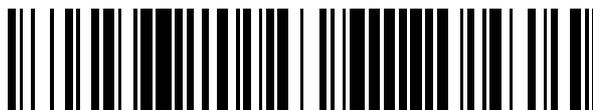


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 737**

51 Int. Cl.:

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 3/08** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10707783 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2403605**

54 Título: **Composiciones que comprenden un anticuerpo específico de aP2 o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento de la diabetes, intolerancia a la glucosa o insulinoresistencia inducida por obesidad**

30 Prioridad:

**28.01.2010 US 299170 P**

**05.03.2009 US 209251 P**

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

**11.08.2015**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (100.0%)**

**17 Quincy Street  
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**HOTAMISLIGIL, GOKHAN, S. y  
CAO, HAIMING**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 542 737 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden un anticuerpo específico de aP2 o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento de la diabetes, intolerancia a la glucosa o insulinoresistencia inducida por obesidad.

**Antecedentes de la invención**

La expresión síndrome metabólