido (“Lipopolysaccharide Binding Protein”, LBP) es una proteína de fase aguda (65-kDa), presente en sangre a altas concentraciones (aproximadamente 2–20 µg/mL), producida principalmente en el hígado. LBP contribuye, a través del reconocimiento del lípido A derivado de LPS, a  
5 acelerar la interacción LPS-CD14, intensificando la sensibilidad de las células hacia LPS (Tobias PS., Soldau K., Ulevitch RJ., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264:10867-10871; Hailman E., *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.*, 179:269-277).

Desde un punto de vista clínico, existe la necesidad de desarrollar nuevas terapias que  
10 contribuyan a restaurar o mejorar la disfunción adipocitaria asociada a la obesidad y a la resistencia a insulina. En este sentido, la identificación de dianas moleculares cuya regulación de la expresión permita restablecer la funcionalidad del tejido adiposo, sería de utilidad no solo como alternativa para el tratamiento de los trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina, sino también desde el punto de vista del  
15 diagnóstico clínico de individuos afectados con una disfunción del tejido adiposo.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se demuestra que los niveles de expresión de la proteína de  
20 unión a lipopolisacárido (LBP), normalmente presente en el tejido adiposo, se encuentran incrementados en dicho tejido en asociación con el deterioro metabólico progresivo del tejido adiposo provocado por la obesidad y la resistencia a insulina, tanto en humanos como en modelos animales. Por ejemplo, los niveles de mRNA de LBP se encuentran aumentados en el tejido adiposo de ratones obesos y resistentes a la  
25 insulina. Por tanto, la invención propone la cuantificación del producto de expresión del gen *LBP* en el tejido adiposo de un individuo como marcador biológico primerizo o temprano de disfunción de dicho tejido.

Los estudios *in vitro* descritos más adelante han permitido concluir que LBP es una  
30 nueva adipocina que ejerce un papel importante en la disfunción del tejido adiposo asociado a obesidad y resistencia a insulina. La inducción de LBP en el contexto de la sobrenutrición y el balance energético positivo podría contribuir a las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, llevando a la disfunción adipocitaria. Por tanto, la presente invención propone, además, a LBP como una diana terapéutica contra los  
35 trastornos metabólicos asociados a obesidad y/o resistencia a insulina. En este sentido,

el silenciamiento de LBP mejora la diferenciación adipocitaria, incrementando los marcadores adipogénicos y disminuyendo los inflamatorios. Concretamente, en los ejemplos se muestra que la inhibición de la actividad de LBP mediante, por ejemplo, el anticuerpo específico anti-LBP Ab biG 33 o vectores lentivirales shRNA, mejora el estado adipogénico de los adipocitos maduros o plenamente diferenciados.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de LBP para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina. O alternativamente, a un inhibidor de LBP para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina. Preferiblemente, dicha inhibición se produce en el tejido adiposo.

La “proteína de unión a lipopolisacárido o LBP” es una proteína que en humanos está codificada por el gen *LBP*. LBP es una proteína de fase aguda soluble, de 65-kDa, que se une al lipopolisacárido bacteriano (LPS) para provocar respuestas inmunitarias mediante la presentación de los LPS a receptores de reconocimiento de la superficie celular. La LBP está implicada en la respuesta inmunológica de fase aguda a las infecciones bacterianas Gram-negativas. Las bacterias Gram-negativas contienen un glicolípido, lipopolisacárido, en su pared celular externa. La LBP se une a LPS e interactúa con el receptor CD14, probablemente juega un papel en la regulación de las respuestas de monocitos LPS-dependientes. Esta proteína es parte de una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas con la transferencia de lípidos, incluyendo la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI), proteína de transferencia de éster de colesterol en plasma (CETP), y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP). En humanos el gen *LBP* se encuentra en el cromosoma 20, en la zona próxima al gen de la BPI. Esta proteína de unión a lipopolisacáridos se ha demostrado que interacciona con CD14, TLR2, TLR4 y el co-receptor MD-2. En una realización preferida, la LBP a la que hace referencia la presente invención es de humano y consiste en la proteína de número de referencia en el GenBank AAC39547.1.

El término “inhibidor de LBP” se refiere a una molécula que se une al gen *LBP*, a sus factores de transcripción o a cualquiera de sus productos de expresión, por ejemplo, aunque sin limitarnos, a la proteína LBP, e inhibe o disminuye la expresión y/o actividad del factor al que se une y/o su señalización intracelular. En una realización preferida,

dicho inhibidor se selecciona de la lista que consiste en antagonistas (preferiblemente químicos), ARN de silenciamiento o anticuerpo específico frente a la proteína LBP, en la presente invención este anticuerpo puede denominarse anticuerpo neutralizante del efecto de LBP. Más preferiblemente, el inhibidor se selecciona de entre ARN de silenciamiento o anticuerpo específico frente a LBP. Ejemplos de estos inhibidores de LBP son el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG33 o vectores lentivirales shRNA. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de LBP es un anticuerpo específico frente a LBP. En una realización más preferida, el anticuerpo es el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG33. En otra realización preferida, el ARN de silenciamiento es un shRNA.

El término “anticuerpo”, tal como se emplea en la invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos o porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con LBP. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina o recombinantemente. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente o mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de LBP y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante para el anticuerpo o para la LBP, o que produce el anticuerpo o la LBP como resultado de la recombinación homóloga.

Los anticuerpos también pueden ser “quiméricos”, inmunoglobulinas en las que una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de un especie determinada o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s)

cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

5

Usando tecnología de ADN recombinante, es posible construir un anticuerpo monoclonal uniendo la región variable o de reconocimiento antigénico a un armazón de un anticuerpo humano. En la mayoría de casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de las regiones hipervariables del receptor se han sustituido por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de sostén (FR) de la región Fv de inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más la función del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o prácticamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, por lo menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), en general de una inmunoglobulina humana. Distintos procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados son conocidos en el estado de la técnica.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable, del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub> y Fv; homodímeros bivalentes (en inglés "diabodies"); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos proceden de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir de manera directa mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de librerías de fagos de anticuerpos. De

35

manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. El F(ab')<sub>2</sub> se puede formar utilizando la cremallera de leucinas GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')<sub>2</sub>. De acuerdo con otra aproximación, se pueden aislar directamente los  
 5 fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los practicantes expertos. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv).

10 El "Fv de cadena sencilla" (scFv) o los "fragmentos de anticuerpos" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende, además, un engarce polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

15

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a anticuerpos que comprenden un par de segmentos tándem Fd (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

20 El anticuerpo anti-LBP humana Ab biG 33 al que se hace referencia en la presente invención es el anticuerpo monoclonal anti-LBP humana comercial Ab biG 33 (Abcam).

El término "ARN de silenciamiento o siRNA" se refiere al tipo de ARN interferente que presenta una longitud de, preferiblemente, 20 a 25 nucleótidos, y que es altamente  
 25 específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo. Interviene en el mecanismo denominado interferencia de ARN (RNA interference, RNAi), donde el siRNA interfiere con la expresión de un gen específico, reduciéndola. Los siRNAs son moléculas de ARN de doble hebra perfectamente complementarias, que se originan a partir de un ARN largo  
 30 de doble hebra (dsRNA, double strand RNA). Los dsRNAs pueden ser de origen endógeno (por ejemplo los transcritos generados a partir de secuencias de ADN repetidas en tándem), o de origen exógeno (como virus o transgenes). La enzima responsable del procesamiento del dsRNA en moléculas de siRNAs es Dicer, una enzima citoplásmica de la familia ARNasa III, que procesa el dsRNA en fragmentos de  
 35 ARN doble hebra con extremos 5' fosfato y 2 nucleótidos libres con extremo hidroxilo (-OH) en 3'. Los siRNAs suprimen la expresión de los genes diana mediante el corte del

ARN mensajero (ARNm) complementario en dos mitades, a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA con el complejo RISC (RNA-induced silencing complex). Las dos mitades del ARNm son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen. Por tanto, el mecanismo de RNAi  
 5 mediado por siRNAs suprime la expresión génica a nivel post-transcripcional, de manera específica a la secuencia. Los resultados de este tipo de supresión pueden ser una reducción significativa (knock-down) o completa (knock-out) de los niveles de la proteína diana. En el caso de células somáticas de mamíferos se pueden introducir bien directamente siRNAs sintéticos o bien un plásmido (o un vector viral), preferiblemente  
 10 un vector lentiviral, que contenga una horquilla que exprese el siRNA. En este segundo caso se habla de expresión de "shRNAs" (siglas en inglés de "short hairpin RNA"), que son procesados por la enzima Dicer para generar siRNAs funcionales.

La "resistencia a la insulina o RI" es un estado caracterizado por una disminución de la  
 15 acción de la insulina, lo que implica una respuesta biológica por debajo de lo normal a las acciones de la hormona en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Los trastornos metabólicos más importantes asociados a RI son la diabetes mellitus, preferiblemente la no insulino dependiente, dislipidemia o disfunción del tejido adiposo e hipertensión arterial, entre otras condiciones patológicas. En la RI se  
 20 encuentran elevados los niveles basales de insulina, al igual que la respuesta a cargas de glucosa, tolbutamida, arginina, leucina y glucagón. La administración de glucosa provoca niveles exagerados de péptido C, y la administración de insulina revela una caída por debajo de lo normal de los niveles de glicemia.

25 Por otro lado, los trastornos metabólicos más importantes asociados a la obesidad incluyen la disfunción del tejido adiposo, la hiperinsulinemia y la resistencia insulínica. En sujetos obesos existe un fallo en la captación de glucosa por los tejidos periféricos en respuesta a la insulina. La mayoría de los investigadores concluyen que la RI de los sujetos obesos se debe a un defecto post-receptor de la acción insulínica. Aunque la  
 30 hiperinsulinemia y la RI se encuentran también en sujetos sin obesidad que presentan factores de riesgo cardiovascular, tales como intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial y dislipidemia, constituyendo el denominado síndrome X.

El término "medicamento" en la presente invención se refiere a un medicamento de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o  
 35 combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el

tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario”  
5 es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

10

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

15

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

20

El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inhibidor de la proteína de unión a lipopolisacárido seleccionado de entre un ARN de silenciamiento o un anticuerpo específico frente a dicha proteína. En una realización preferida, el anticuerpo es el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG 33. En otra realización preferida, el ARN de silenciamiento es un shRNA. La composición farmacéutica de la invención puede comprender además excipientes.

30

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición farmacéutica de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición farmacéutica de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención comprende un inhibidor de la LBP en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de inhibidor de la LBP que produzca el efecto deseado tratando y/o previniendo trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina, sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición farmacéutica de la invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición farmacéutica de la

presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanoesferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en  
5 micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microsferas biodegradables.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, incluyendo intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural,  
10 intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardíaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular; tópica; mediante parches transdérmicos; vía vaginal o vía rectal, mediante la administración de un supositorio; percutánea; espray nasal; implante quirúrgico; pintura quirúrgica interna; bomba de infusión o vía catéter.

15

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de expresión de la LBP, normalmente presente en el tejido adiposo, se encuentran incrementados en asociación con el deterioro metabólico progresivo del tejido adiposo provocado por la obesidad y la resistencia a insulina. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de  
20 diagnóstico *in vitro* de disfunción del tejido adiposo en un individuo, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a. Cuantificar la cantidad de producto de expresión del gen *LBP* en una muestra biológica aislada de tejido adiposo de un individuo,
- 25 b. Comparar la cantidad cuantificada en el paso (a) con una cantidad de referencia, y
- c. Asignar al individuo al grupo de pacientes con disfunción del tejido adiposo cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es significativamente superior a la cantidad de referencia.

30

El término “producto de la expresión” hace referencia a cualquier producto de transcripción o expresión (ARN o proteína) de este gen *LBP*, o a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión. Los productos de expresión de este gen son, preferiblemente, el ARNm codificante para  
35 LBP o la proteína LBP.

El término “muestra biológica aislada de tejido adiposo” se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo obtenidos del tejido adiposo mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra puede ser tomada de un humano, pero también de mamíferos no humanos, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o cánidos. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el individuo del cual procede la muestra biológica aislada del paso (a) del método de la invención es un mamífero. En una realización más preferida, el mamífero es un humano. La muestra biológica aislada de tejido adiposo a la que se refiere la presente invención debe contener adipocitos, preferiblemente maduros. Asimismo, dicha muestra puede proceder de tejido adiposo visceral o subcutáneo. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada procede de tejido adiposo subcutáneo.

La cuantificación de la cantidad de producto de la expresión del gen *LBP* en la muestra obtenida, se refiere a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. Esta medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión del gen basada en una señal que se obtiene directamente del producto de la expresión del gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión del gen presente en la muestra. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

De acuerdo con la presente invención, la cuantificación de la cantidad de producto de la expresión del gen puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido por los expertos en la materia. En una realización preferida, la cuantificación de la cantidad de producto de la expresión del gen se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total de la muestra biológica aislada lo cual

puede llevarse a cabo por métodos conocidos por un experto en la materia. El análisis del nivel de ARNm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RTLPCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En una realización más preferida, la cuantificación de la cantidad de producto de expresión del gen *LBP* en la muestra biológica se realiza determinando el nivel de la proteína codificada por dicho gen, LBP, mediante la incubación con un anticuerpo específico, preferiblemente con el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG33, en ensayos como *Western blot*, geles de electroforesis, inmunoprecipitación, *arrays* de proteína, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante la incubación con un ligando específico; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen; o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas. Así, en una realización preferida del método de la invención, la cuantificación de la cantidad de producto de expresión del gen *LBP* comprende el uso de un anticuerpo específico frente a dicha proteína, más preferiblemente del anticuerpo anti-LBP humana Ab biG33.

La cuantificación de la proteína LBP puede llevarse a cabo por medio de cualquiera de las técnicas mencionadas o por cualquier combinación de las mismas. La cuantificación puede llevarse a cabo por medio del reconocimiento específico de cualquier fragmento de la proteína por medio de cualquier sonda y/o cualquier anticuerpo. La proteína LBP, o cualquiera de sus fragmentos, puede ser cuantificada, sirviendo estos datos como referencia para compararlos con los datos obtenidos en la muestra control y buscar

alguna desviación significativa. Esta desviación significativa puede ser asignada al diagnóstico de una disfunción del tejido adiposo en el individuo del que procede la muestra problema. En una realización preferida, la proteína LBP, o cualquiera de sus fragmentos, puede ser cuantificada por medio de electroforesis y/o inmunoensayo.

5

La "electroforesis" es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (*buffer* de electroforesis), mediante una matriz o un apoyo sólido como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipamiento usado, soportes y condiciones para llevar a cabo la separación de las proteínas. La electroforesis se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional.

15

Un "inmunoensayo" es una prueba bioquímica que mide la concentración de una sustancia en un líquido biológico usando la reacción de un anticuerpo o anticuerpos con alguno de sus antígenos. El ensayo aprovecha la especificidad de un anticuerpo con su antígeno. La cantidad de anticuerpo o antígeno puede detectarse por medio de métodos conocidos en el estado de la técnica. Uno de los métodos más comunes es el que se basa en el marcaje del antígeno o de los anticuerpos. El marcaje puede llevarse a cabo, pero sin limitarse, con una enzima, radioisótopos (radioinmunoensayo), etiquetas magnéticas (inmunoensayo magnético) o fluorescencia, y también otras técnicas incluidas aglutinación, nefelometría, turbidimetría o *Western Blot*. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. El inmunoensayo puede ser competitivo: la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra, o puede ser no competitivo (conocido también como "sandwich assay"): los resultados son directamente proporcionales a la concentración del antígeno.

Una técnica de inmunoensayo que puede ser utilizada en la presente invención es el ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

20

25

30

Por medio de las técnicas cromatográficas, las moléculas pueden ser separadas, pero sin limitarse, por su carga, tamaño, masa molecular, mediante su polaridad o mediante su potencial redox. La técnica de cromatografía se selecciona, pero sin limitarse, de

35

entre cromatografía de líquidos (cromatografía de partición, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión o cromatografía de intercambio iónico), cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos.

5 La tecnología de microarray puede estar basada, por ejemplo, en la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconoce la proteína LBP. El microarray basado en anticuerpos es el microarray de proteínas más común. En este caso, los anticuerpos se fijan en el soporte sólido. Estos anticuerpos son utilizados para capturar moléculas que permiten la detección de la LBP procedente de la muestra biológica. El término "soporte  
10 sólido" tal como se emplea en la presente invención se refiere a una gran variedad de materiales, por ejemplo, pero sin limitarse, intercambio de iones o resina de adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres de celulosa, esferas paramagnéticas o la combinación de algunos de ellos.

15 El término "cantidad" se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de expresión del gen, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con el mismo o que pueda derivarse de éste. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión del gen especificado obtenido  
20 mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos más arriba en el presente documento.

25 El término "comparación" se refiere, pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de expresión del gen *LBP* en la muestra biológica a analizar con una cantidad de referencia deseable. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

30 El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en el paso (b), se refiere a cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación de la cantidad del producto de expresión del gen *LBP* en una muestra biológica aislada, o en una colección de muestras biológicas, de tejido adiposo de uno o varios individuos sanos que son representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la  
35 invención. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, la cantidad

de referencia consiste en la cantidad de producto de expresión del gen *LBP* cuantificada en una muestra biológica aislada de tejido adiposo, más preferiblemente subcutáneo, de un individuo sano. La cantidad de referencia se ha de medir de la misma forma, y ser obtenida del mismo tipo de muestra biológica aislada, que la de interés en el individuo  
5 objeto de estudio. Esta cantidad de referencia se puede determinar mediante muestras de RNA total o mRNA, o bien de mezclas proteicas o lisados, procedentes de tejido adiposo o adipocitos de un individuo sano.

Se entiende por “sano”, “individuo sano” o “sujeto sano” en la presente invención aquel  
10 sujeto o individuo que no padece disfunción del tejido adiposo. Se entiende por “población sana” en la presente invención, un conjunto de individuos que no presentan disfunción del tejido adiposo. Se entiende por “individuos sanos representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención” aquellas personas que no padecen disfunción del tejido adiposo en el momento de la extracción de la muestra y  
15 que, como grupo, tienen un patrón similar en cuanto a raza, edad, distribución por género que la población de pacientes a los que se va a aplicar el método.

Se entiende por “diagnóstico” el procedimiento mediante el cual se identifica la presencia o ausencia de una enfermedad o condición patológica, preferiblemente,  
20 disfunción del tejido adiposo.

Una cantidad “significativamente” superior a una cantidad de referencia puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de  
25 confianza, determinación del valor  $p$ , análisis de variancia, test de Student o funciones discriminantes de Fisher.

El método de la presente invención puede incluir adicionalmente un paso en el cual si se determina que el paciente presenta disfunción del tejido adiposo, se determine el tratamiento para el paciente. Ya que la disfunción del tejido adiposo se suele asociar a  
30 obesidad y RI, este tratamiento puede ser por ejemplo, aunque sin limitarse, administración de insulina, reducción del peso corporal, realización de ejercicio físico, administración de metformina, de agonistas de PPAR $\gamma$  como glitazonas (TZD), por ejemplo troglitazona o rosiglitazona, de Acipimox, o de estrógenos.

La “disfunción del tejido adiposo” se caracteriza por una disminución en la expresión de genes adipogénicos, tales como *ADIPOQ*, *GLUT4*, *PPAR $\gamma$* , *FABP4*, *FASN*, *ITLN1* o *ACC1*, de genes asociados a la formación de la vacuola, tales como perilipin1 (*PLIN1*), y por un aumento en la expresión de genes proinflamatorios y relacionados con la actividad de macrófagos, tales como *IL6*, *HIF1 $\alpha$* , *MCP1*, *TNF*, *visfatin* o *CD14*, en tejido adiposo. La disfunción de este tejido está acompañada, por tanto, de hipertrofia e hiperplasia de las células residentes y un enriquecimiento de células inflamatorias que se infiltran en él, que limita la capacidad del tejido para almacenar lípidos e intensifica su respuesta inflamatoria. Como se ha explicado anteriormente, esta disfunción adipocitaria suele estar asociada a obesidad y RI por ello, en otra realización preferida del método de la invención, la disfunción del tejido adiposo está asociada a obesidad y/o resistencia a insulina.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos, preferiblemente el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG 33, específicos para los productos de expresión del gen *LBP*. Los cebadores, sondas y/o anticuerpos comprendidos en este kit de la invención presentan complementariedad, y por tanto, capacidad de hibridación, con al menos un producto de la expresión del gen *LBP*. En general, el kit de la invención comprende todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención descrito anteriormente. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, enzimas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas, anticuerpos o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

El término “sonda”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN o ARN monocatenario con una secuencia de bases específica, preferiblemente marcada, que se utiliza para detectar secuencias de bases complementarias al producto de la expresión de un gen por hibridación parcial o total. Las sondas pueden ser, por ejemplo, pero sin limitarnos, un oligonucleótido, un fragmento amplificado por PCR o un fragmento de ADN purificado. La expresión “sonda del producto de expresión del gen” se refiere a una sonda que permite detectar la

expresión de dicho gen, es decir, se refiere a una sonda complementaria al ARNm o al ADNc de dicho gen.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido de ADN o ARN complementario a la secuencia de un ácido nucleico molde determinado, que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos en el proceso de copia de la cadena complementaria a la secuencia de dicho ácido nucleico molde, por ejemplo, pero sin limitarnos en una PCR. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de ADN. La expresión “cebador del producto de expresión del gen” se refiere a un cebador que permite detectar la expresión de dicho gen, es decir, se refiere a un cebador complementario al ARNm o al ADNc de dicho gen. Cebadores que pueden emplearse en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica o pueden diseñarse con facilidad a partir de la secuencia del gen *LBP*.

En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit de la invención está marcado o inmovilizado. La ventaja de usar anticuerpos marcados o inmovilizados con respecto a usarlos sin marcar o inmovilizar es que facilitan su adaptación a técnicas estándar de aislamiento y que pueden emplearse con equipamiento estándar. Por tanto, en una realización preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado o inmovilizado. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit de la invención está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que consiste en: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit de la invención está inmovilizado en una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

El término “marcado”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está conjugado con una etiqueta. Son conocidos en el estado de la técnica un elevado número de etiquetas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Ejemplos de etiquetas que pueden ser empleadas para marcar un anticuerpo son, pero sin limitarnos, radioisótopos [por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ ], marcadores fluorescentes o luminiscentes [por ejemplo, fluoresceína (FITC), rodamina, *texas red*, ficoeritrina (PE), aloficocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-

hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)]; fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, fragmentos F(ab)<sub>2</sub>], etiquetas de afinidad [por ejemplo, biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética del hueso (BMP), haptenos], enzimas o sustratos de enzimas [por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP)].

Los pasos (a) y/o (b) del método de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un equipo robótico para la cuantificación, en el paso (a), de la cantidad de producto de expresión del gen *LBP* en la muestra biológica aislada.

Además de los pasos especificados anteriormente, el método de la invención puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo, aunque sin limitarnos, relacionados con el pre-tratamiento de la muestra biológica aislada previamente a su análisis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** A y A<sup>1</sup>) Expresión génica de LBP en tejido adiposo subcutáneo (1A) y visceral (1A<sup>1</sup>) en humanos en función del grado de obesidad. B) Expresión génica de LBP en preadipocitos y adipocitos viscerales vs. subcutáneos de humano. \* p< 0.05 comparado con tejido adiposo visceral (VAT); \*\* p< 0.005 comparado con tejido adiposo visceral (VAT), # p< 0.05 comparado con preadipocitos; ### p< 0.005 comparado con preadipocitos. C) Expresión génica de LBP durante la diferenciación de preadipocitos subcutáneos de sujetos humanos delgados y obesos. \*\* p< 0.005 comparado con el día 0; y # p< 0.05 comparado con adipocitos de sujetos delgados. D) Expresión génica de LBP y la concentración de LBP circulante secretada al medio por adipocitos (n=12) y células de la fracción estroma vascular (SVF, n=12) de humano. E) LBP secretado durante la diferenciación adipocitaria en humanos a día 14 \*\* p< 0.005 comparado con

preadipocitos. F) Expresión génica de LBP y la concentración de LBP circulante secretada al medio durante la diferenciación adipocitaria de células pluripotenciales hMADs \*\*  $p < 0.005$  comparado con día 0; \*\*\* $p < 0.001$  comparado con día 0. G) Expresión génica de LBP y la concentración de LBP circulante secretada al medio durante la diferenciación adipocitaria de células SGBS. H) Expresión génica de LBP y la concentración de LBP circulante secretada al medio durante la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1 de ratón \*  $p < 0.05$  comparado con día 0; \*\*  $p < 0.005$  comparado con día 0.

10 **Fig. 2.** A) Expresión génica de *FASN* y *Adipoq* en adipocitos y preadipocitos de origen visceral vs. adipocitos y preadipocitos de origen subcutáneo, en humano. \*  $p < 0.05$  comparado con los de origen visceral; #  $p < 0.05$  comparado con los preadipocitos; ##  $p < 0.005$  comparado con los preadipocitos. B) Expresión génica de *FASN* y *Adipoq* durante la diferenciación de preadipocitos de origen subcutáneo de sujetos humanos delgados y obesos. \*\*  $p < 0.005$  comparado con el día 0; y ##  $p < 0.005$  comparado con adipocitos de sujetos delgados. C) Expresión génica de LBP en adipocitos aislados, células de la fracción estroma-vascular, y células CD14<sup>+</sup> y CD14<sup>-</sup>, de humano (n=4). D) Expresión génica de *FASN* y *Adipoq* durante la diferenciación de células SGBS. E) Expresión génica de *FASN* durante la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1. \*  $p < 0.05$  comparado con el día 0; \*\*  $p < 0.005$  comparado con el día 0.

25 **Fig. 3.** A) Expresión génica de *LBP* en tejido adiposo humano subcutáneo después de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica (n=8). B) Expresión génica de *LBP* en tejido adiposo humano subcutáneo en relación al estado de lipodistrofia en pacientes con VIH (n=28, 7 participantes por cada grupo). C) Expresión génica de *LBP* en tejido adiposo humano subcutáneo después de ganancia de peso por sobrealimentación (n=20). D) Comparación de la expresión génica de *LBP* en tejido adiposo blanco de origen mesentérico de ratones C57bl6/J con obesidad y resistencia a la insulina inducida por dieta \* $p < 0.05$  comparado con ratones delgados; \*\* $p < 0.005$  comparado con ratones delgados. E) Expresión génica de *LBP* en tejido adiposo blanco de origen epididimal de ratones C57Bl6/J después del tratamiento con glitazonas \*\*  $p < 0.005$  comparado con ratones que siguen un tratamiento control. F) Efectos de rosiglitazona (10 nM) sobre la expresión génica de *LBP* durante la diferenciación adipocitaria de 3T3-L1 a día 7 \*\*  $p < 0.005$  comparado con el vehículo. G) Efectos de rosiglitazona (0.1 y 1  $\mu$ M) sobre la expresión génica de *LBP* durante la diferenciación de preadipocitos

humanos a día 14 \*\*  $p < 0.005$  comparados con el adipocito diferenciado (Dif.) que recibe tratamiento control o vehículo. H) Efectos de rosiglitazona (0.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión génica de LBP en explantes de tejido adiposo humano de origen subcutáneo \*  $p < 0.05$  comparado con el control. I) Efectos de rosiglitazona (0.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión génica de LBP y LBP secretada en explantes de tejido adiposo humano de origen subcutáneo y visceral de manera apareada \*  $p < 0.05$  comparado con el control; \*\*  $p < 0.005$  comparado con el control. J) Expresión génica de LBP en tejido adiposo blanco de origen epididimal de ratones C57BL6 mutados (o "knockout") de 4 semanas de edad (*ob/ob*, PPAR $\gamma$ 2KO y POKO) \*  $p < 0.05$  comparado con el control (ratón salvaje); \*\*  $p < 0.005$  comparado con el control (ratón salvaje). Todos los experimentos *in vitro* y *ex-vivo* se realizaron por triplicado.

**Fig. 4.** A, A<sup>I</sup> y A<sup>II</sup>) Expresión génica de *FASN* (4A), *Adipoq* (4A<sup>I</sup>) e *IL6* (4A<sup>II</sup>) en tejido adiposo humano de origen subcutáneo después de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica (n=8). B y B<sup>I</sup>) Comparación de la expresión génica PPAR $\gamma$  (4B) y *Adipoq* (4B<sup>I</sup>) en tejido adiposo humano de origen subcutáneo en relación con el grado de lipodistrofia (LD) en pacientes VIH (n=28, 7 para cada grupo).

**Fig. 5.** A<sup>I</sup> - A<sup>V</sup>) Efectos de rosiglitazona (10 nM) sobre la expresión génica de *FASN* (5A), *Adipoq* (A<sup>II</sup>), PPAR $\gamma$  (5A<sup>IV</sup>) y *Pref-1* (5A<sup>I</sup>), y sobre la fosforilación de <sup>pSer473</sup>Akt (5A<sup>III</sup>) y <sup>pPanTyr</sup>IRS1 (5A<sup>V</sup>) bajo el estímulo de insulina (100 nM, 10 min) durante la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1 a día 7. \*  $p < 0.05$  comparado con el vehículo; \*\*  $p < 0.005$  comparado con el vehículo. B) Efectos de rosiglitazona (0.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión génica de *ADIPOQ* y *LEP* en explantes apareados de tejido adiposo de origen subcutáneo y visceral. \*  $p < 0.05$  comparado con control; \*\*  $p < 0.005$  comparado con control.

**Fig. 6.** A) Expresión génica de LBP en tejido adiposo blanco de origen mesentérico de ratones salvajes (WT) y CD14<sup>-/-</sup>KO tratados con LPS \*p<0.05 comparado con el control; # p<0.05 comparado con el salvaje (WT) tratado con LPS. B - B<sup>II</sup>) Efecto del medio condicionado de células monocitarias (THP-1) estimuladas durante 24h con LPS [LPS-MCM (0.5 y 5 %)] sobre la expresión génica de LBP (6B) y de IL-6 (6B<sup>II</sup>) y sobre la secreción de LBP (6B<sup>II</sup>) en células 3T3-L1 durante la diferenciación adipocitaria a día 2.\* p< 0.05 comparado con los controles diferenciados a día 2 (vehículo);\*\* p< 0.005 comparado con los controles diferenciados a día 2 (vehículo). C) Efectos de TNF-α (10 ng/ml) sobre la expresión génica de LBP y sobre la secreción de LBP en células 3T3-L1 durante la diferenciación adipocitaria. \*\* p< 0.005 comparado con el control diferenciado. D) Efectos de TNF-α (100 ng/ml) y LPS-MCM (5%) sobre la expresión de LBP en adipocitos humanos a las 48h. \* p< 0.05 comparado con el vehículo; \*\* p< 0.005 comparado con el vehículo. Experimentos *in vitro* se realizaron en triplicado.

**Fig. 7.** A-A<sup>V</sup>) Efectos de TNF-α (10 ng/ml) y LPS-MCM (0.5 y 5 %) sobre la expresión génica de *FASN* (7A, 7A<sup>III</sup>), *PPARγ* (7A<sup>I</sup>, 7A<sup>IV</sup>) y *Adipoq* (7A<sup>II</sup>, 7A<sup>V</sup>) durante la diferenciación adipocitaria de 3T3-L1. \* p< 0.05 comparado con el control diferenciado; \*\* p< 0.005 comparado con el control diferenciado.

**Fig. 8.** Preadipocitos de origen subcutáneo (8A) y visceral (8B) tratados con shRNA no diana o control (shC) o con shRNA dirigido a silenciar LBP (shLBP). Las células controles y las células con silenciamiento de LBP fueron diferenciadas hacia adipocitos usando un coctel adipogénico estándar, y los niveles de expresión de los genes seleccionados (relacionados con el proceso adipogénico) se midieron al final del proceso de diferenciación adipogénica (día 14). Unidades relativas de expresión génica (R.U.)\* p< 0.05 comparado con shC; \*\* p< 0.005 comparado con shC.

**Fig. 9.** Efectos de la administración de anti-LBP (0.5 µg/ml) durante 48 h sobre la expresión génica de *LBP*, *ADIPOQ*, *GLUT4* and *IL6* en adipocitos diferenciados de origen visceral (9B y 9B<sup>I</sup>) y subcutáneo (9A y 9A<sup>I</sup>). Unidades relativas de expresión génica (R.U.) \* p< 0.05 comparado con C; \*\* p< 0.005 comparado con C.

**EJEMPLOS**

Los objetivos de los ensayos descritos a continuación fueron los siguientes:

- 5 (i) Estudiar la expresión génica y proteica de LBP en tejido adiposo humano y de ratón, en fracciones de tejido adiposo y durante la diferenciación adipocitaria.
- (ii) Testar los efectos de una dieta alta en grasas, citocinas inflamatorias, LPS y agonistas de PPAR $\gamma$  en tejido adiposo de ratón, en adipocitos humanos y en  
10 explantes de tejido adiposo.
- (iii) Estudiar el posible papel de LBP en la diferenciación adipocitaria usando vectores lentivirales shRNA para silenciar la expresión del gen *LBP*, y el efecto del bloqueo de la actividad LBP mediante el uso de un anticuerpo específico anti-LBP Ab biG 33.

15

**Ejemplo 1. Asociación de la expresión génica de LBP con obesidad y resistencia a la insulina.**

Se analizaron dos cohortes. El gen de *LBP* se encontró expresado en tejido adiposo  
20 humano, estando sustancialmente aumentado en tejido adiposo subcutáneo (SAT) vs. visceral (VAT) [0,091 (0,01-0,24) vs. 0,023 (0,005-0,052) unidad de expresión relativa (R.U.),  $p < 0,0001$ ]. *LBP* estaba significativamente más expresado en sujetos obesos vs. no obesos en paralelo con el grado de deterioro metabólico (por ejemplo, con una alta glicemia basal, resistencia a la insulina, HbA<sub>1c</sub>, triglicéridos basales, y una disminución  
25 de los niveles de adiponectina), y esto se confirmó en dos cohortes independientes en ambos tejidos (SAT y VAT) (Figura 1A y 1A<sup>1</sup>). En ambas cohortes, la expresión génica de LBP en SAT se asociaba negativamente con genes anabólicos y adipogénicos (e.g. *PPAR $\gamma$* , *FABP4*, *FASN* y *ACC1*), y genes asociados a la formación de la vacuola lipídica (perilipin1, *PLIN1*); pero positivamente con genes proinflamatorios y relacionados con la actividad de macrófagos (*IL6*, *CD14*). Similarmente, la expresión de LBP en VAT se  
30 asociaba negativamente con *PPAR $\gamma$* , *FASN*, *PLIN1* y omentin (*ITLN1*); y positivamente con los genes inflamatorios como *HIF1 $\alpha$* , *MCP1*, *TNF* and *visfatin*. Estos datos sugerían que *LBP* estaba regulado durante el proceso de expansión del tejido adiposo e inflamación. Considerando que la producción de TNF $\alpha$  en el tejido adiposo se encuentra  
35 altamente asociada con el estrés de retículo endoplasmático (ER), se estudió también la

posible relación entre LBP y genes marcadores de estrés de ER (como HSPA5 y ATF6). La expresión de TNF estaba significativamente correlacionada con estos marcadores de estrés de ER [con *HSPA5* ( $r=0,43$ ,  $p= 0,006$ ) y con *ATF6* ( $r=0,37$ ,  $p= 0,02$ ) en VAT, y solamente con *ATF6* ( $r=0,32$ ,  $p= 0,03$ ) en SAT], pero no se encontró asociación entre la  
 5 expresión de LBP y marcadores de estrés de ER. Igualmente, considerando solo los sujetos obesos mórbidos, la expresión de LBP estaba significativamente asociada con *HSPA5* ( $r=0,41$ ,  $p=0,02$ ) en VAT, y muestra una tendencia en SAT ( $r=0,28$ ,  $p=0,08$ ).

10 **Ejemplo 2. Niveles de mRNA y proteína para LBP en adipocitos aislados en asociación con obesidad.**

En concordancia con los datos de tejido adiposo, el incremento en la expresión génica de LBP era más alto en adipocitos derivados de SAT vs. VAT (a día 14 de diferenciación adipocitaria, Figura 1B) en paralelo a una mayor activación del programa adipogénico y  
 15 acumulación de grasa en SAT vs. VAT (Figura 2A). Los niveles de LBP tanto a nivel de proteína como de mRNA eran también mayores en adipocitos de pacientes obesos vs. adipocitos de los pacientes no obesos (Figura 1C) De hecho, el aumento en la síntesis de LBP corre en paralelo con la diferenciación adipocitaria y con la acumulación de lípidos en los adipocitos. A diferencia de LBP, los marcadores adipogénicos (*FASN* y *Adipoq*)  
 20 Adipoq) són superiores en los adipocitos de pacientes no obesos vs. los adipocitos de pacientes obesos (Figura 2B).

**Ejemplo 3. La expresión de LBP durante la diferenciación adipocitaria.**

25 El fraccionamiento celular del tejido adiposo reveló que la producción de LBP está restringida a la población adipocitaria (Figura 1D). La concentración de LBP secretada al medio en 24h fue significativamente superior en cultivos de adipocitos maduros respecto a cultivos de células de la fracción estroma-vascular (SVCs) ( $27,6 \pm 6,7$  vs.  $2,05 \pm 0,15$  ng/ml,  $p<0,0001$ , Figura 1D). Igualmente, para investigar si los cambios en  
 30 la expresión de LBP que se asocian a obesidad y a resistencia a la insulina se relacionaban con la infiltración de macrófagos, se estudió la expresión de LBP en macrófagos aislados del tejido adiposo (células CD14<sup>+</sup>). Los niveles de mRNA de LBP estaban significativamente aumentados en células CD14<sup>-</sup> vs. CD14<sup>+</sup> ( $0,0032 \pm 0,002$  vs  $0,00041 \pm 0,0001$  R.U.,  $p=0,005$ ), pero su posible contribución a los cambios de LBP  
 35 observados en tejido adiposo era poco significativa, ya que sus niveles de expresión

eran muy bajos respecto a los niveles de expresión génica que tienen los adipocitos (Figura 2C). Los niveles de proteína LBP secretados por los adipocitos eran significativamente superiores respecto a los secretados por los preadipocitos (Figura 1B, 1E). Para testar los cambios de LBP durante la diferenciación adipocitaria, se analizaron los niveles de LBP en las células y en los sobrenadantes que eran secuencialmente obtenidos en los días 0, 3, 7, 10 y 13 de diferenciación adipocitaria. LBP (tanto a nivel de transcrito como de proteína) aumentaba progresivamente, principalmente en los últimos estadios de la diferenciación adipocitaria (en los días 10 y 13, Figura 1F en paralelo con los marcadores adipogénicos (FASN y Adipoq, Figura 2D). Este aumento en LBP fue independientemente confirmado en células SGBS humanas (Figura 1G) y en células 3T3-L1 de ratón (Figura 1H), donde sigue un patrón paralelo a FASN (Figura 2E).

**Ejemplo 4. Efectos de la reducción de masa grasa en la expresión de LBP en tejido adiposo subcutáneo.**

La pérdida de peso en sujetos obesos es conocida por promover la expansión del tejido adiposo y mejorar la sensibilidad a la insulina. En concordancia con esto, en dos cohortes independientes, la pérdida de peso mediada por cirugía bariátrica (a los dos años) disminuyó la expresión génica de LBP, en paralelo a la mejora en la sensibilidad a la insulina y el incremento en la expresión génica de marcadores típicamente inhibidos en estados de resistencia a la insulina (Figura 3A y Figura 4A, 4A<sup>I</sup> y 4A<sup>II</sup>). De hecho, el porcentaje de cambio en la pérdida de peso se correlacionaba con la expresión de *ADIPOQ* ( $r= 0.56$ ,  $p= 0.003$ ), y negativamente con la expresión de *LEP* ( $r= -0,64$ ,  $p= 0,001$ ), *TNF $\alpha$*  ( $r= -0,46$ ,  $p= 0,02$ ) y *LBP* ( $r= -0,62$ ,  $p= 0,001$ ). Interesantemente, el porcentaje de cambio de LBP estaba significativamente correlacionado con el porcentaje de cambio de *LEP* ( $r=0,73$ ,  $p<0,0001$ ) y *TNF $\alpha$*  ( $r=0,60$ ,  $p=0,002$ ).

Para analizar minuciosamente el efecto de la masa grasa y de la resistencia a la insulina en los niveles de LBP, se investigó el efecto de la lipodistrofia en la regulación de LBP. En este caso, y contrario a la pérdida de peso, la disminución en masa grasa (asociada con un fallo del tejido adiposo) se asocia con resistencia a la insulina y dislipemia. Como se podría esperar, los marcadores génicos adipocitarios (*PPAR $\gamma$*  y *adiponectin*) estaban disminuidos en los tejidos adiposos de los pacientes lipodistróficos. Curiosamente, los niveles de LBP estaban también disminuidos en muestras lipodistróficas vs. controles.

Estos datos sugieren que la expresión de LBP requiere una normal diferenciación adipocitaria y acumulación de grasa. Igualmente, para el mismo grado de diferenciación adipocitaria (comparando solo pacientes lipodistróficos), los niveles de LBP eran significativamente superiores en aquellos pacientes lipodistróficos que eran más resistentes a la insulina y dislipémicos (Figura 3B y Figura 4B y 4B<sup>1</sup>). Por eso, estos datos también sugieren que la inducción de LBP está potenciada por la resistencia a la insulina y la inflamación.

**Ejemplo 5. Sobrealimentación e incremento de masa grasa aumenta la expresión de LBP en tejido adiposo humano y de ratón.**

En humanos, el efecto de la sobrenutrición y la ganancia de peso fue estudiado en muestras de tejido adiposo subcutáneo de 20 voluntarios varones que se sometieron durante 56 días a un protocolo de sobrealimentación con un exceso de energía diario de 750 Kcal. Como resultado de esta intervención, el peso corporal aumentaba (+2,5 kg) en paralelo al aumento de la expresión génica de LBP ( $7,5 \pm 0,8$  AU antes de la dieta vs.  $10,7 \pm 1,5$  AU después de la dieta ( $p=0,003$ ) (media del cambio: 1,4) (Figura 3C). Estos resultados eran replicados en tejido adiposo visceral de modelos obesos murinos, donde los niveles de LBP en tejido adiposo mesentérico eran altamente expresados y correlacionados con los niveles circulantes de LBP ( $r=0,8$ ,  $p<0,0001$ ). El efecto obesogénico y diabetogénico de la dieta alta en grasa potenciaba significativamente la expresión de LBP en el tejido adiposo de estos ratones tipo C57bl6/J (Figura 3D).

**Ejemplo 6. El efecto de agonistas de PPAR $\gamma$  en la expresión de LBP en tejido adiposo.**

Curiosamente, el tratamiento con agonistas de PPAR $\gamma$  como las glitazonas (TZD), fármacos conocidos por promover la adipogénesis y mejorar la sensibilidad a la insulina, resultaba en una disminución de los niveles de LBP en el tejido adiposo en paralelo con el aumento de sensibilidad a la insulina (Figura 3E). Este resultado sugiere que el aumento en la expresión de LBP no se encuentra tan relacionado con el proceso de expansión del tejido adiposo, pero sí con la alteración metabólica y disfuncionalidad del tejido adiposo asociada con el incremento de masa grasa y la obesidad. Esto también fue investigado *in vitro* usando modelos celulares.

35

Específicamente, se observó que la rosiglitazona disminuyó significativamente los niveles de LBP (Figura 3F) en paralelo con la mejora de parámetros relacionados con la vía de señalización de la insulina en células 3T3-L1 (Figura 5A – 5A<sup>V</sup>), en adipocitos humanos (Figura 3G) y en experimentos *ex vivo* sobre explantes de tejido adiposo (Figura 3H). El efecto de la rosiglitazona estaba más marcado en explantes de origen subcutáneo respecto a los de origen visceral (Figura 3I y Figura 5B).

La expresión de LBP en el tejido adiposo de ratones con obesidad y alteración metabólica producida por factores genéticos (modelos *ob/ob*, PPAR $\gamma$ 2KO and POKO) también fue testada. A las cuatro semanas de edad se apreció cómo los niveles de LBP estaban significativamente aumentados en los modelos asociados a obesidad (*ob/ob* and POKO) (Figure 3J).

Colectivamente estos resultados sugieren que la expresión de LBP ocurre en adipocitos diferenciados, en paralelo con el incremento de masa grasa, siendo intensificada bajo condiciones de resistencia a la insulina.

#### **Ejemplo 7. La expresión de LBP en tejido adiposo es inducida por la inflamación.**

En ratones el tratamiento con LPS aumentó la expresión de LBP en tejido adiposo, hecho que se revierte en ratones deficientes en CD14 (factor clave en la respuesta a LPS), en los que se anula la respuesta inflamatoria a LPS (Figura 6A). En experimentos *in vitro*, también se demostró el incremento en la expresión de LBP en condiciones inflamatorias (TNF- $\alpha$  y medio condicionado de macrófagos estimulados con LPS), ya sea en células 3T3-L1 o en adipocitos humanos, en paralelo con una disminución de genes adipogénicos (Figuras 6B, 6B<sup>I</sup>, 6B<sup>II</sup>, 6C, 6D y Figuras 7A-7A<sup>V</sup>).

En concordancia con esto, adipocitos humanos de pacientes obesos que se caracterizan por estar más inflamados presentaban un incremento en los niveles de LBP y una disminución en la expresión de genes adipogénicos en relación con sujetos no obesos (Figura 1C y Figura 2C).

Todos estos resultados indican que cuando el tejido adiposo es funcional y la diferenciación adipocitaria es viable en un ambiente de sensibilidad a la insulina, los niveles de expresión de LBP son bajos. Inversamente, los niveles de LBP están

aumentados bajo condiciones de diferenciación adipocitaria alterada y asociada a resistencia a la insulina e inflamación.

5 En la segunda parte del estudio, se realizaron experimentos para indagar en el papel de LBP en la fisiología del adipocito y en la diferenciación adipocitaria.

**Ejemplo 8. Efectos de silenciamiento de LBP durante la adipogénesis.**

10 Se realizó silenciamiento de LBP en preadipocitos humanos de origen visceral y subcutáneo mediante vectores lentivirales shRNA, para estudiar el efecto de éste durante la diferenciación adipocitaria. La expresión de LBP bajó entre un 50-60%, llevando a aumentar significativamente la expresión de genes adipogénicos (como *ADIPOQ* y *GLUT4*) y a disminuir los genes inflamatorios (IL6) (Figuras 8A y 8B).

15 **Ejemplo 9. Efecto del bloqueo de la actividad de LBP mediante el anticuerpo anti-LBP en el adipocito.**

20 La administración de anti-LBP Ab biG 33 (0,5 µg/ml) durante 48 h en el adipocito maduro (donde la producción de LBP es de 25-30 ng por día) mejoró significativamente el estatus adipogénico de los adipocitos incrementando la expresión de genes adipogénicos y reduciendo la expresión de IL6 (Figuras 9A, 9A<sup>1</sup>, 9B y 9B<sup>1</sup>).

25 Por todo lo descrito en estos ejemplos, se puede concluir que LBP desempeña un papel en la biología del adipocito, lo cual se deriva de las asociaciones negativas de LBP con genes implicados en la adipogénesis, y de las asociaciones positivas con los genes relacionados con la inflamación. Esta implicación en la biología del adipocito se confirmó en adipocitos aislados. La expresión del gen *LBP* y la liberación de proteína LBP en los medios de cultivo se incrementó durante la diferenciación de los adipocitos humanos.

30 El experimento durante la diferenciación adipocitaria mostraba un progresivo aumento de LBP durante dicha diferenciación, encontrándose la máxima producción a día 13, cuando el adipocito está plenamente diferenciado. Este aumento fue confirmado en otros modelos celulares (SGBS y 3T3-L1).

La acumulación de lípidos y el estrés que esto genera para el adipocito se postula como una señal para la producción de LBP. Según esta hipótesis, la reducción de lípidos llevaría a disminuir los niveles de LBP, hecho que ha sido demostrado después de la pérdida de peso y en sujetos con lipodistrofia adquirida. La disminución de LBP después  
5 de la pérdida de peso era paralela al aumento de sensibilidad a la insulina y a la disminución en la expresión de IL-6, sugiriendo que tanto la acción de la insulina como los procesos inflamatorios podrían tener un papel en la modulación de LBP. Por otro lado, la ganancia de peso por sobrenutrición lleva a un aumento significativo de LBP en tejido adiposo (en humanos y en modelos de ratón).

10

Para confirmar las asociaciones con las vías adipogénicas, se evaluaron diferentes modelos de sensibilización a la insulina. En concordancia con los datos de humanos, los niveles de mRNA de LBP estaban aumentados en ratones obesos y resistentes a la insulina. La sensibilización farmacológica a la insulina usando rosiglitazona llevó a  
15 reducir LBP en paralelo a un aumento en la sensibilidad a la insulina. Efectos similares se observaron en adipocitos y en tejido adiposo humano y de ratón.

Es bien conocido que el estado inflamatorio del tejido adiposo visceral es más marcado que el del tejido subcutáneo. En el tejido adiposo, la mayor parte de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) están principalmente producidas por la fracción del estroma vascular, mientras que la producción de LBP se da principalmente en los  
20 adipocitos, siendo mayor en los adipocitos de origen subcutáneo vs. los de origen visceral. En relación con la actividad proinflamatoria de LBP, se esperarían niveles más altos en visceral, pero este no es el caso. Interesantemente, la pérdida de peso llevó a una importante reducción de LBP. El carácter proinflamatorio de la producción de LBP (que se intensifica bajo condiciones inflamatorias) podría propiciar la infiltración y el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo, incrementando la actividad proinflamatoria de NF $\kappa$ B en el adipocito. En soporte a esta idea, la expresión LBP precede la expresión de varios marcadores de macrófagos en ratones ob/ob y POKO.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un inhibidor de la proteína de unión a lipopolisacárido seleccionado de entre un ARN de silenciamiento o un anticuerpo específico frente a dicha proteína, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/ prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad y resistencia a insulina.  
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde el anticuerpo es el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG 33.  
10
3. Uso según la reivindicación 1, donde el ARN de silenciamiento es un shRNA.
4. Composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inhibidor de la proteína de unión a lipopolisacárido seleccionado de entre un ARN de silenciamiento o un anticuerpo específico frente a dicha proteína.  
15
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, donde el anticuerpo es el anticuerpo anti-LBP humana Ab biG 33.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, donde el ARN de silenciamiento es un shRNA.

FIG. 1

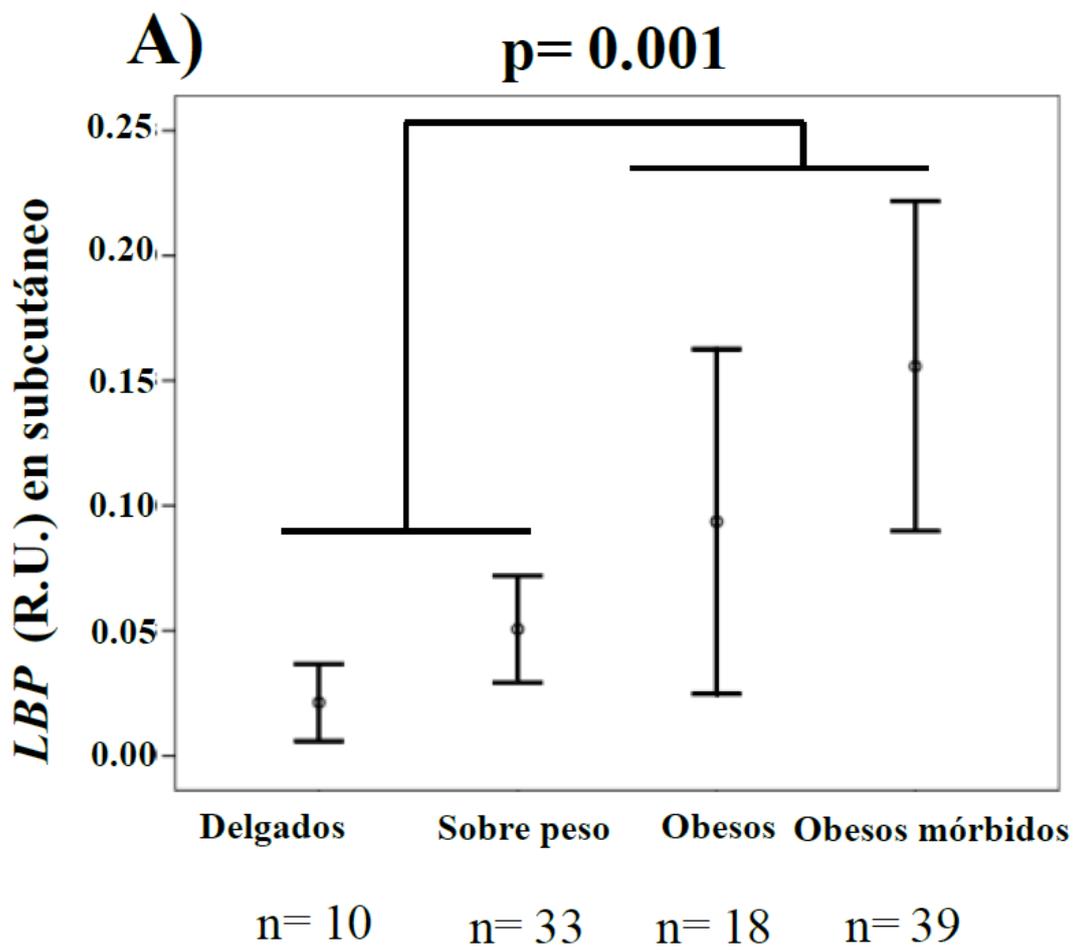


FIG. 1 (Cont.)

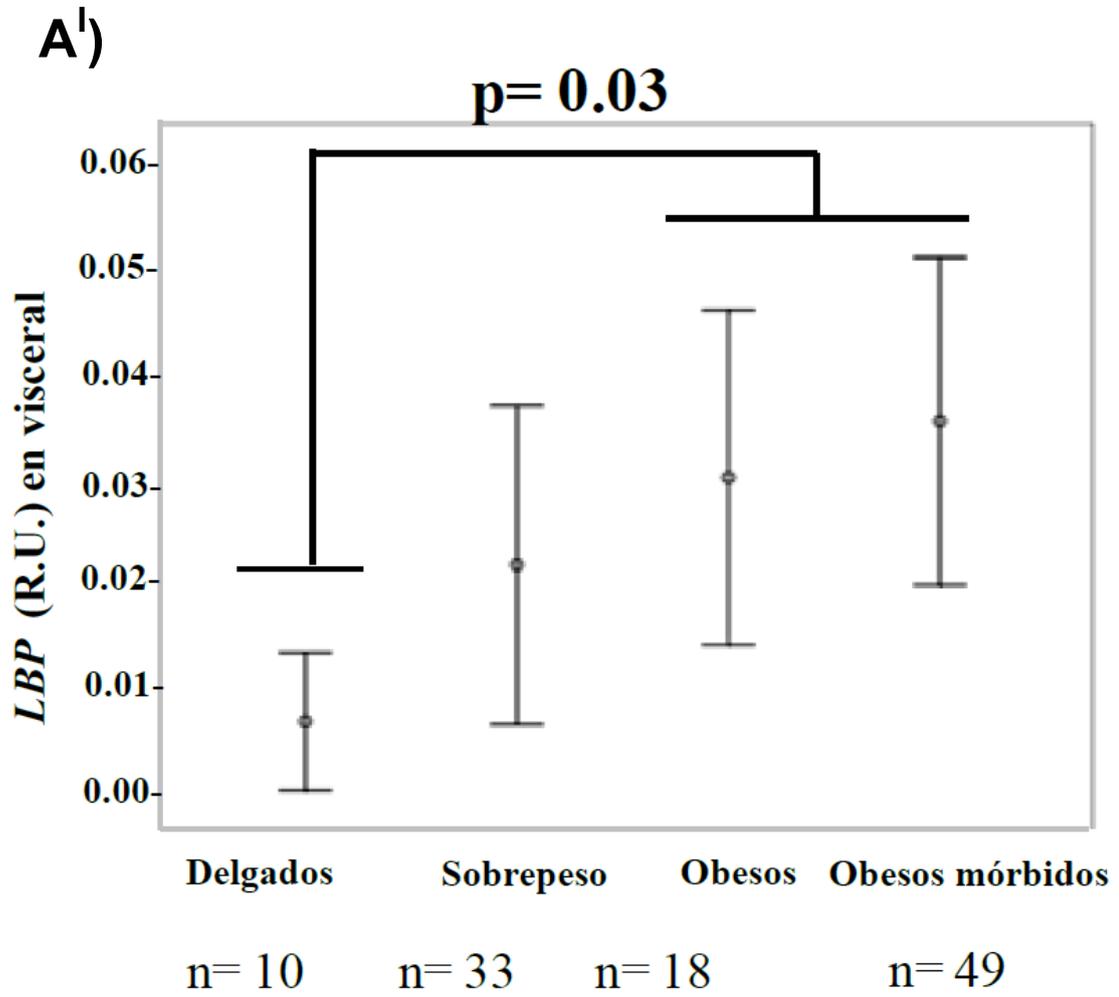


FIG. 1 (Cont.)

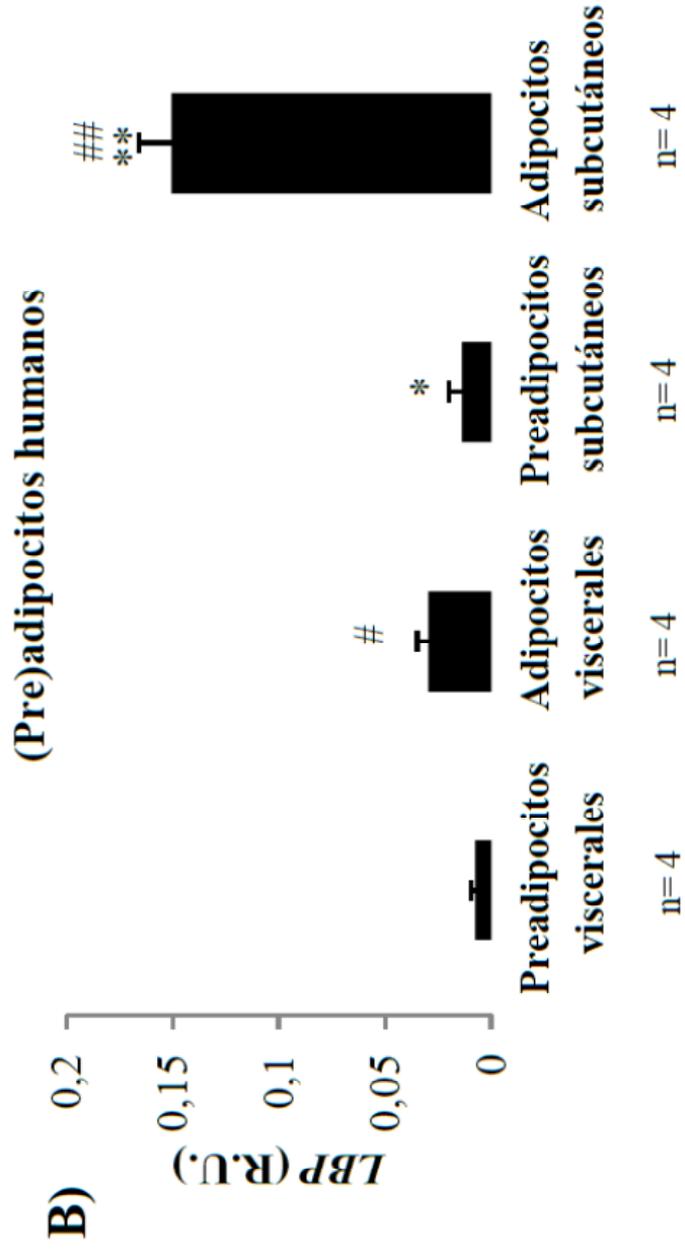


FIG. 1 (Cont.)

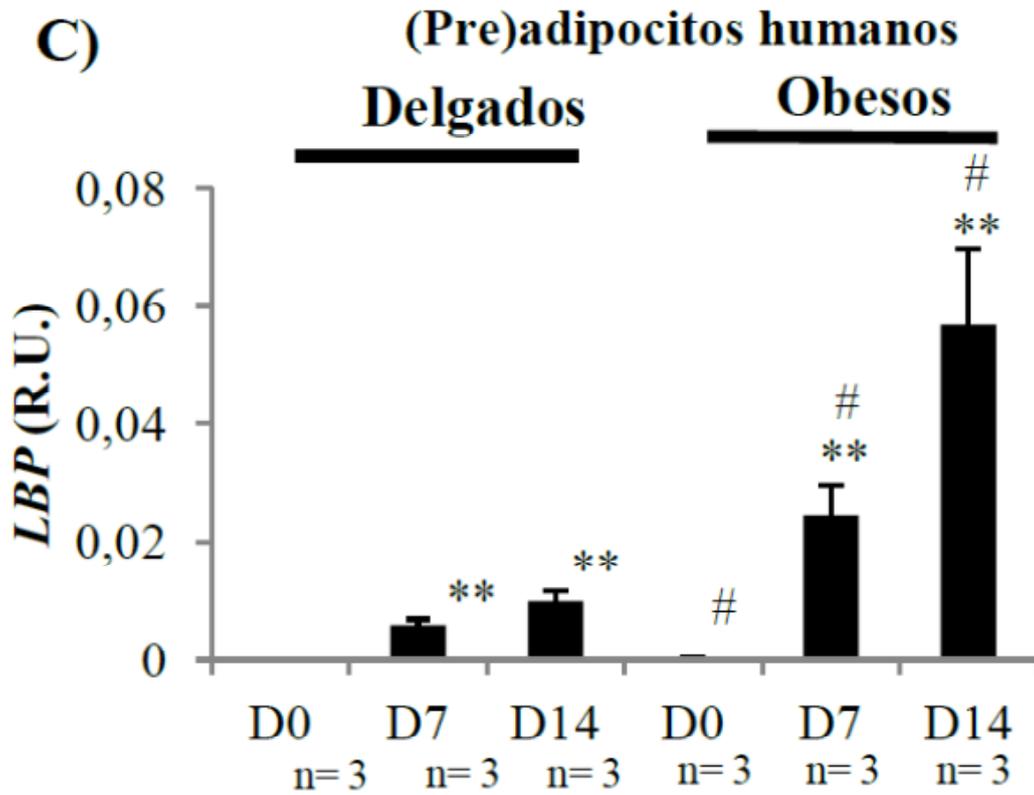


FIG. 1 (Cont.)

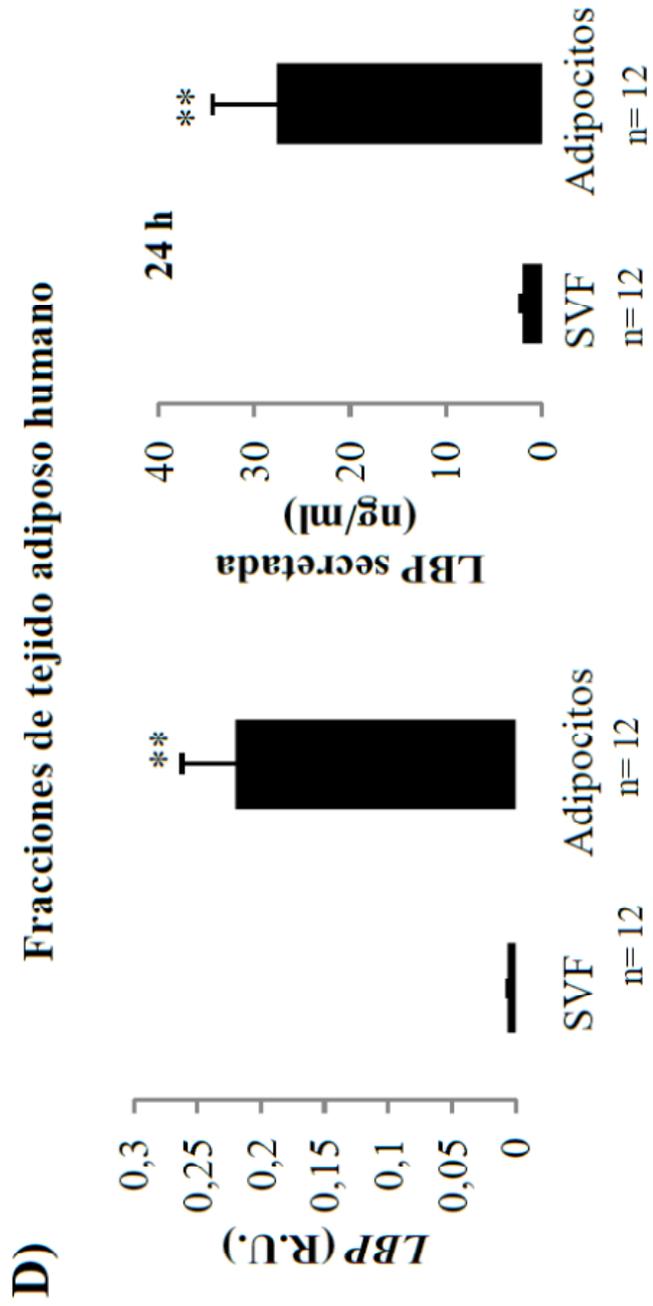


FIG. 1 (Cont.)

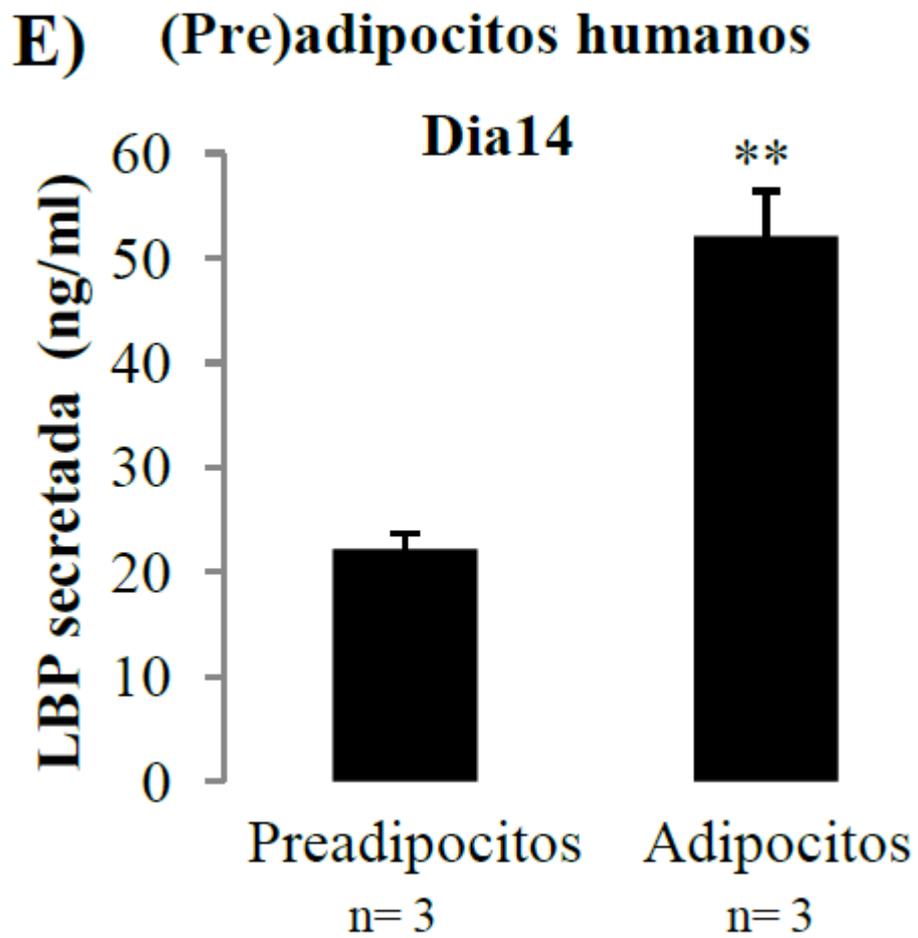


FIG. 1 (Cont.)

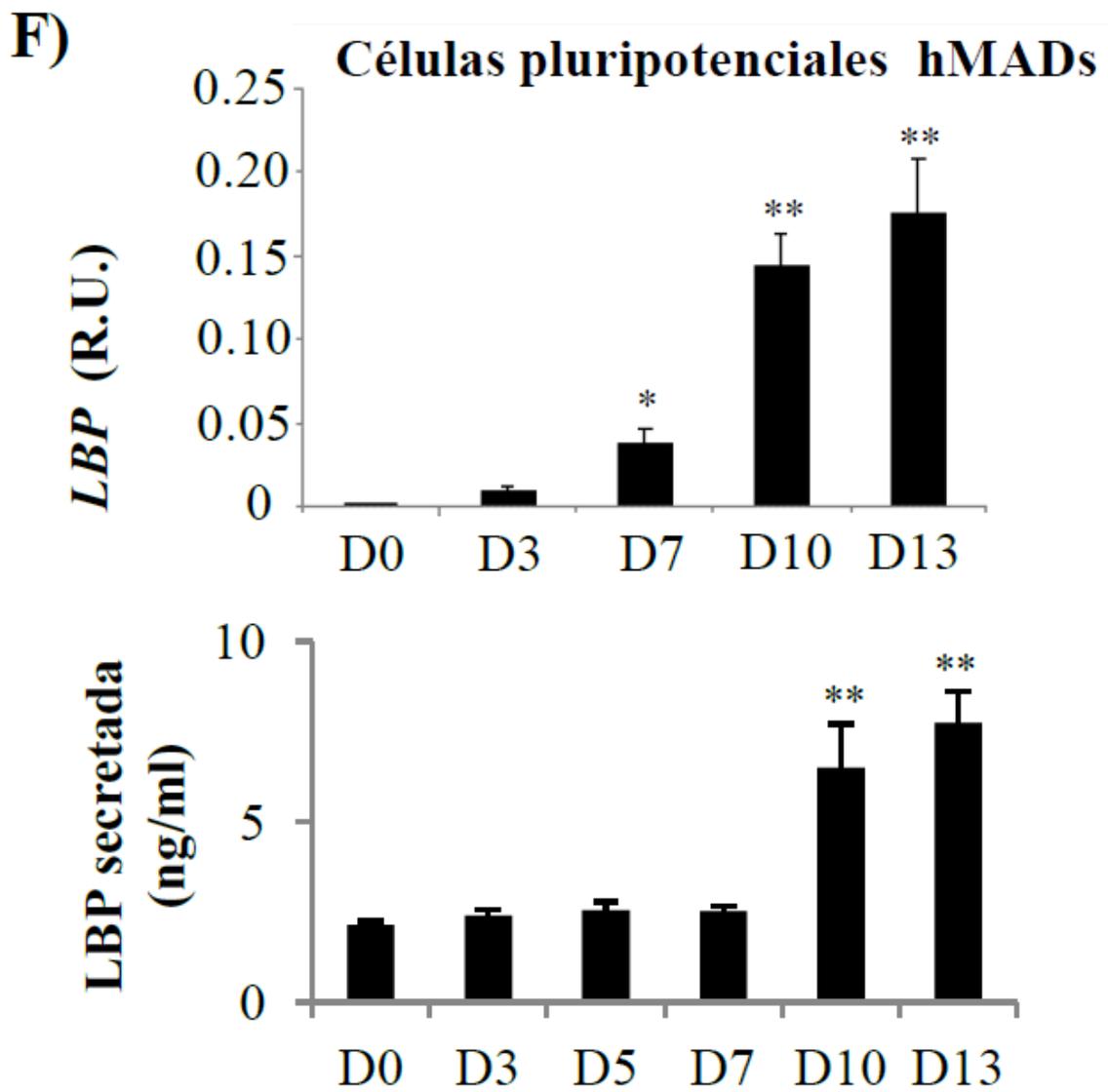


FIG. 1 (Cont.)

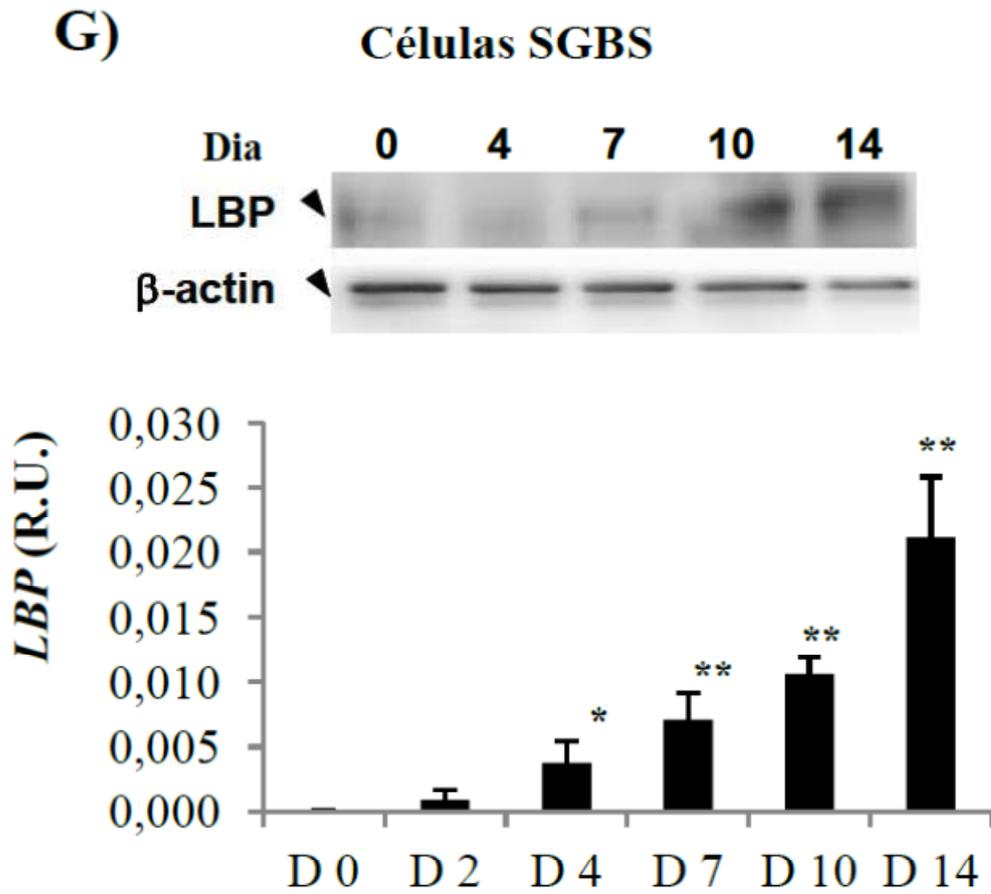


FIG. 1 (Cont.)

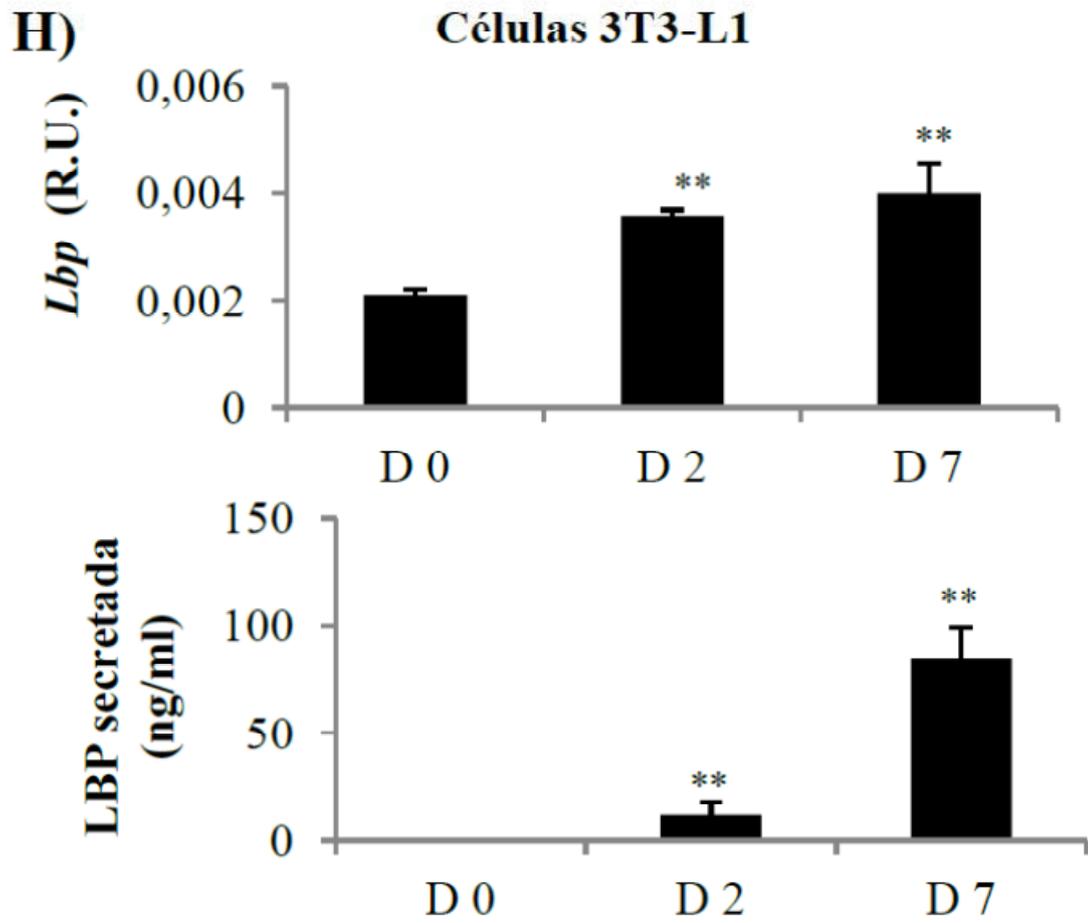


FIG. 2

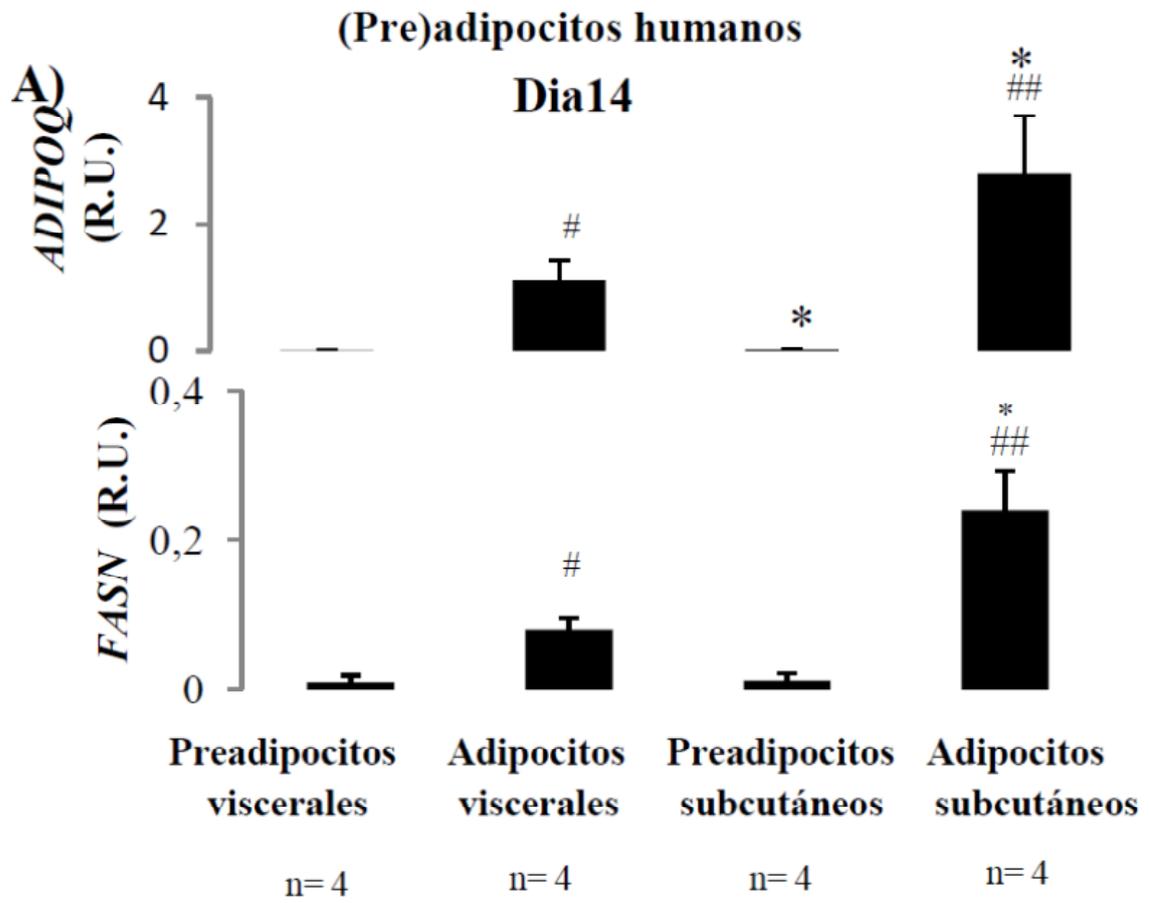


FIG. 2 (Cont.)

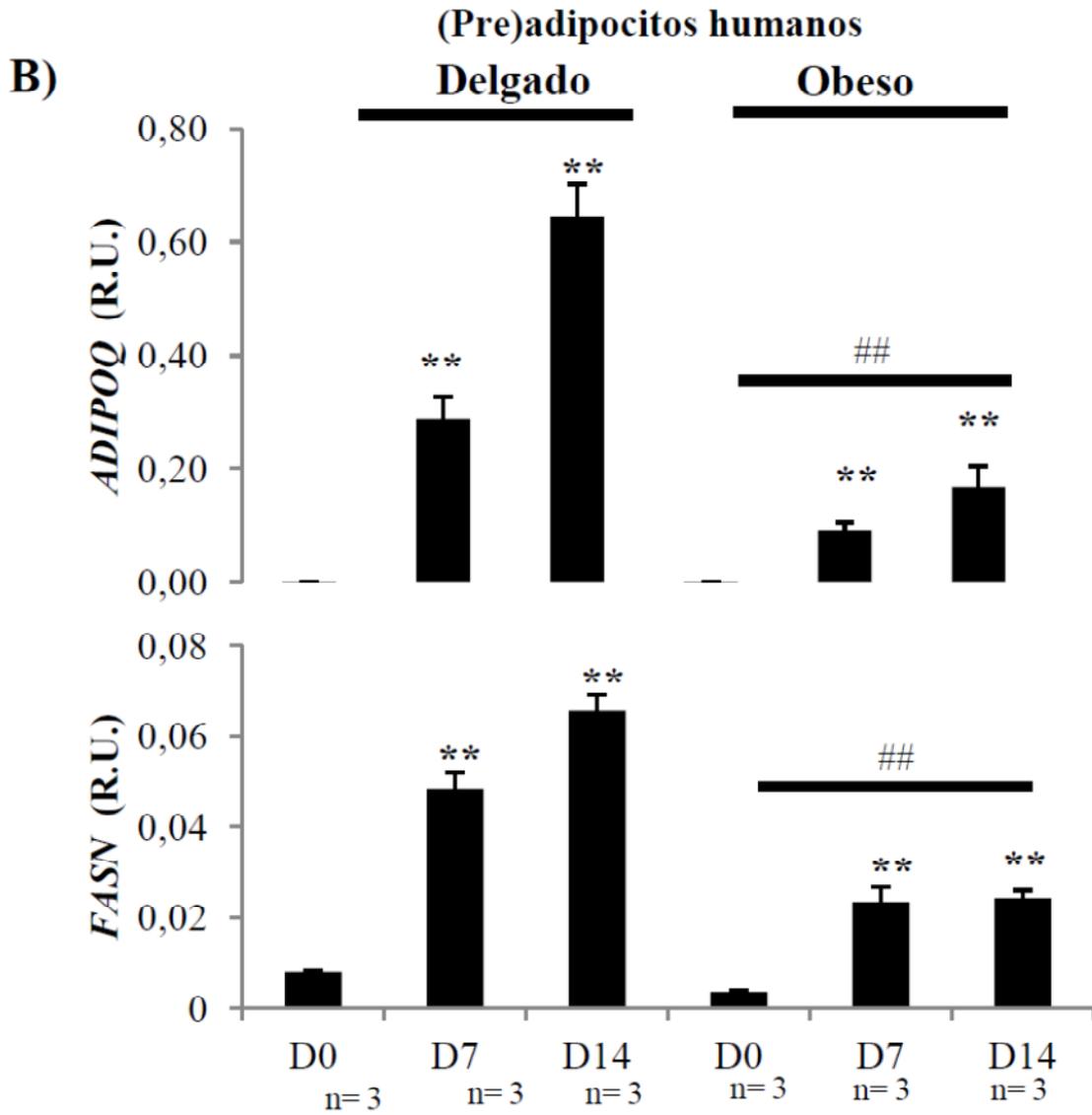


FIG. 2 (Cont.)

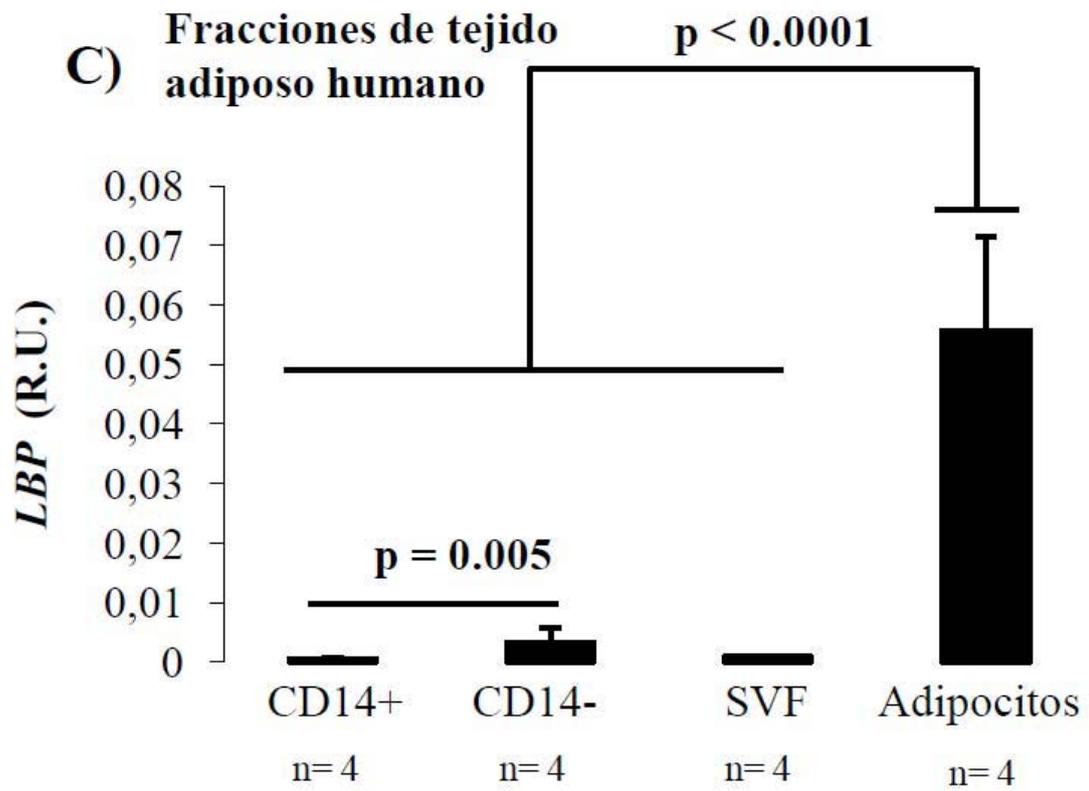


FIG. 2 (Cont.)

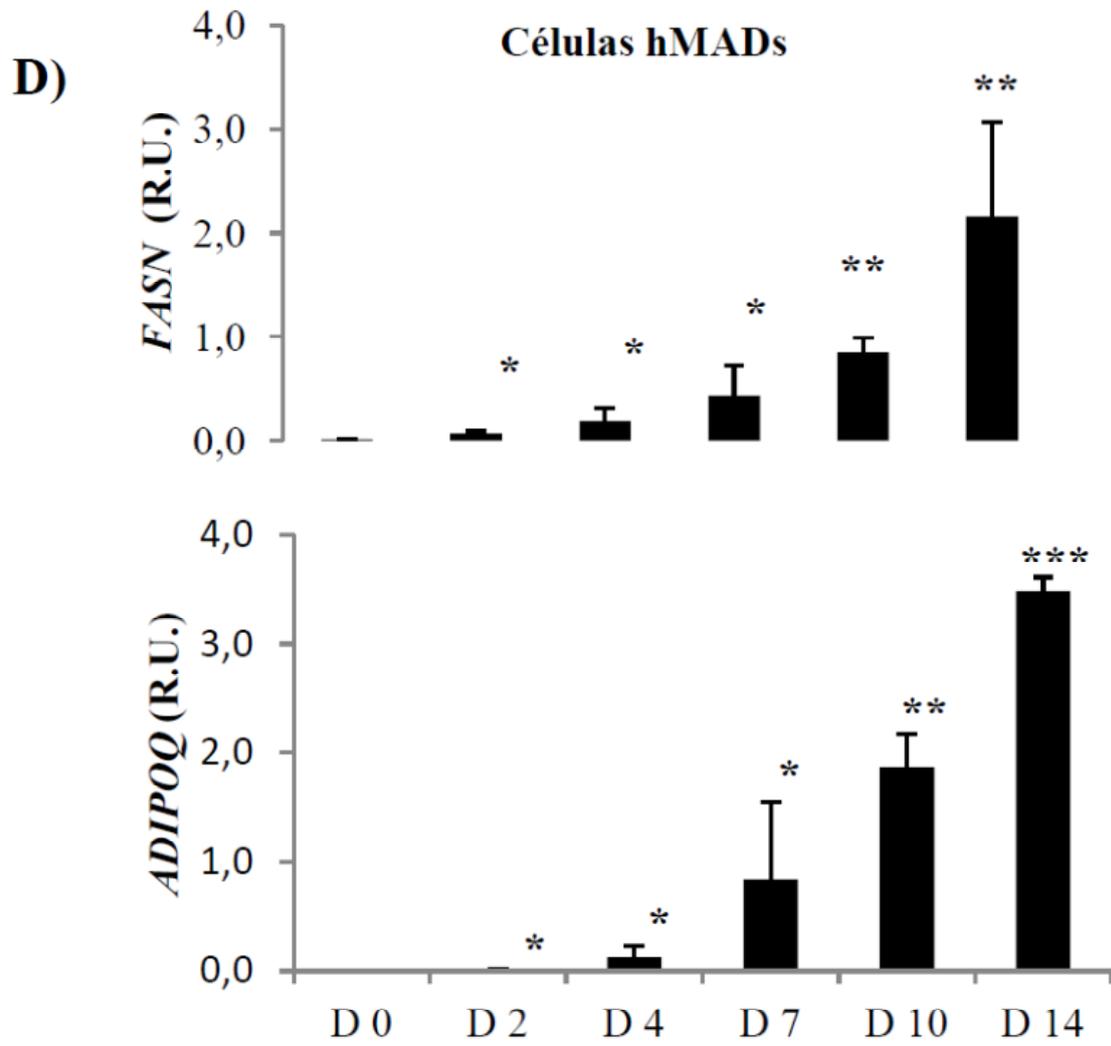


FIG. 2 (Cont.)

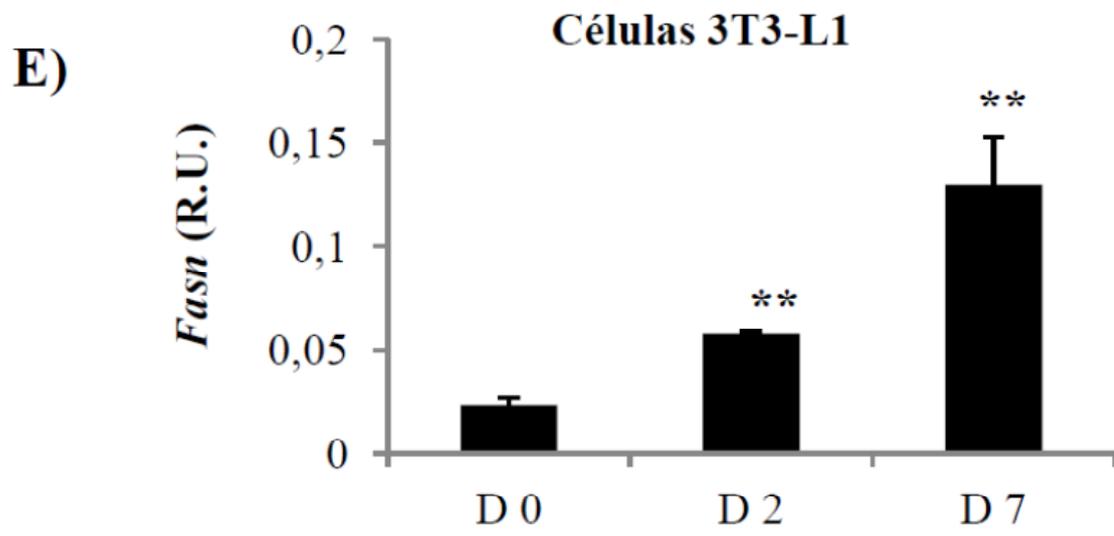


FIG. 3

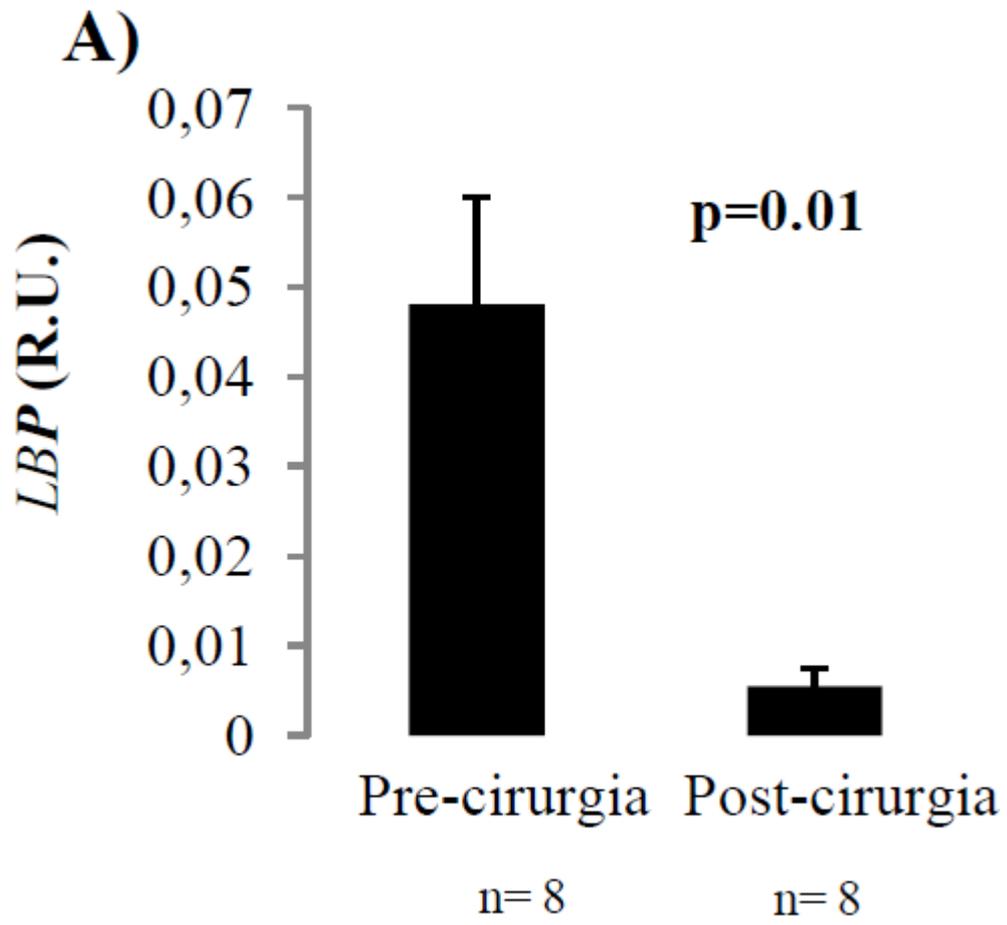


FIG. 3 (Cont.)

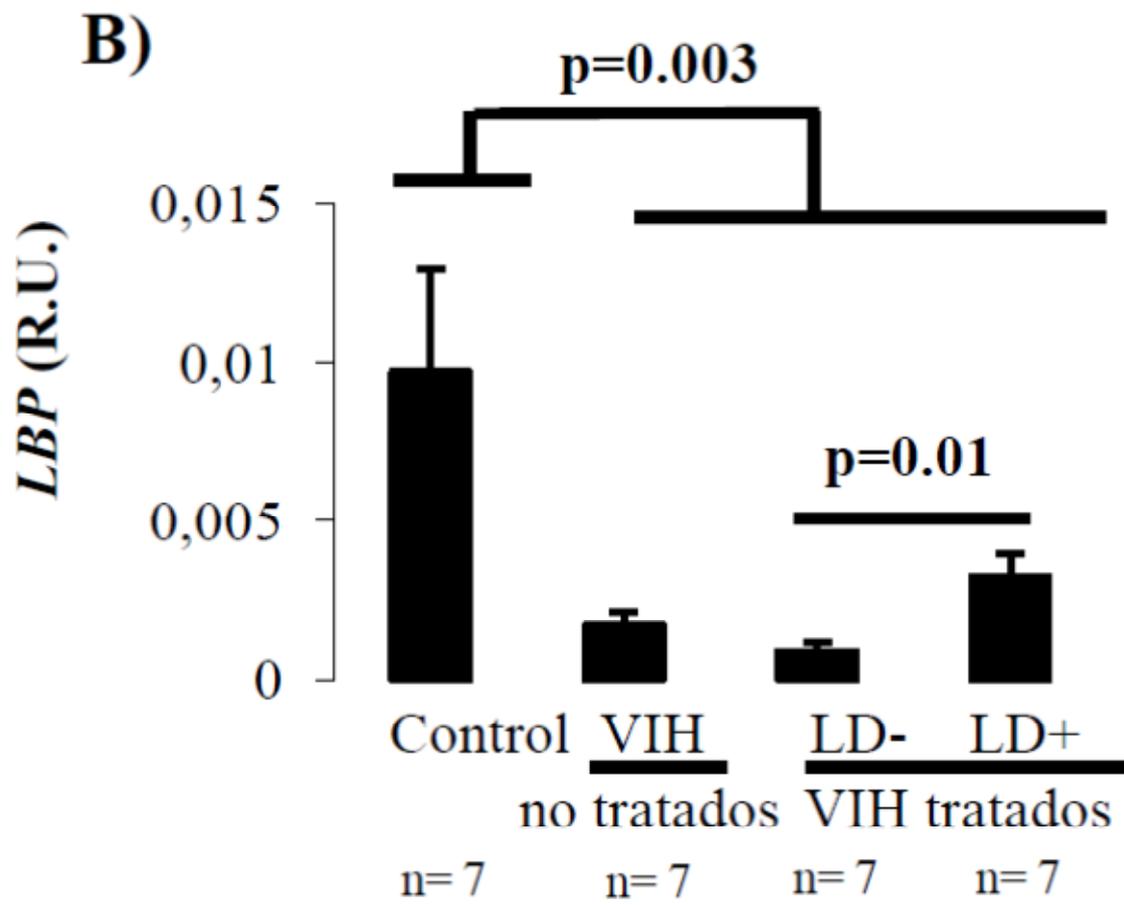


FIG. 3 (Cont.)

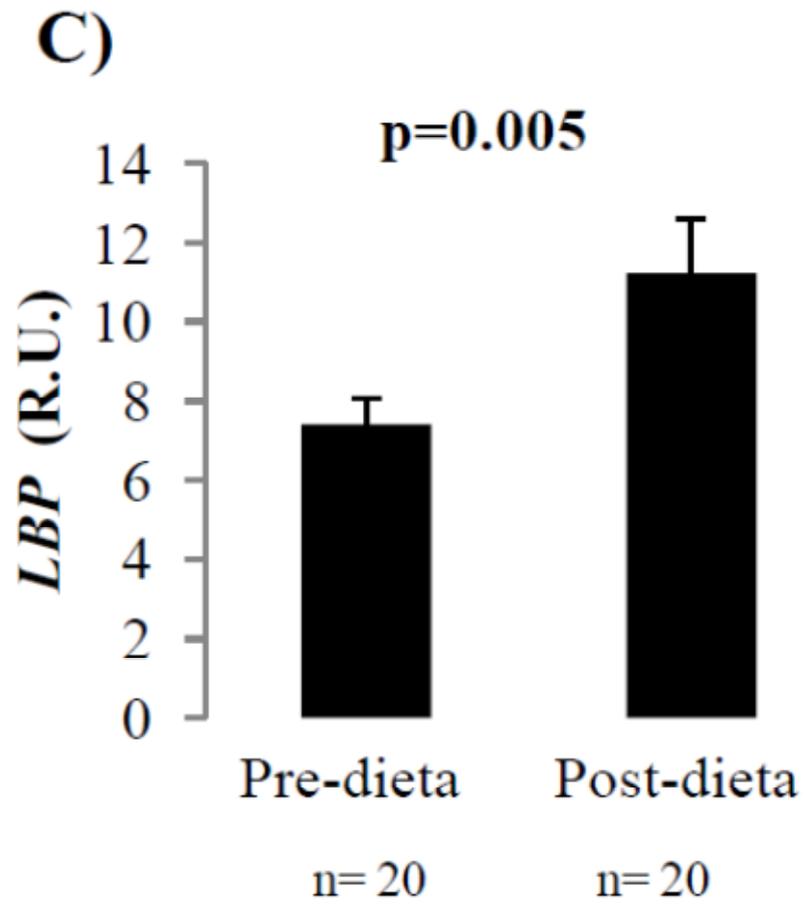


FIG. 3 (Cont.)

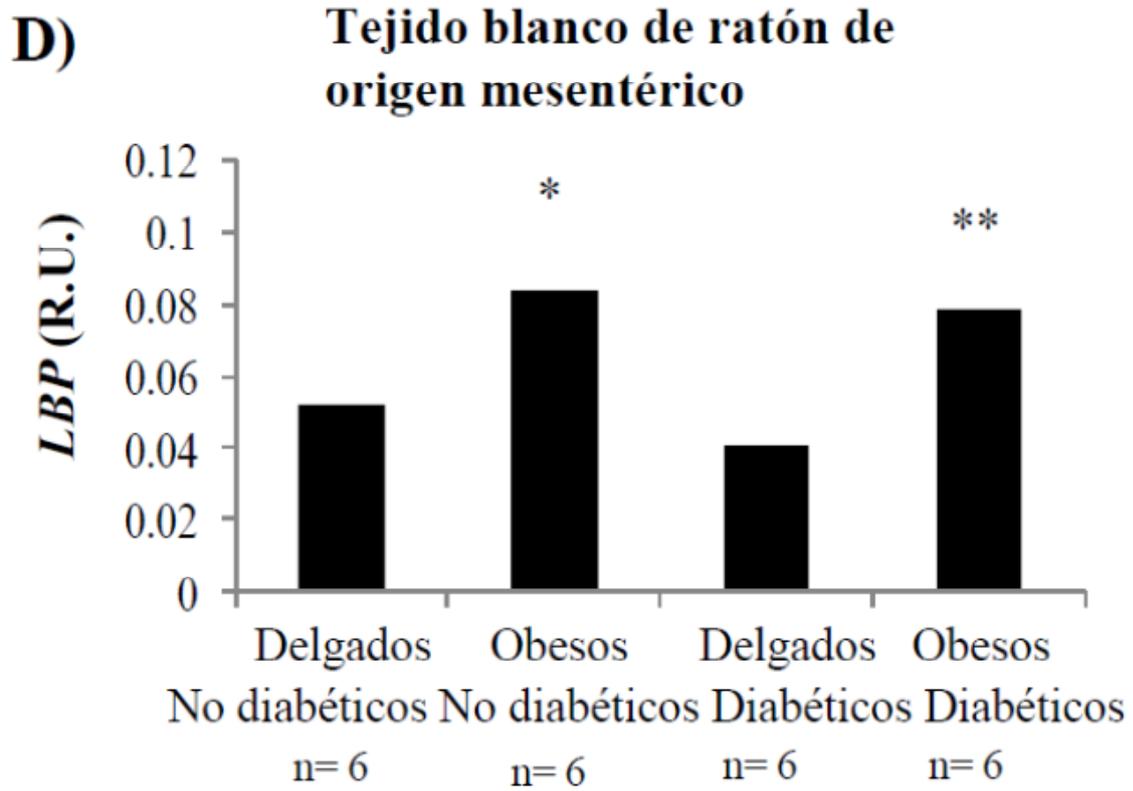


FIG. 3 (Cont.)

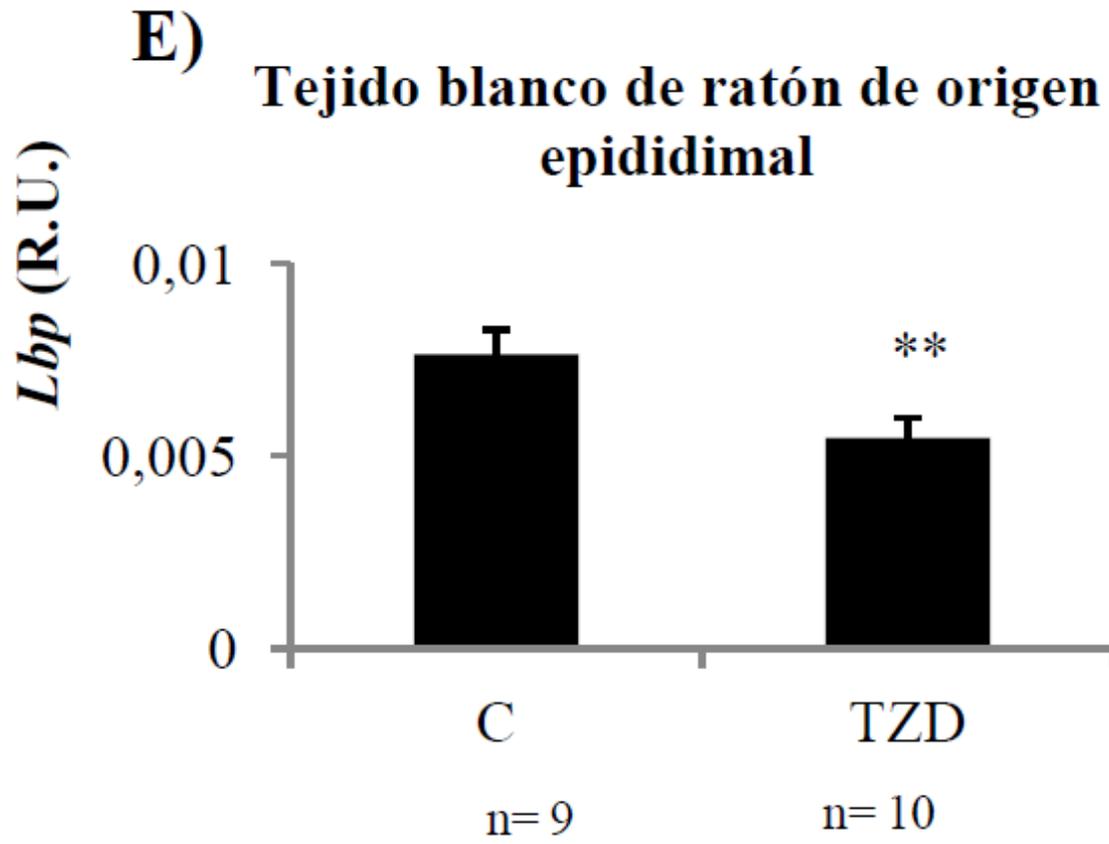


FIG. 3 (Cont.)

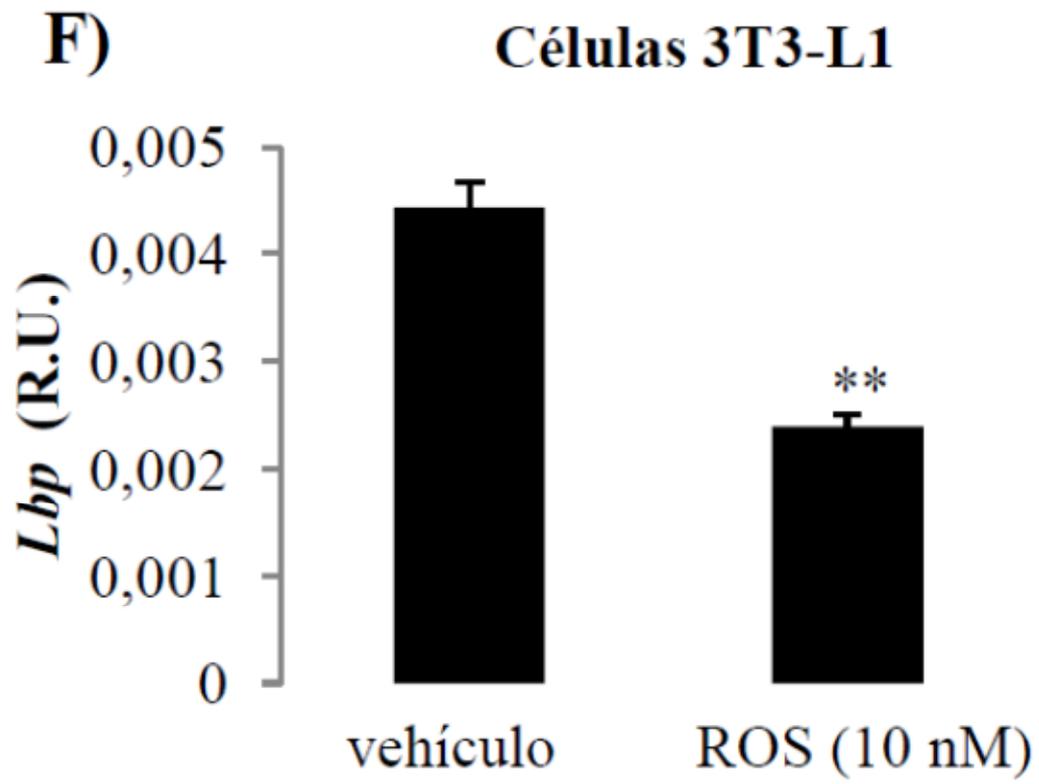


FIG. 3 (Cont.)

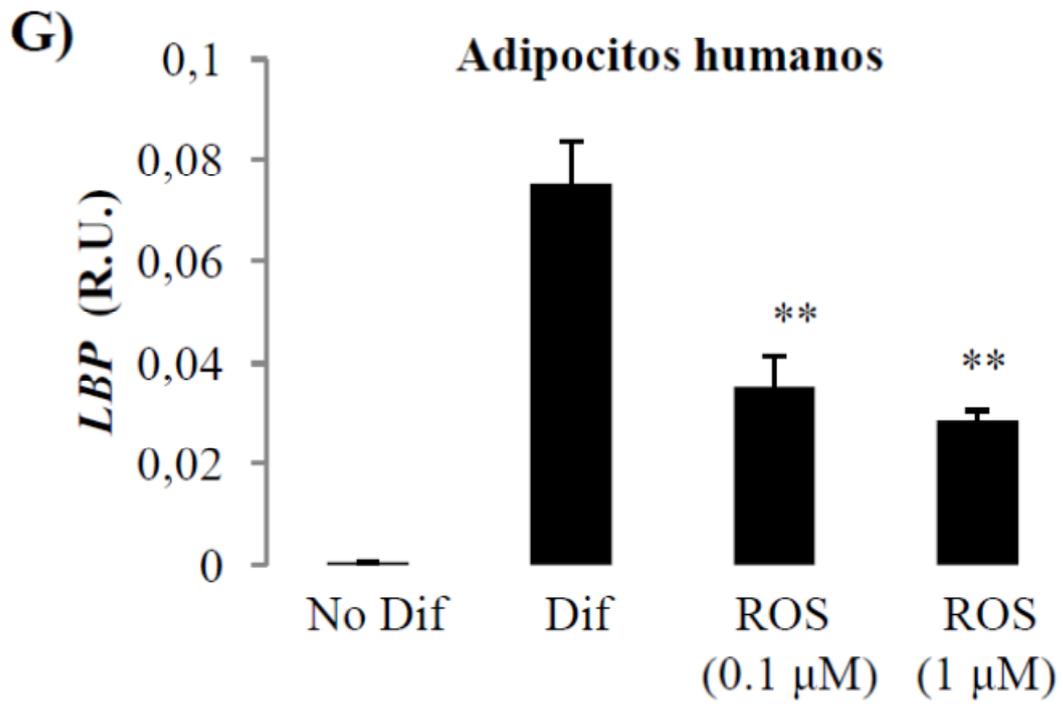


FIG. 3 (Cont.)

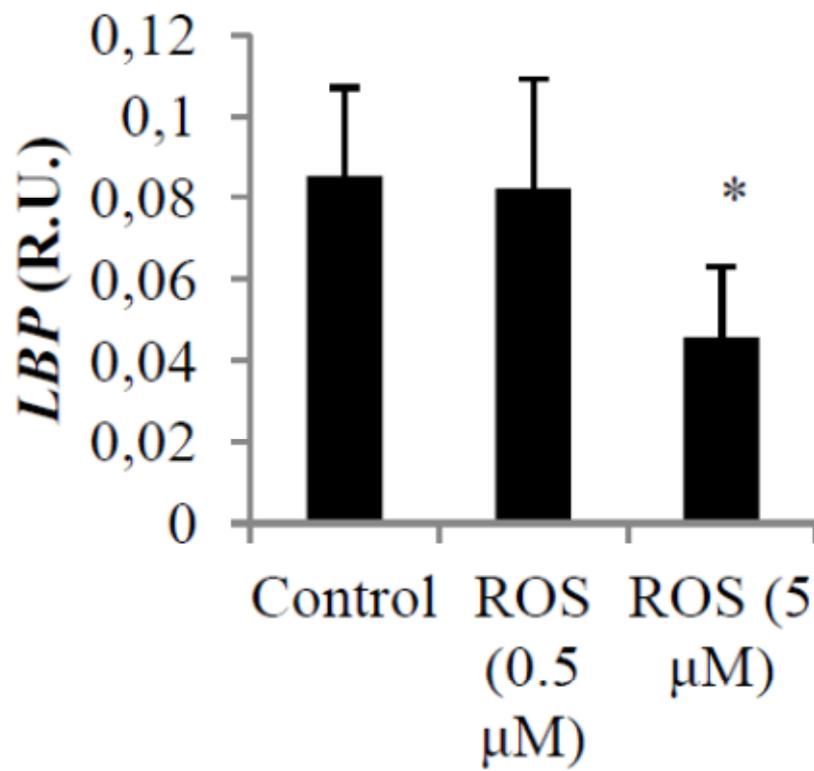
**H) Explantes de tejido adiposo  
de origen subcutáneo**

FIG. 3 (Cont.)

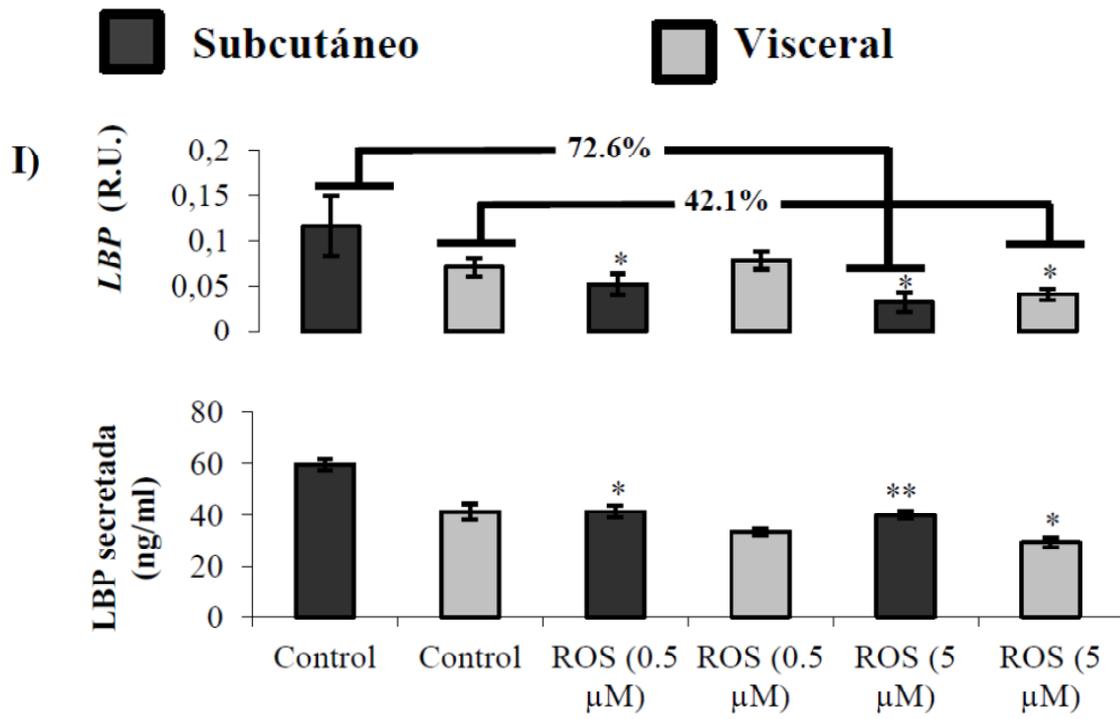


FIG. 3 (Cont.)

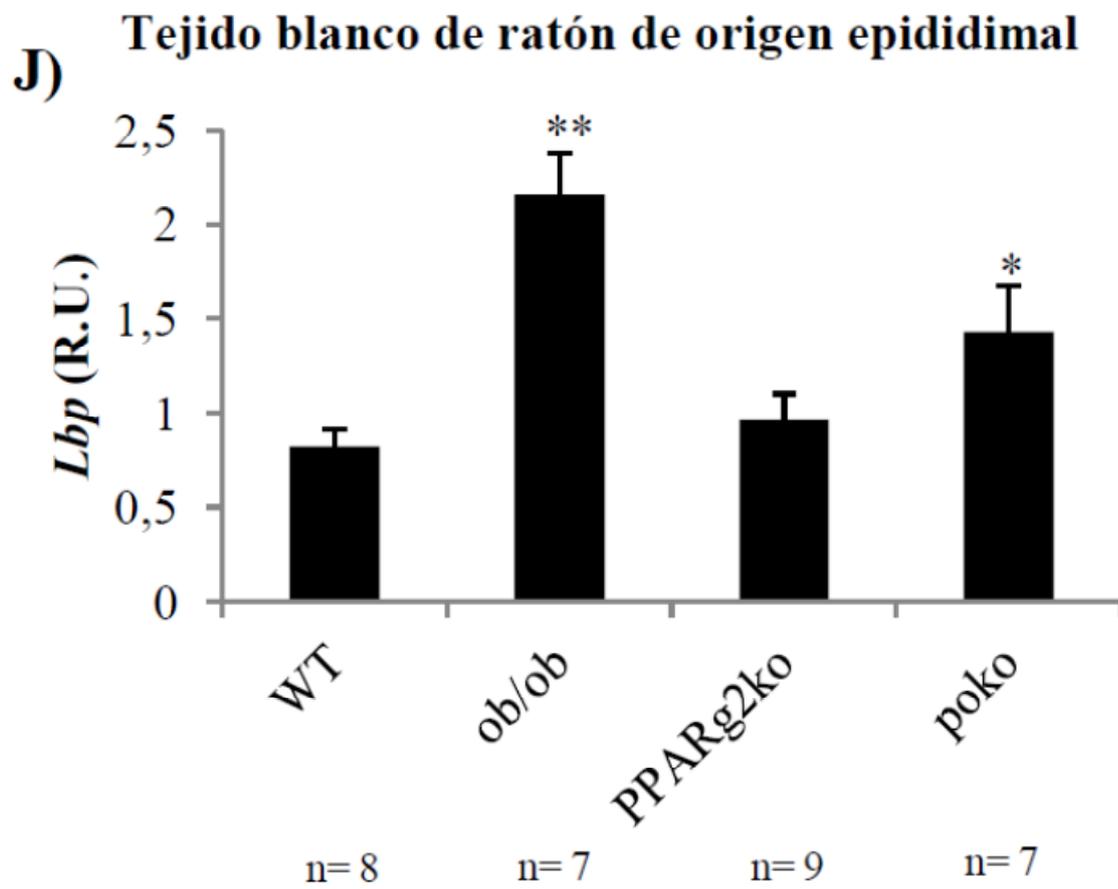
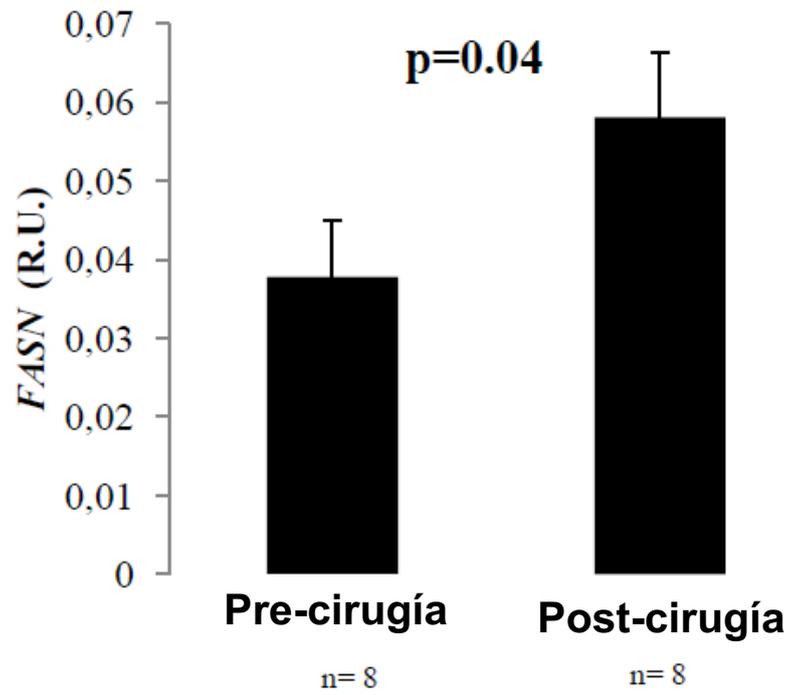


FIG. 4

A)



A')

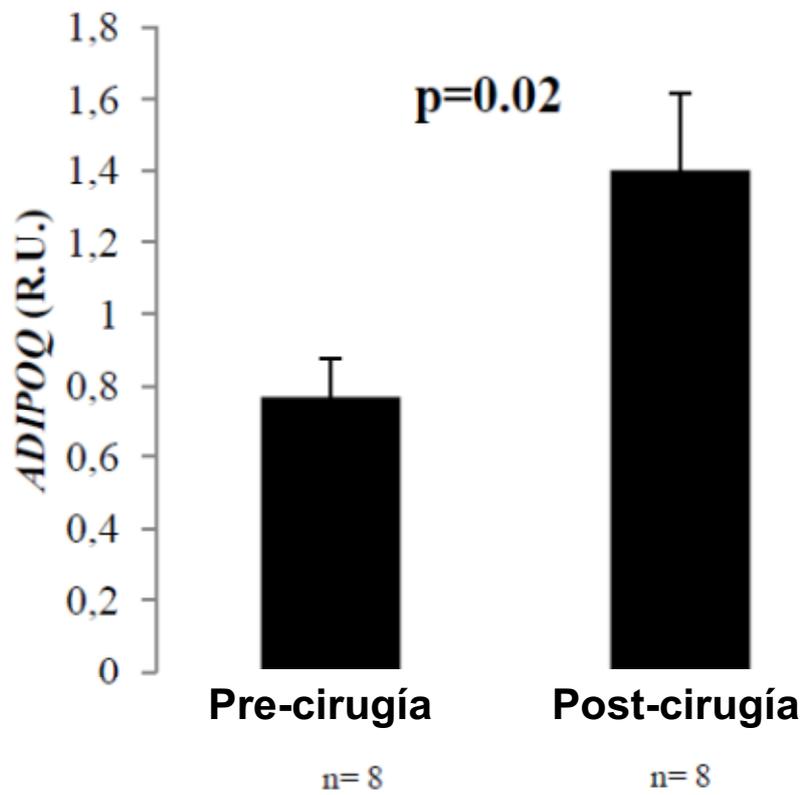


FIG. 4 (Cont.)

A<sup>II</sup>)

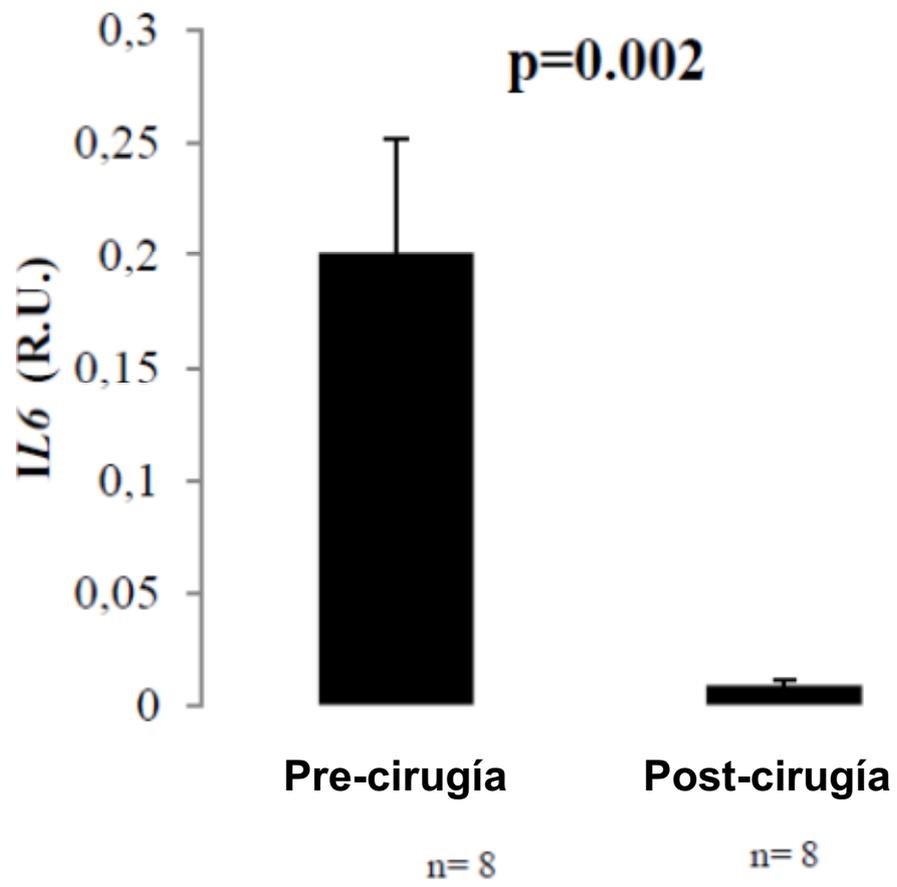


FIG. 4 (Cont.)

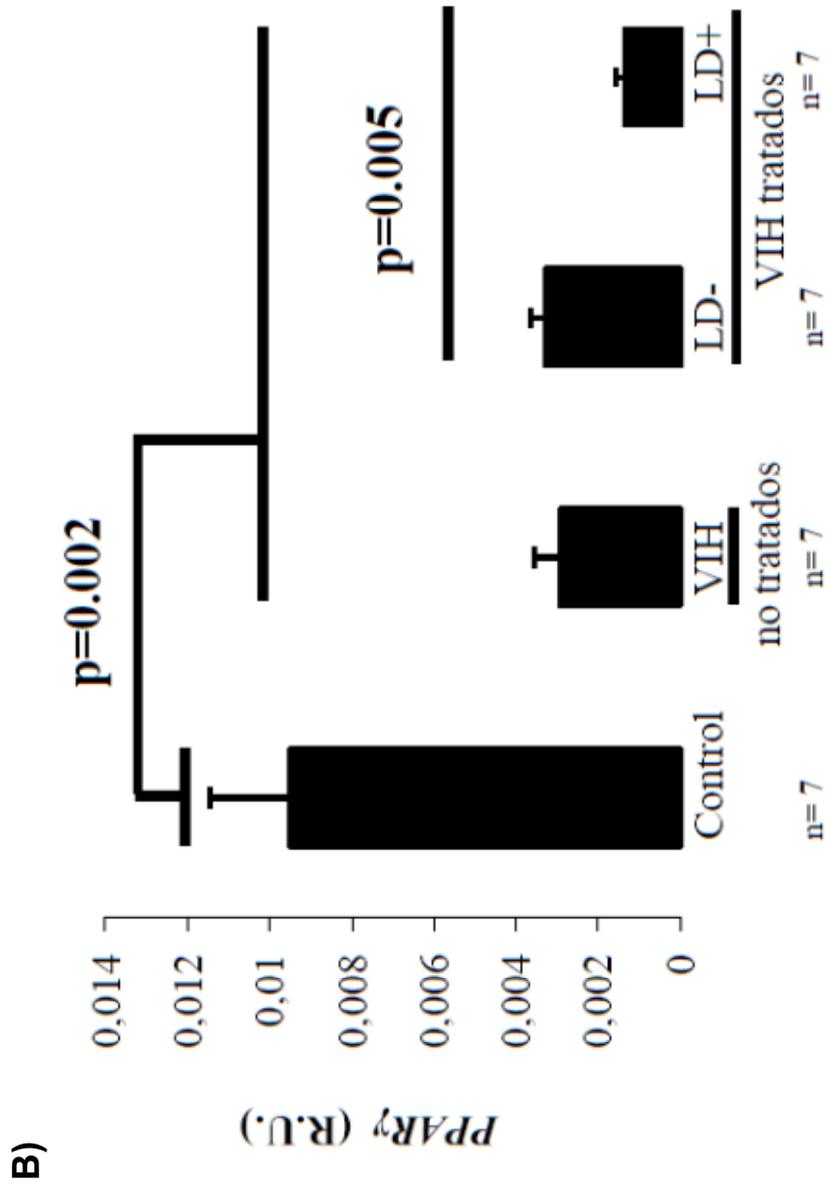


FIG. 4 (Cont.)

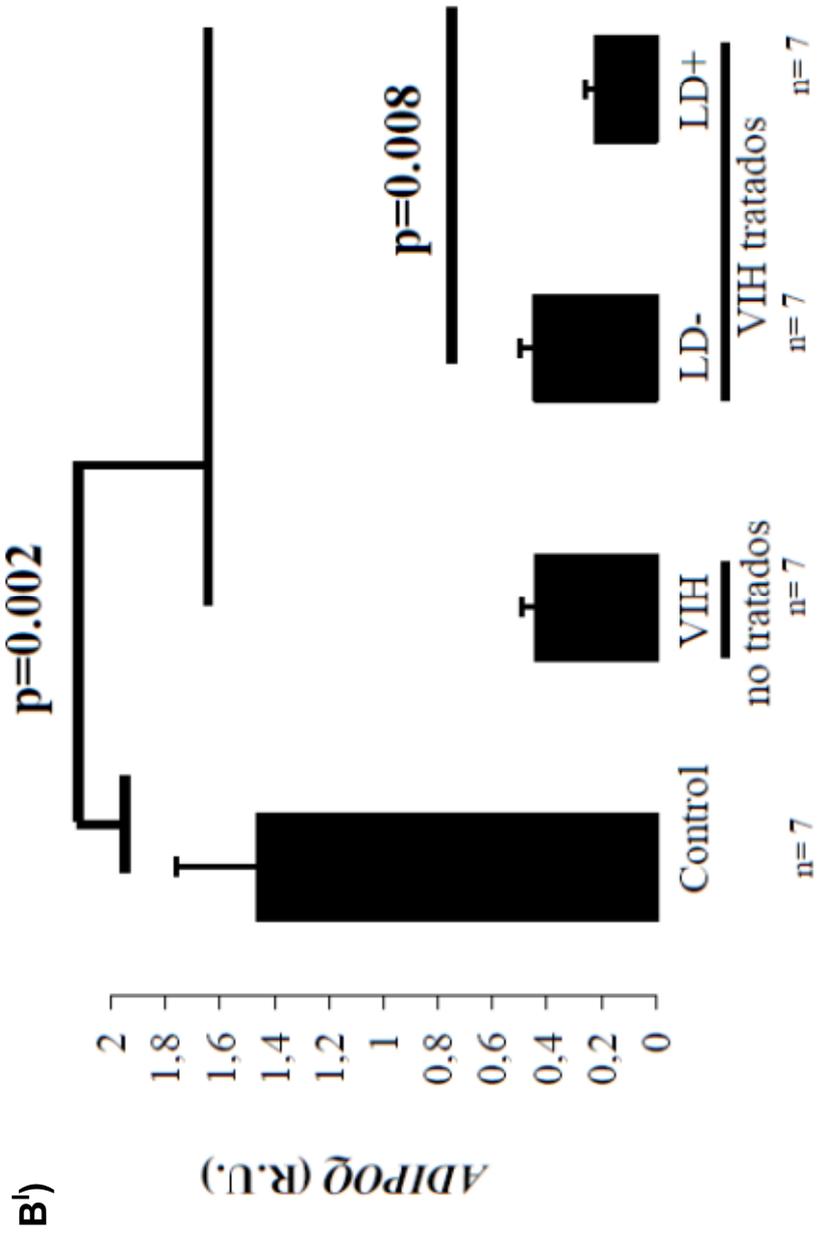
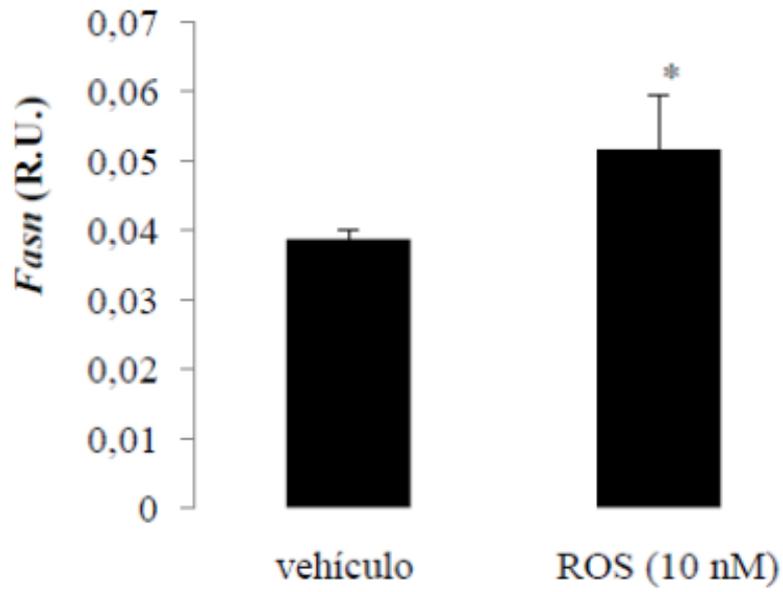


FIG. 5

**A) Células 3T3-L1**



**A')**

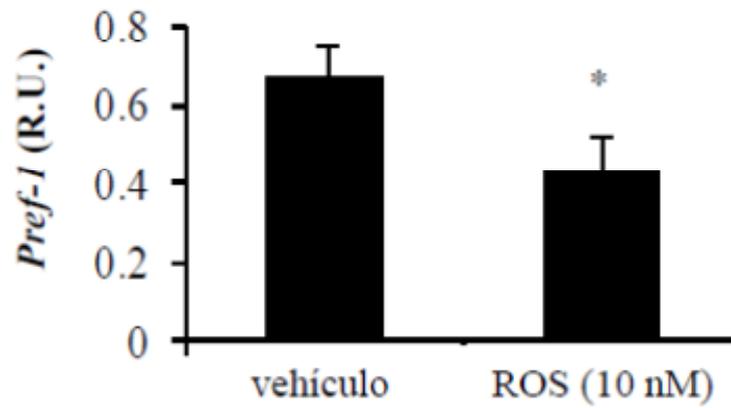
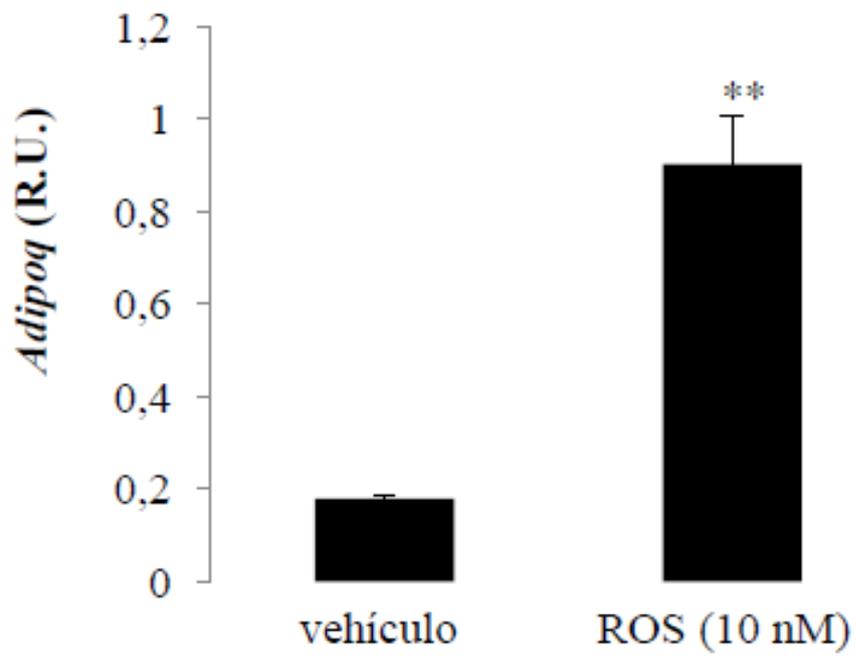


FIG. 5 (Cont.)

A<sup>ii)</sup>



A<sup>iii)</sup>

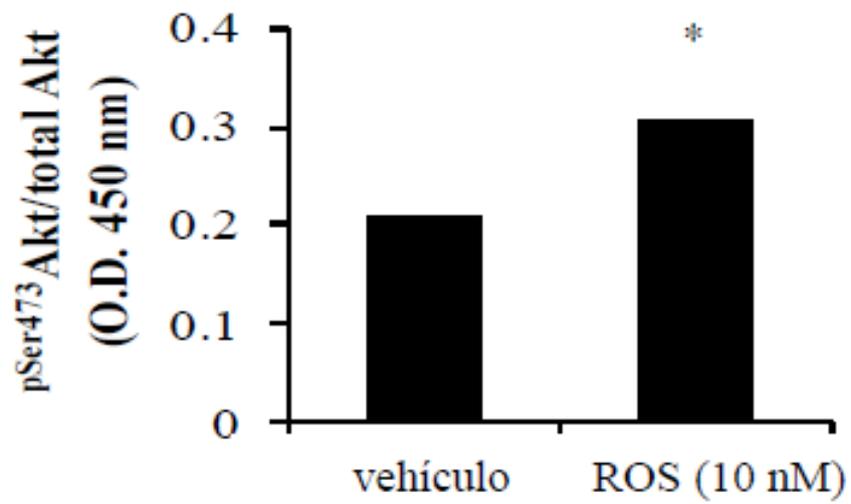


FIG. 5 (Cont.)

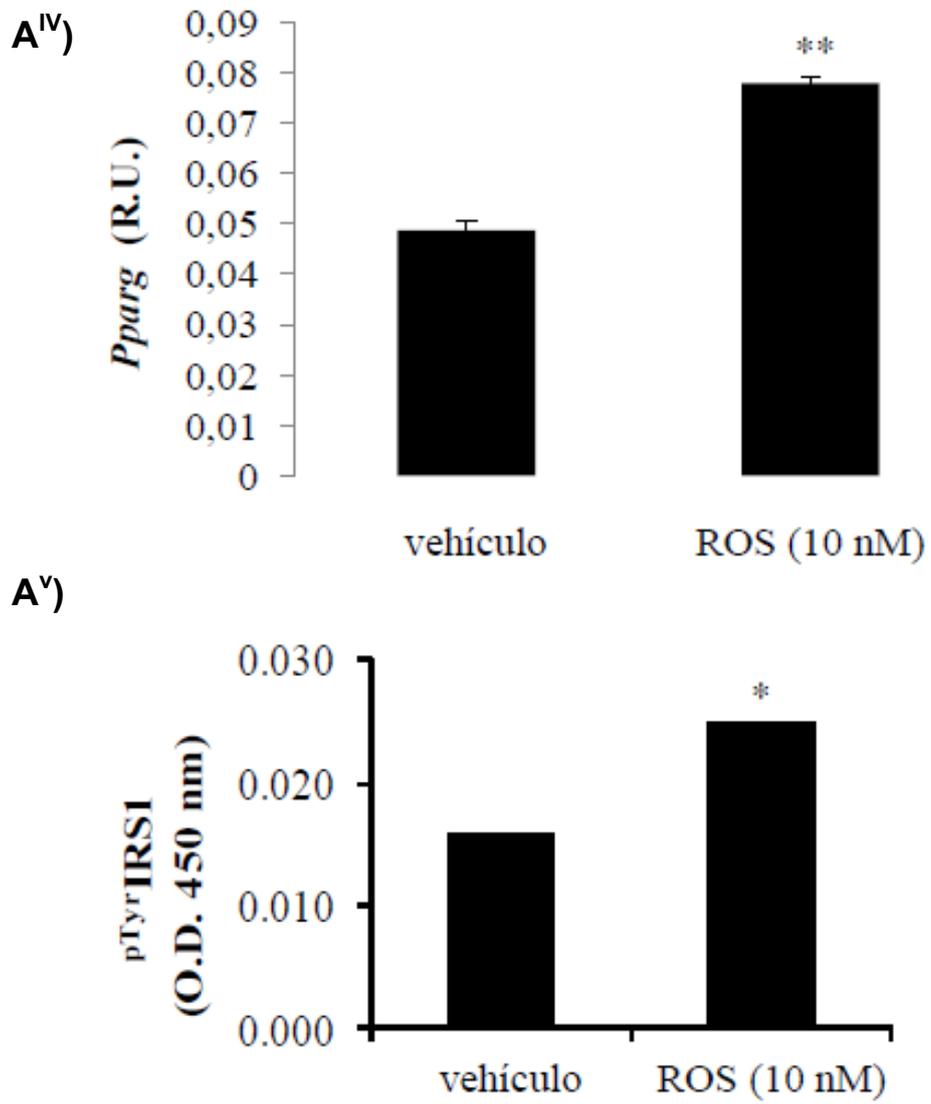


FIG. 5 (Cont.)

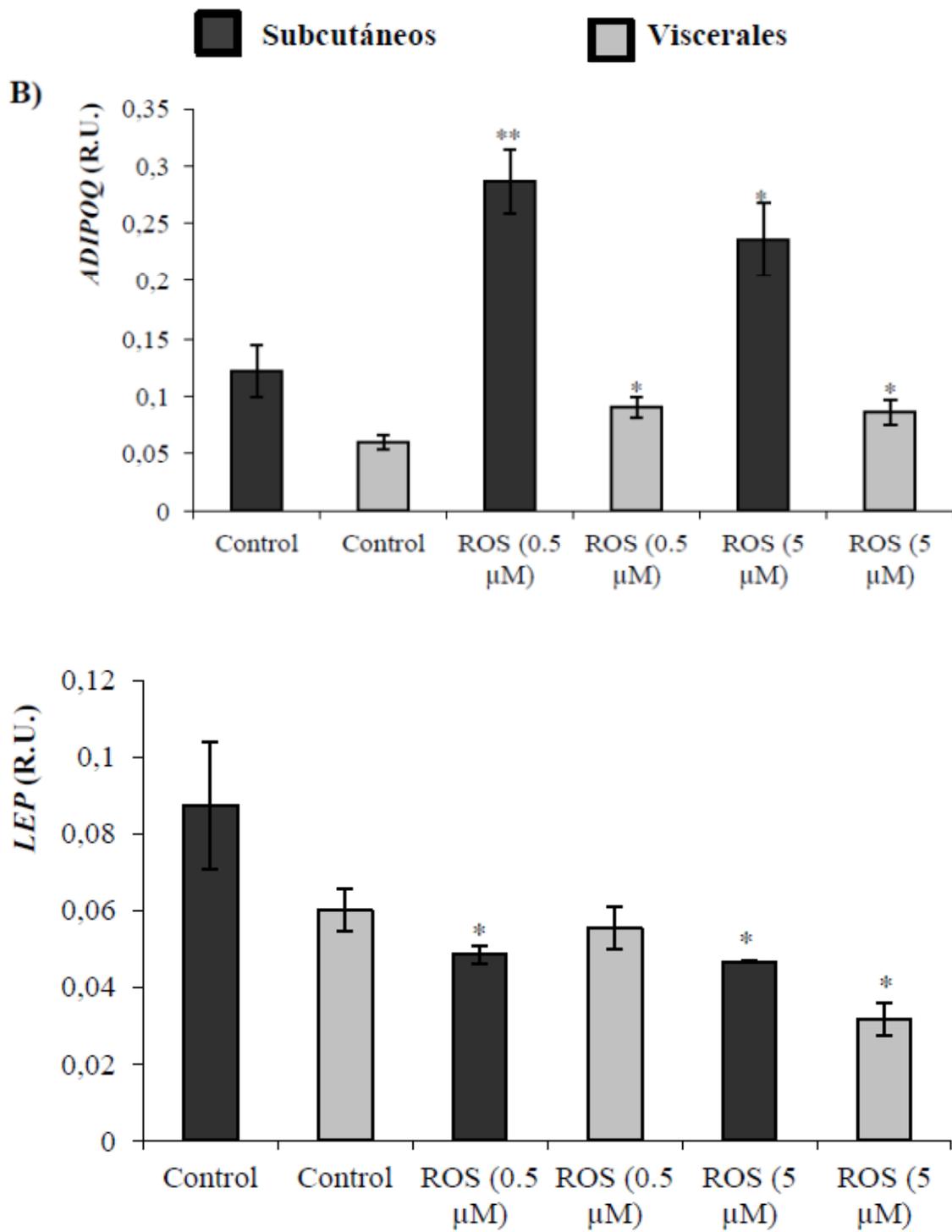


FIG. 6

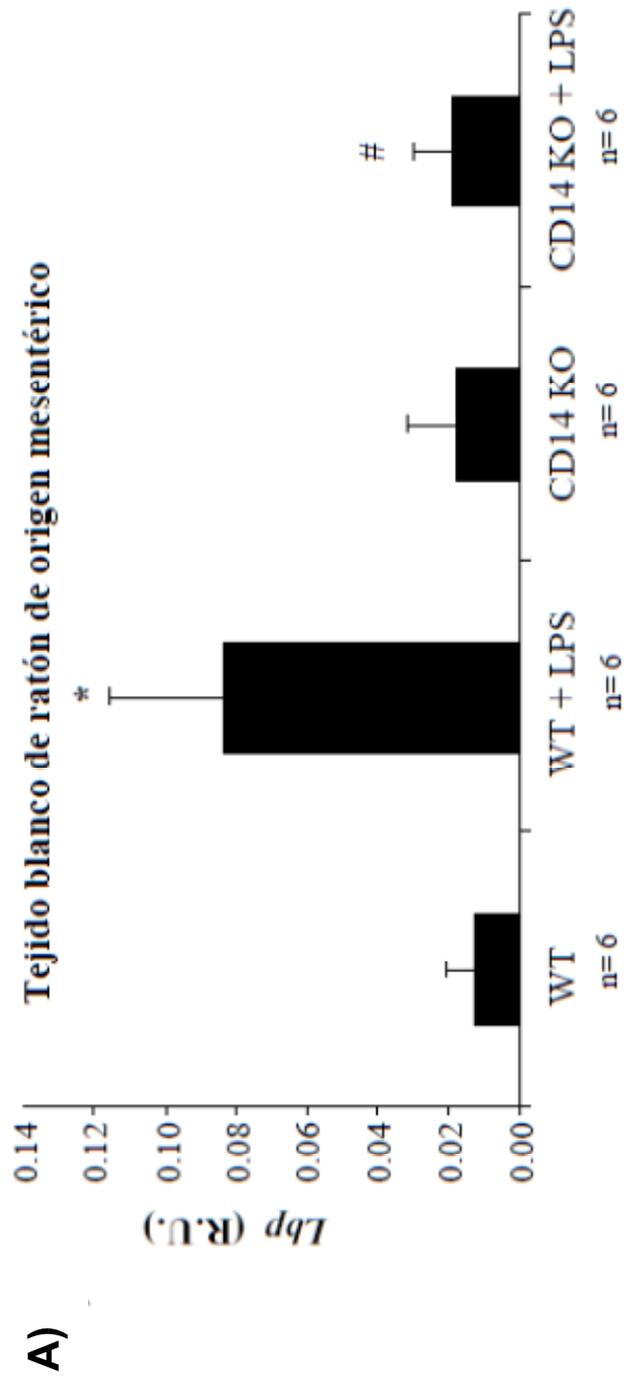


FIG. 6 (Cont.)

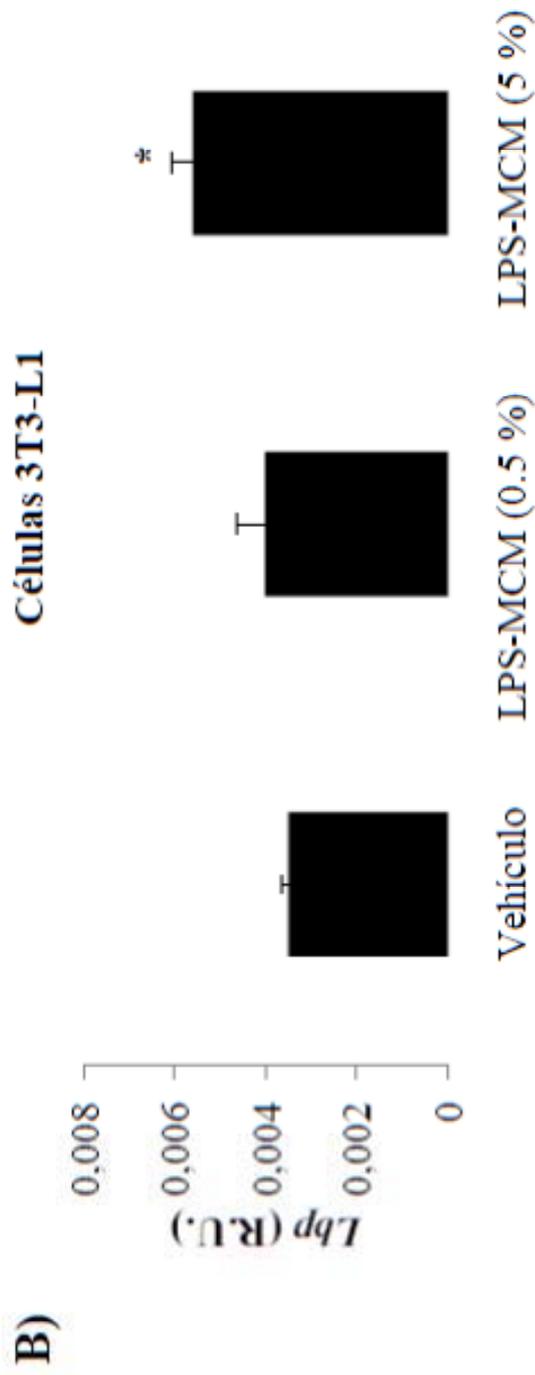


FIG. 6 (Cont.)

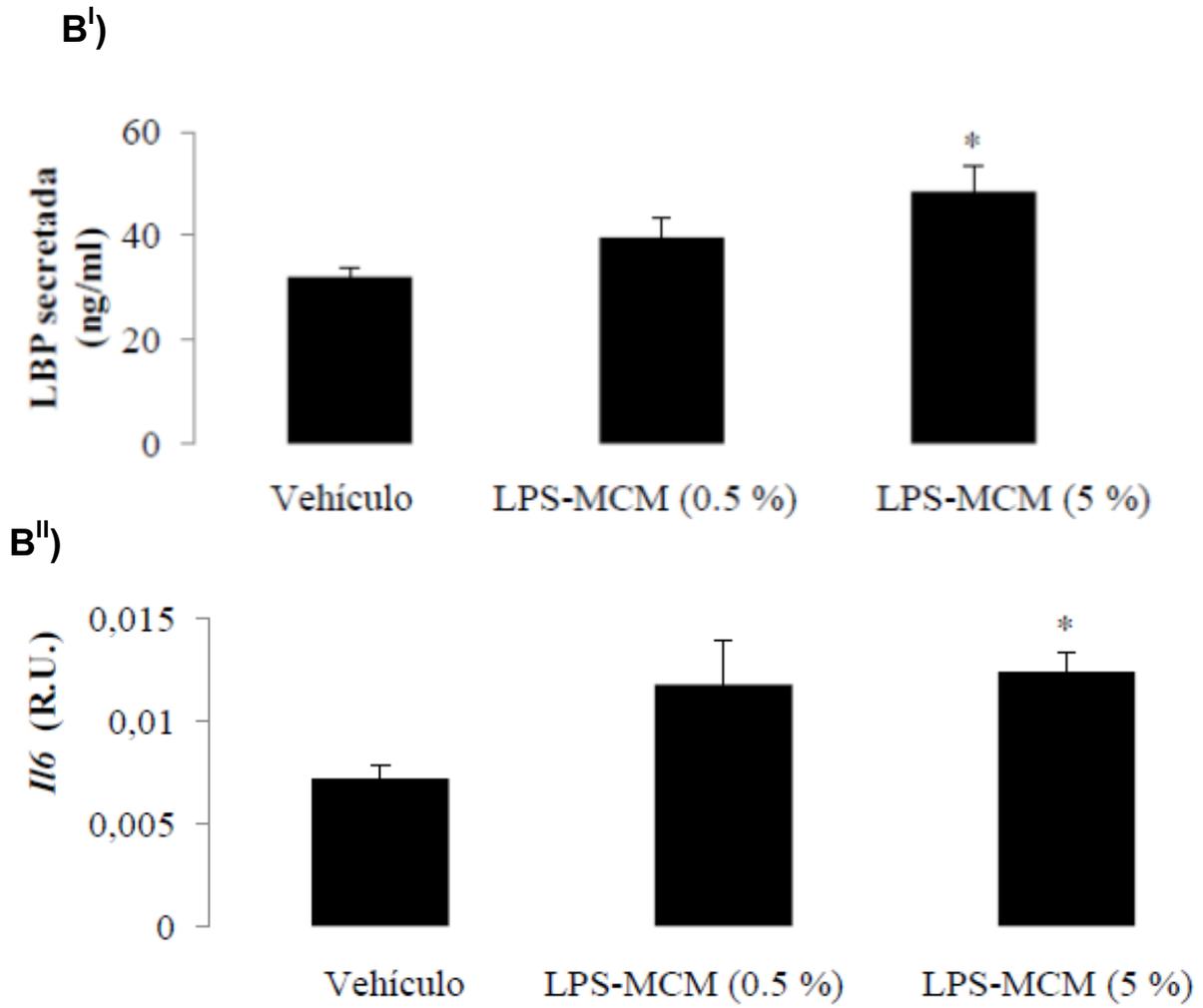


FIG. 6 (Cont.)

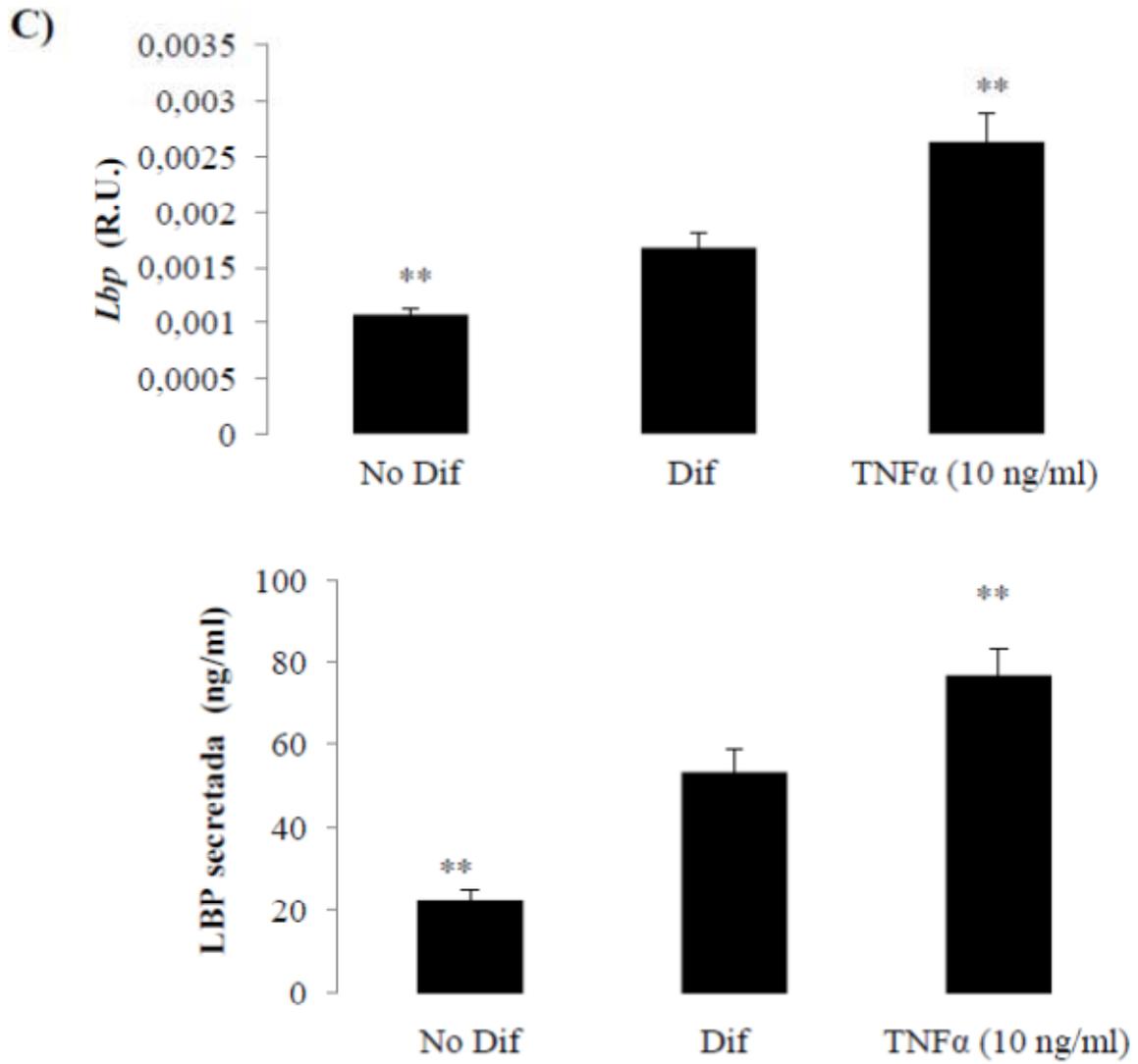


FIG. 6 (Cont.)

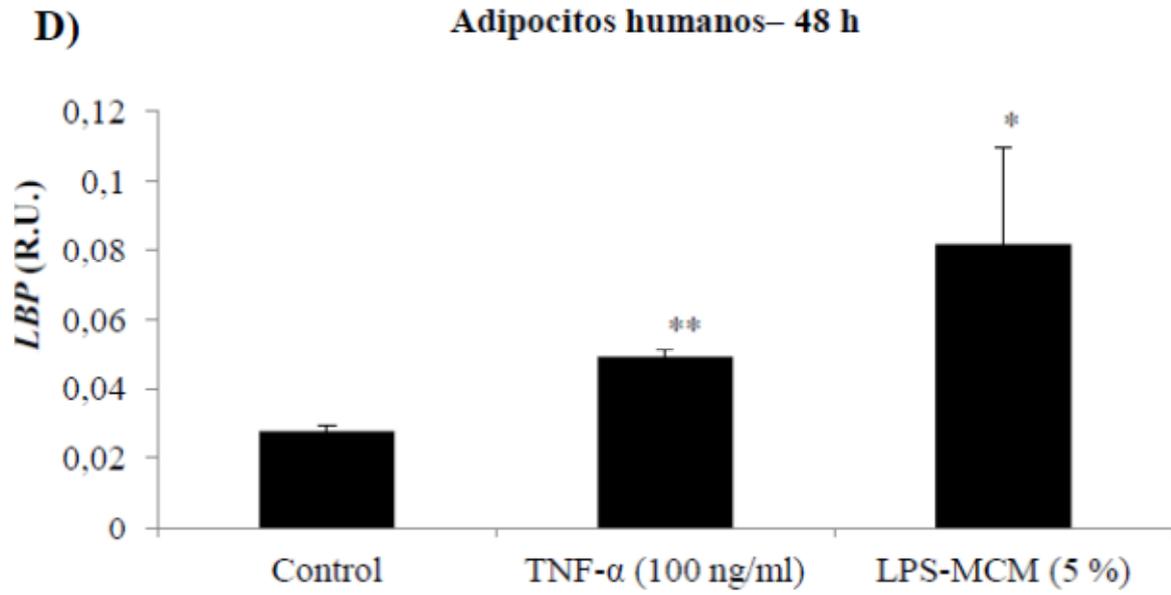


FIG. 7

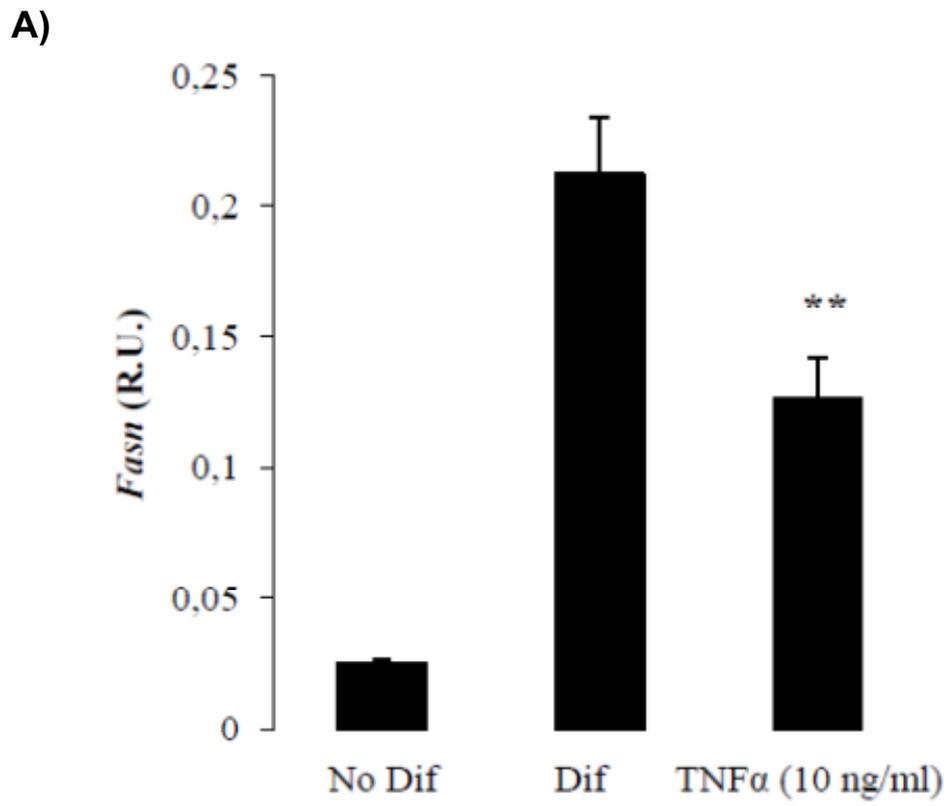


FIG. 7 (Cont.)

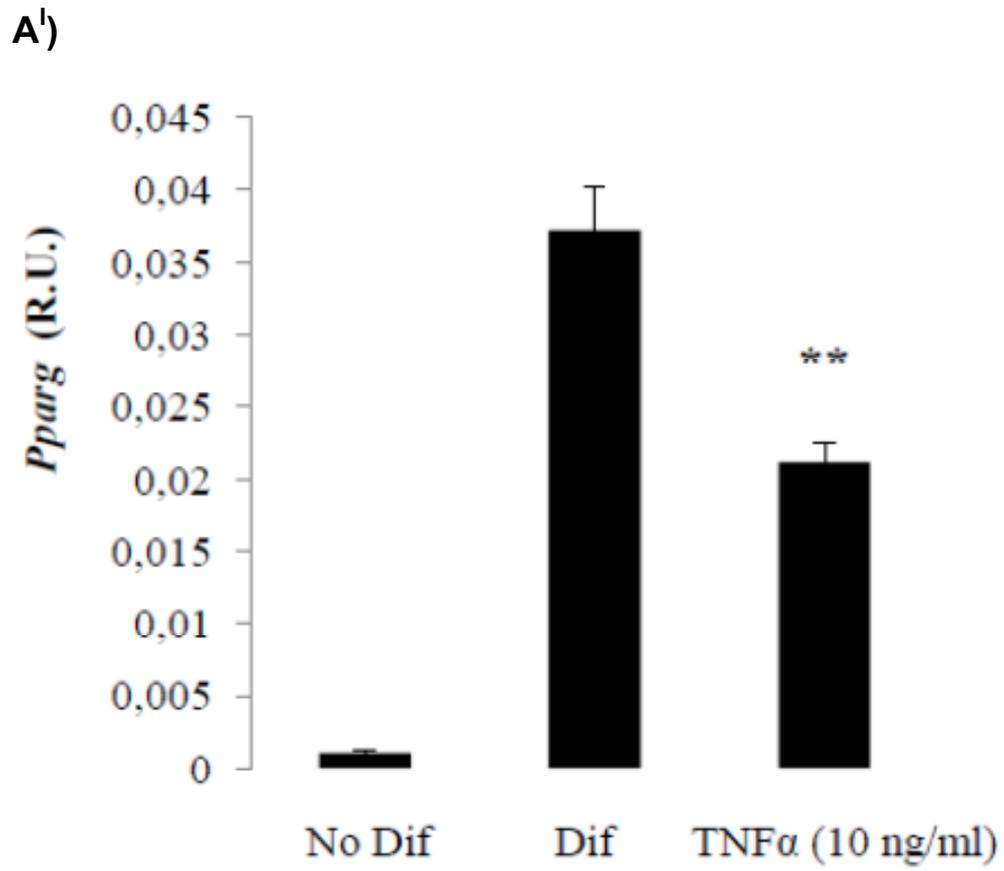


FIG. 7 (Cont.)

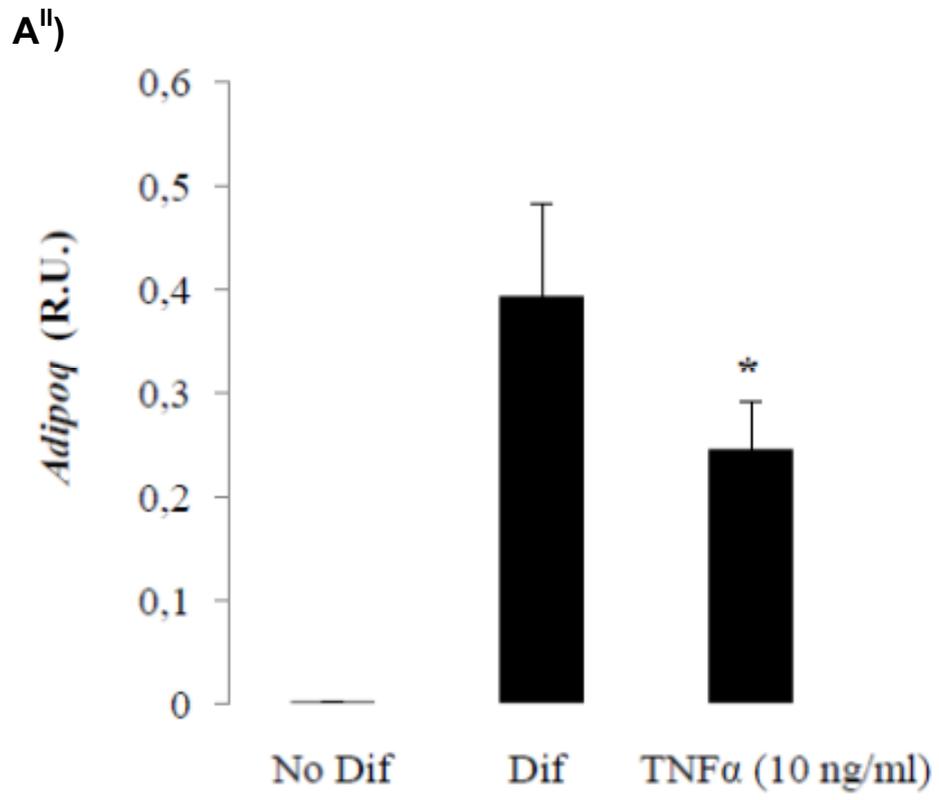


FIG. 7 (Cont.)

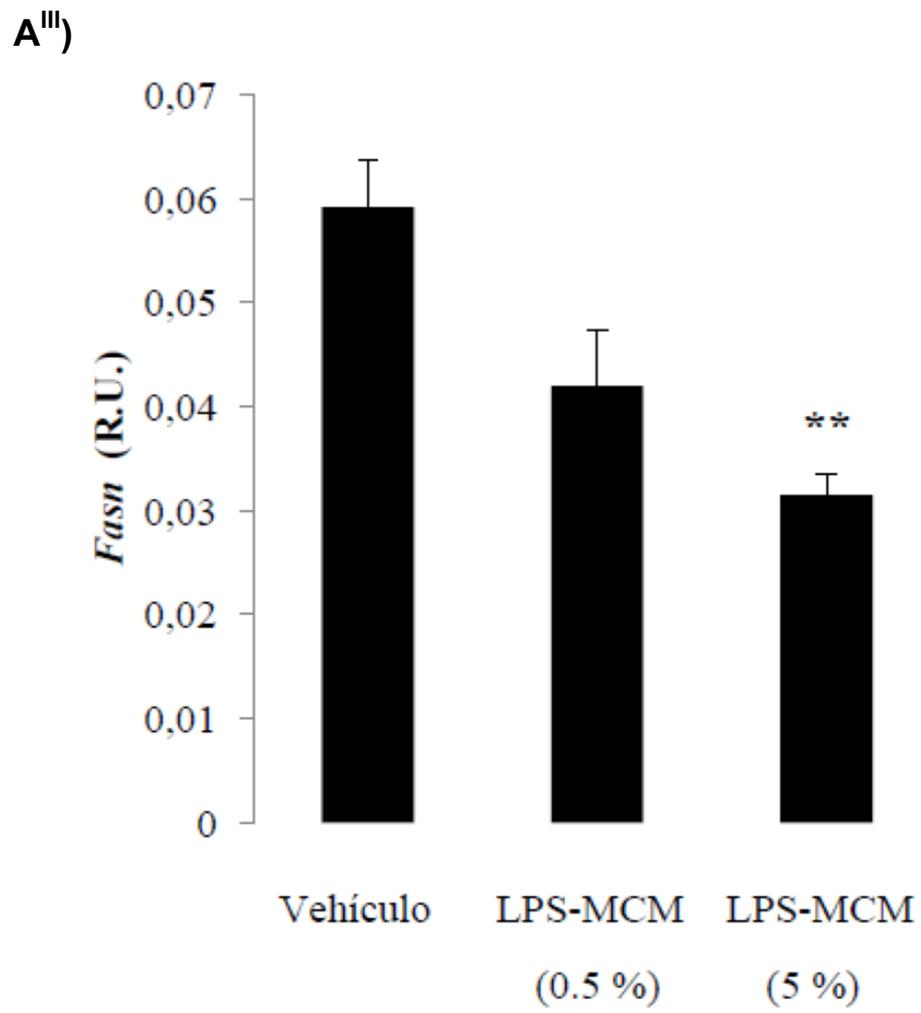


FIG. 7 (Cont.)

A<sup>IV</sup>)

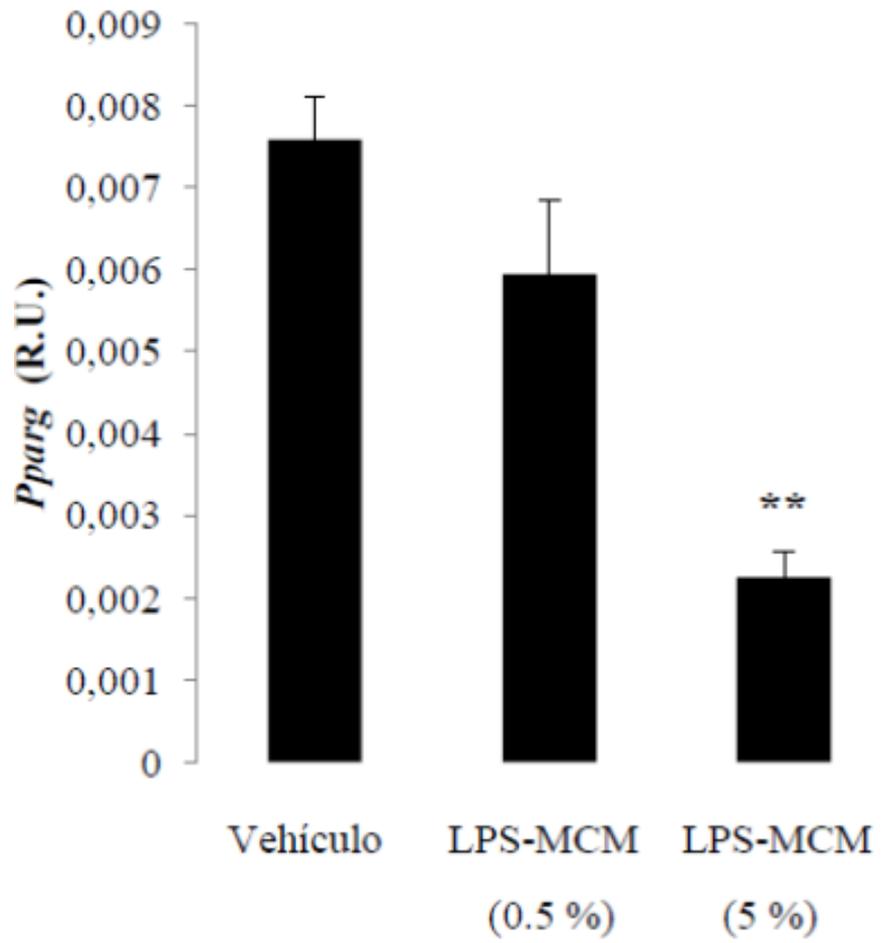


FIG. 7 (Cont.)

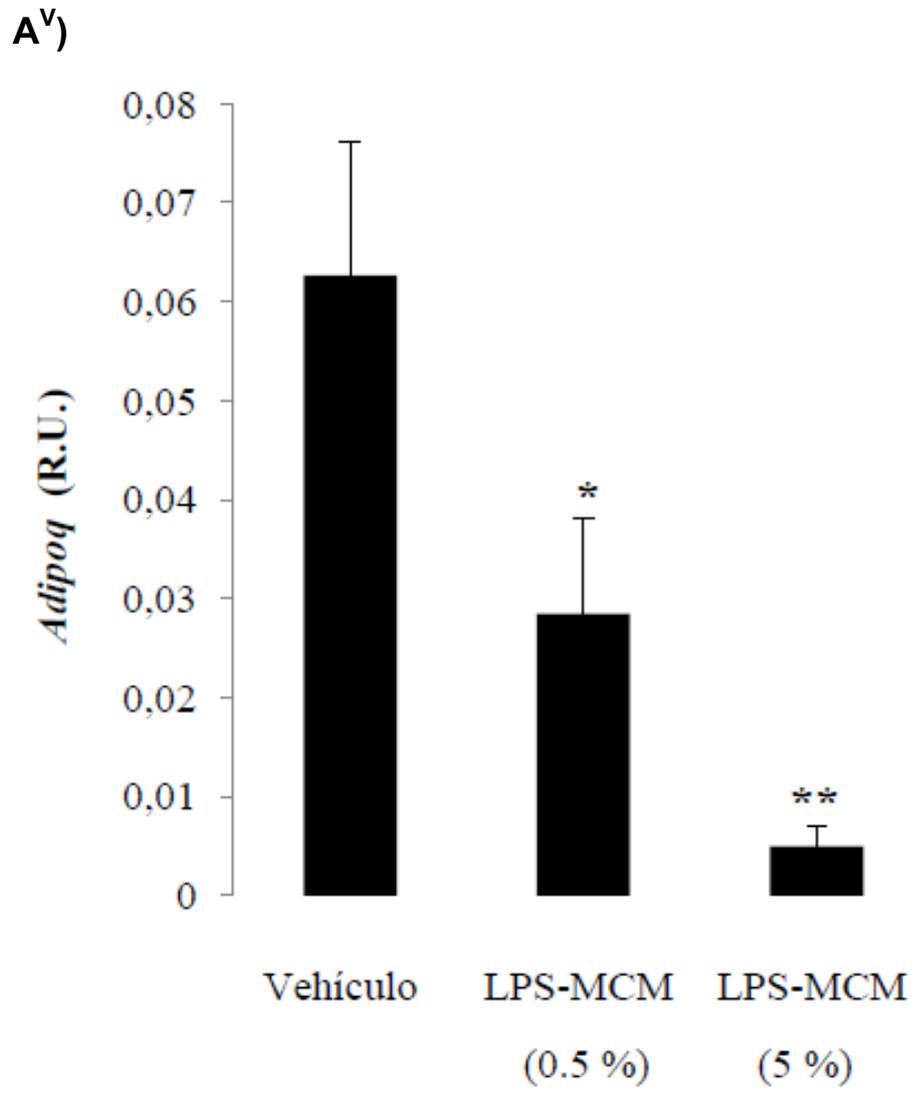


FIG. 8

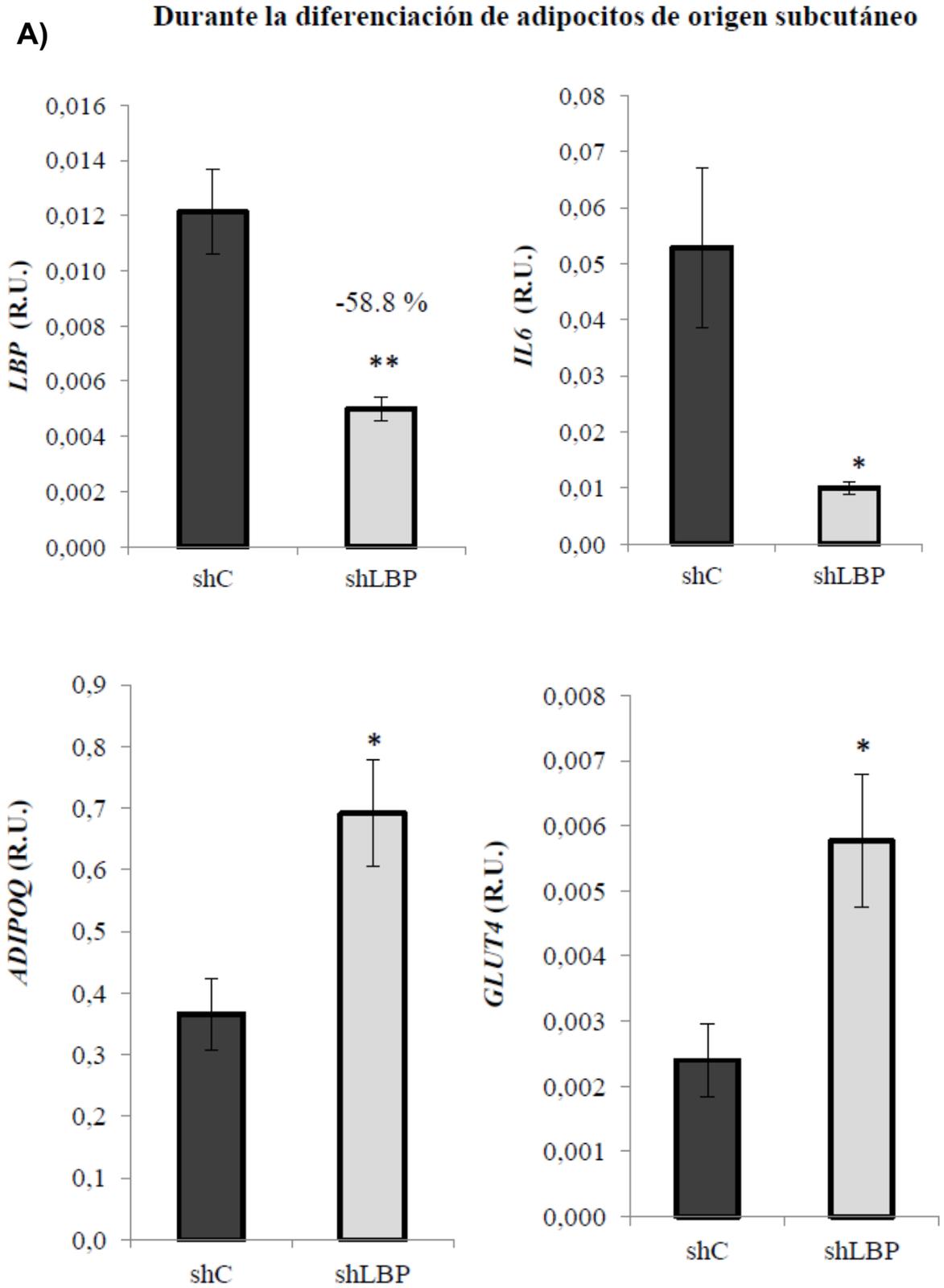


FIG. 8 (Cont.)

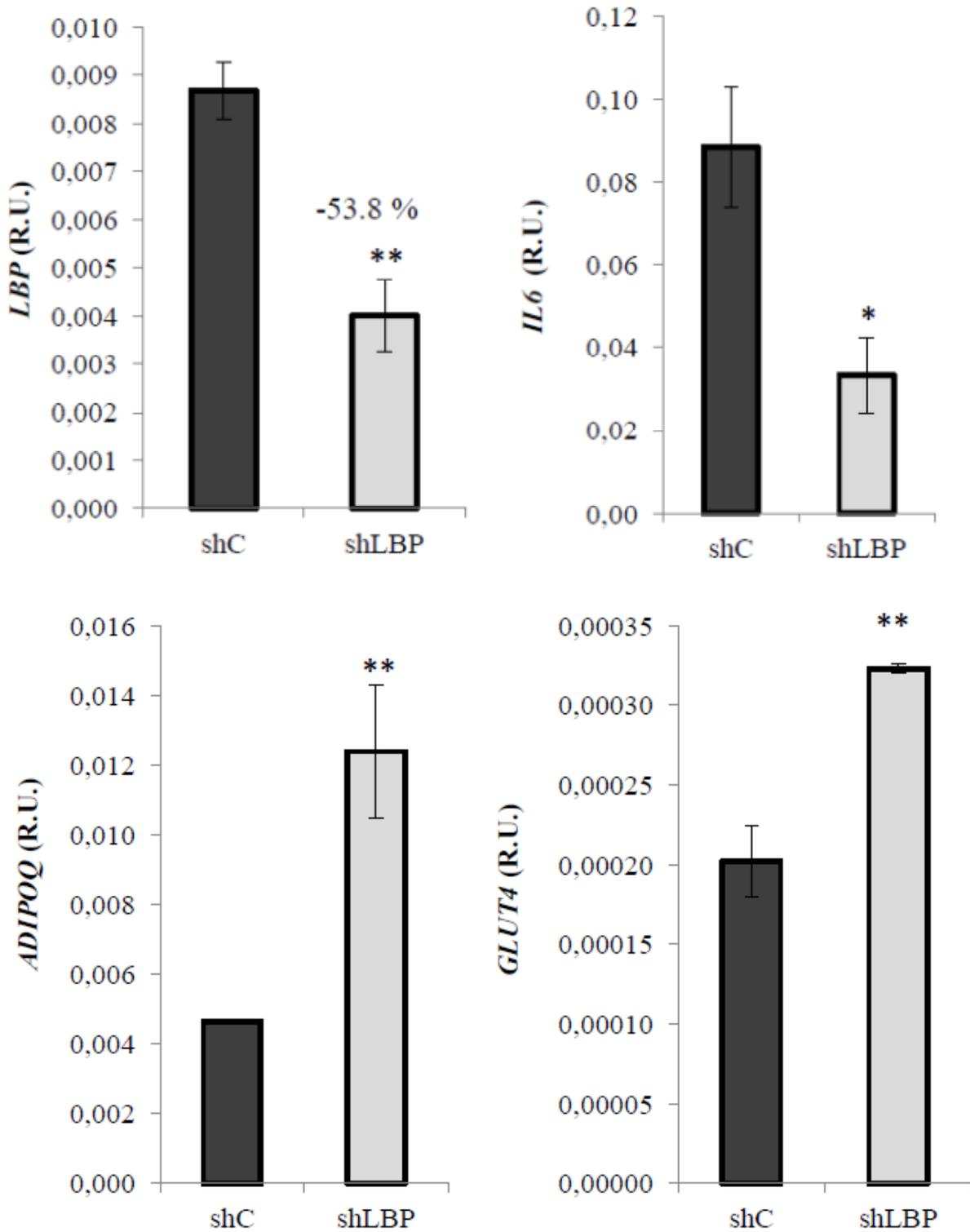
**B) Durante la diferenciación de adipocitos de origen visceral**

FIG. 9

**Adipocitos subcutáneos- 48h**

A)

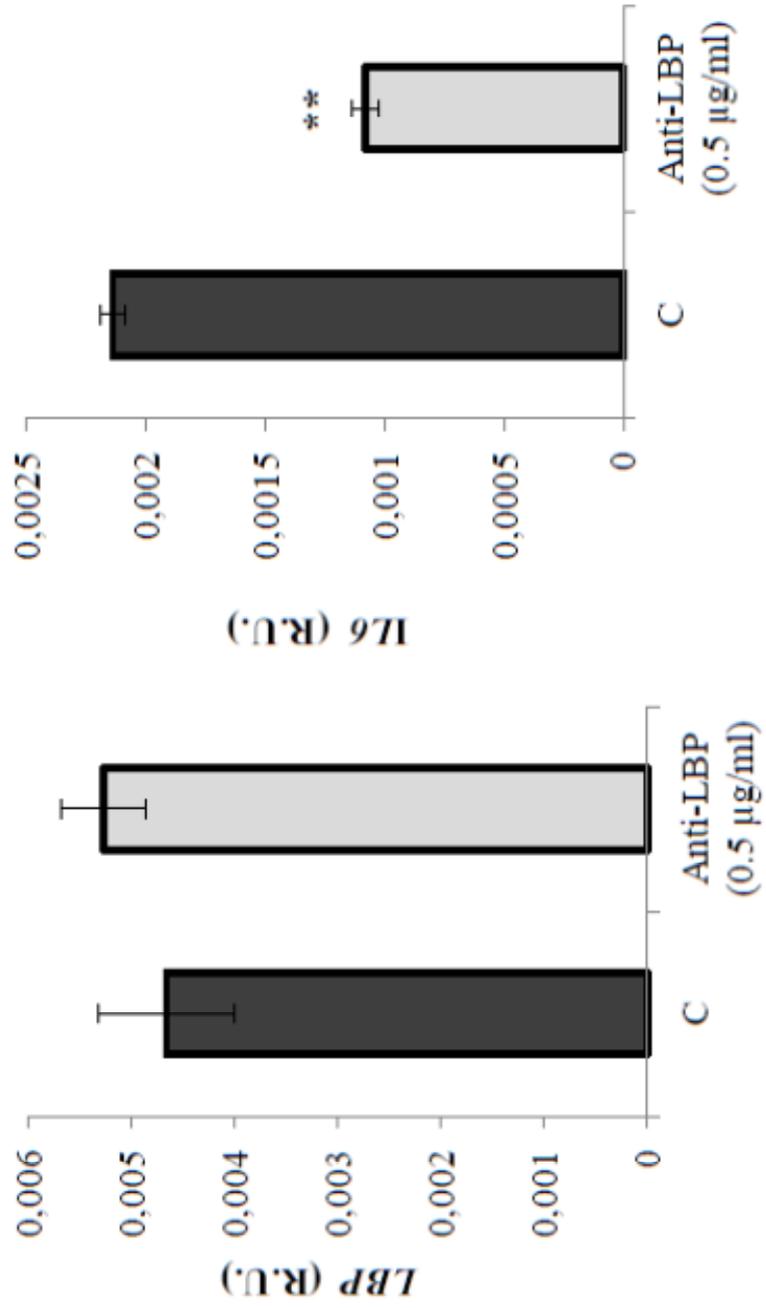
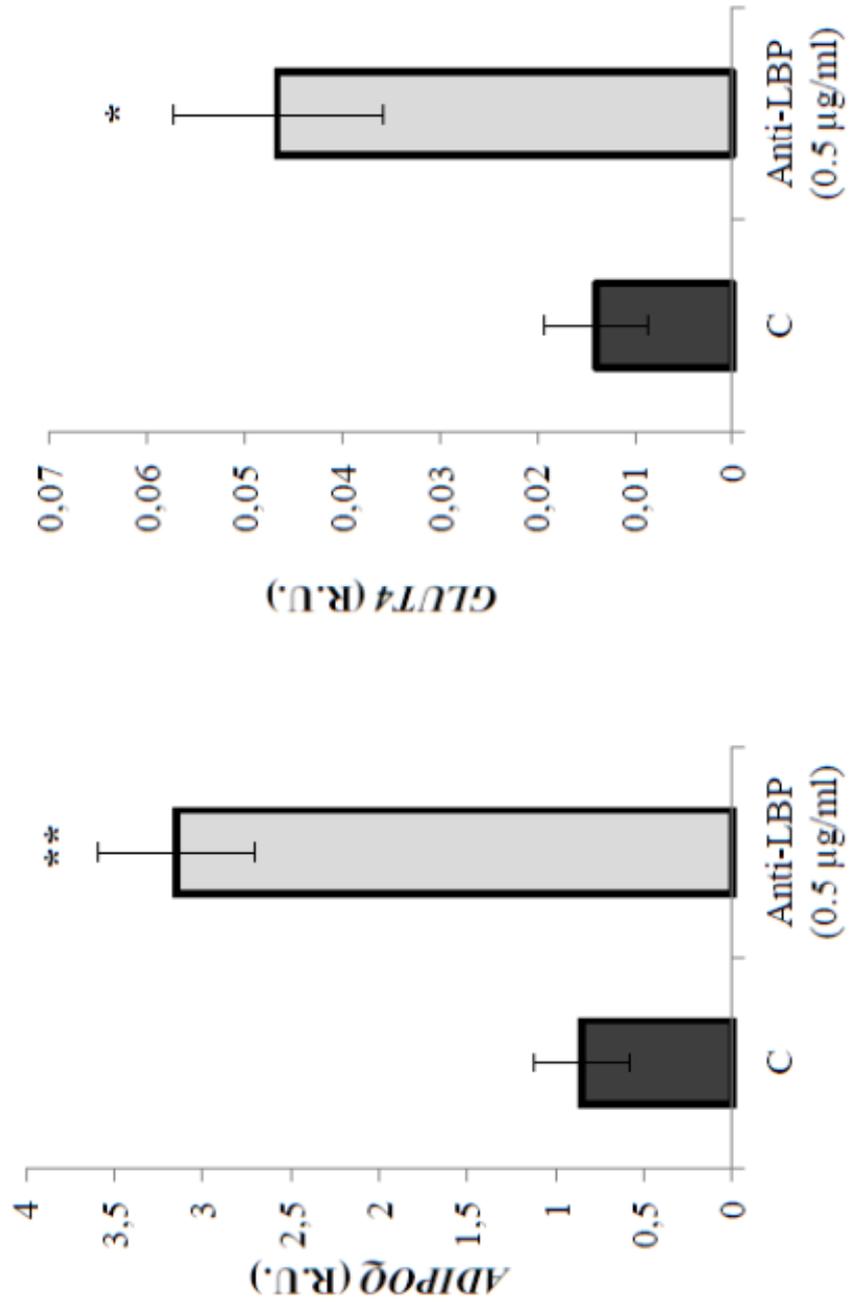


FIG. 9 (Cont.)

Adipocitos subcutáneos- 48h



A')

FIG. 9 (Cont.)

**Adipocitos viscerales- 48h**

**B)**

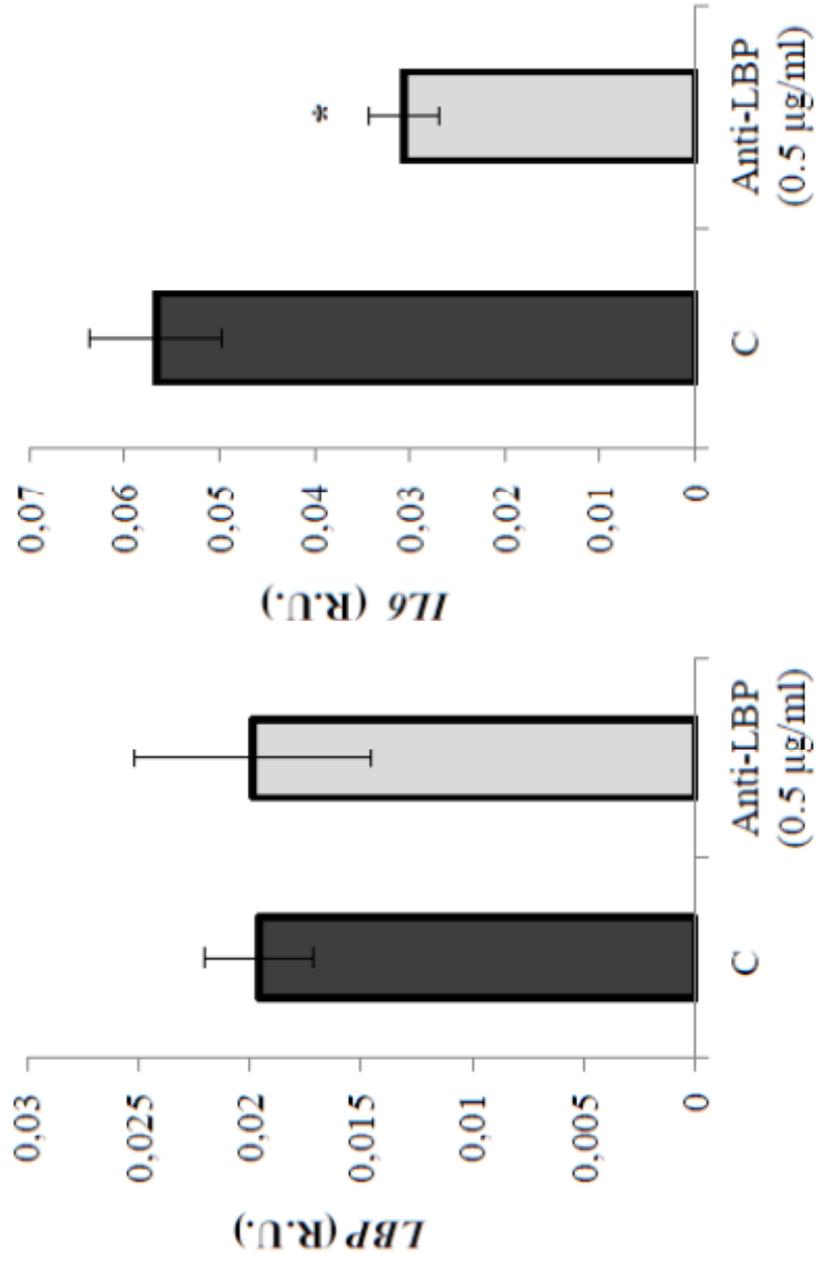
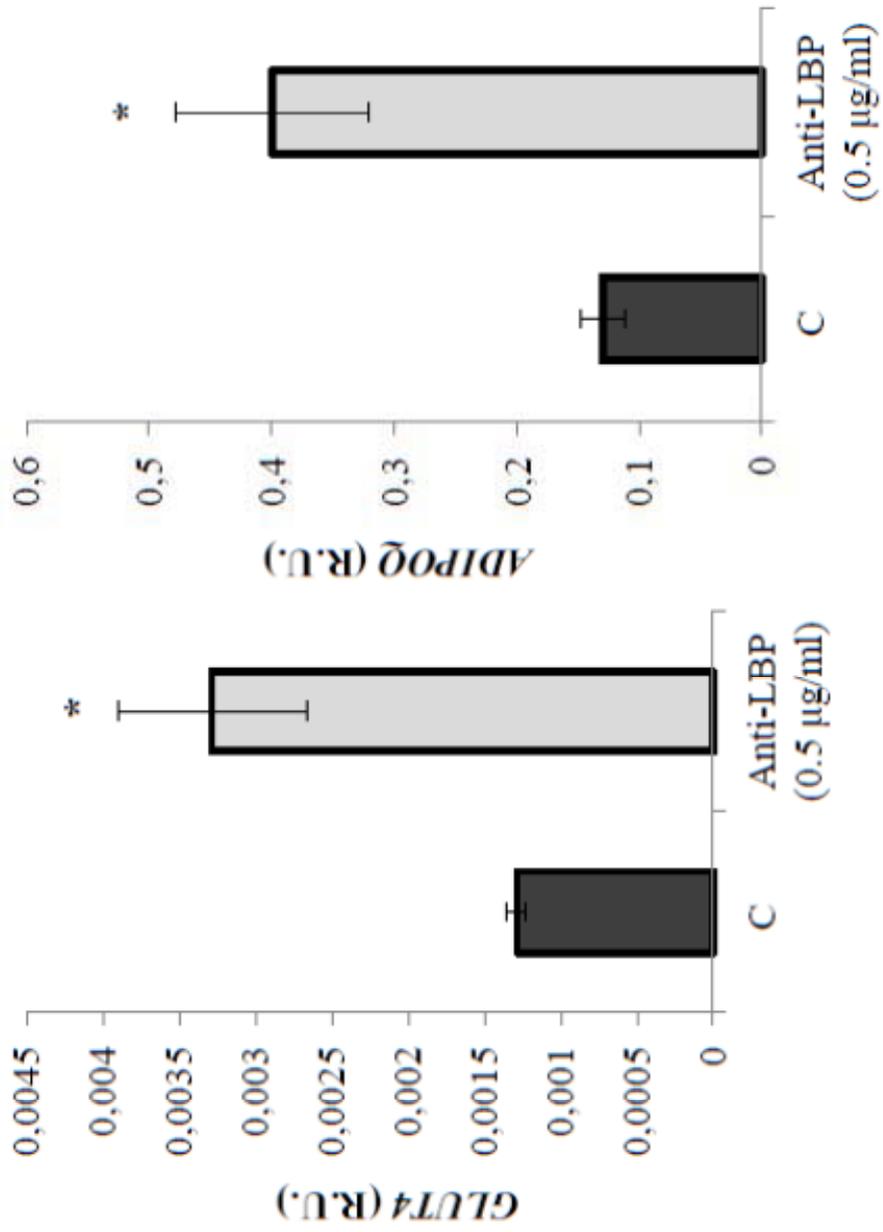


FIG. 9 (Cont.)

**Adipocitos viscerales- 48h**



B)



②① N.º solicitud: 201330998

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.07.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GE Q et al. MicroRNAs regulated by adiponectin as novel targets for controlling adipose tissue inflammation. Endocrinology 2012;110(1) Endocrine Society USA 01/11/2012 VOL: 153 No: 11 Pags: 5285 - 5296 ISSN 0013-7227 (print) ISSN 1945-7170 (electronic) Doi: doi:10.1210/en.2012-1623	1, 3, 6.
X	US 5753504 A (KIRKLAND THEO et al.) 19/05/1998, reivindicaciones.	4, 5.
Y		2
Y	GONZALEZ-QUINTELA ARTURO et al. Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. PLoS one United States 2013 00/00/2013 VOL: 8 No: 1 Pags: e54600 ISSN 1932-6203 (Electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0054600 pubmed:23349936	2
A	SUN LIANG et al. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. Diabetes care United States Sep 2010 00/09/2010 VOL: 33 No: 9 Pags: 1925 - 1932 ISSN 1935-5548 (Electronic) Doi: doi:10.2337/dc10-0340 pubmed:20530747	2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.12.2014

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/5



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201330998  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.07.2013  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LIANG HANYU et al. Effect of Lipopolysaccharide on Inflammation and Insulin Action in Human Muscle. PLoS One MAY 21 2013 00/05/2013 VOL: 8 No: 5 Pags: Article No.: e63983 ISSN 1932-6203 Doi: doi:10.1371/journal.pone.0063983	2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.12.2014

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
2/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K16/28** (2006.01)

**A61K39/395** (2006.01)

**A61P3/04** (2006.01)

**C07K16/18** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.12.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2,3,5,6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GE Q et al. MicroRNAs regulated by adiponectin as novel targets for controlling adipose tissue inflammation. <i>Endocrinology</i> . 2012;1101. Endocrine Society USA 01/11/2012 VOL: 153. No: 11 Pags: 5285 - 5296 ISSN 0013-7227 (print) ISSN 1945-7170 (electronic) Doi: doi:10.1210/en.2012-1623	01.11.2012
D02	US 5753504 A (KIRKLAND THEO et al.)	19.05.1998
D03	GONZALEZ-QUINTELA ARTURO et al. Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. <i>PloS one United States</i> 2013 00/00/2013 VOL: 8 No: 1 Pags: e54600 ISSN 1932-6203 (Electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0054600 pubmed:23349936	30.11.2012
D04	SUN LIANG et al. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. <i>Diabetes care United States</i> Sep 2010 00/09/2010 VOL: 33 No: 9 Pags: 1925 - 1932 ISSN 1935-5548 (Electronic) Doi: doi:10.2337/dc10-0340 pubmed:20530747	31.08.2010
D05	LIANG HANYU et al. Effect of Lipopolysaccharide on Inflammation and Insulin Action in Human Muscle. <i>PLoS One</i> MAY 21 2013 00/05/2013 VOL: 8 No: 5 Pags: Article No.: e63983 ISSN 1932-6203 Doi: doi:10.1371/journal.pone.0063983	30.04.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga el uso de un anticuerpo o de un ARN de silenciamiento contra la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) para el tratamiento y/o prevención de un trastorno metabólico asociados a la obesidad.

Las reivindicaciones 1,2 hacen referencia al uso de un anticuerpo contra LBP, la reivindicación 3 al uso de un ARN de silenciamiento frente a LBP, las reivindicaciones 4, 5 a una composición que comprende un anticuerpo anti-LBP, y la reivindicación 6 una composición que comprende un ARN de silenciamiento.

D01 divulga el uso de un micro ARN para controlar la inflamación en el tejido adiposo y en concreto divulga el uso del micro ARN miR883b-5p.

D02 divulga un anticuerpo monoclonal anti-LBP.

D03-D05 divulgan distintos estudios donde se demuestra la relación entre concentraciones séricas de LBP y la existencia de sobrepeso u obesidad.

El objeto de la invención divulgado en la reivindicación 4 no cumpliría con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986, puesto que ya está comprendido en el documento D02. La diferencia entre el objeto de la reivindicación 5 y el documento D02 sería el anticuerpo denominado como "Ab biG 33". Sin embargo, para el experto en la materia no supondría esfuerzo inventivo alguno la provisión de anticuerpos monoclonales contra la proteína LBP adicionales a los ya divulgados, por lo que esta reivindicación carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986. El mismo razonamiento se aplicaría a la reivindicación 6

La diferencia entre el objeto de la reivindicación 1 y los documentos del estado de la técnica más cercanos al objeto de la invención, en este caso D01 y D02, sería el uso de los compuestos que aparecen en dicha reivindicación para el tratamiento o prevención de un trastorno metabólico asociado a la obesidad. Sin embargo en la presente solicitud no aparecen datos que permitan extender tal efecto terapéutico a todos los posibles compuestos a los que alcanza el objeto de la reivindicación 1, por lo que tal reivindicación en su totalidad no supondría una contribución al estado de la técnica, y por tanto no supondrían una solución al problema planteado por la presente reivindicación que sería la provisión de ARNs de silenciamiento y anticuerpos anti LBP para la prevención de ese trastorno. Así pues, la reivindicación 1 carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley.

Dado que el experto en la materia conoce que existe una relación estadísticamente significativa entre los niveles de LBP y la aparición de la obesidad, sería obvio intentar sintetizar anticuerpos monoclonales contra esta proteína o utilizar ARN de silenciamiento para regular su expresión, teniendo altas probabilidades de éxito de conseguirlo. Así pues, la reivindicación 2 que tiene como objeto el uso de un anticuerpo monoclonal específico como es el "Ab biG 33" para la prevención de un trastorno metabólico asociado a la obesidad carecería de actividad inventiva, según el art. 8 de la ley.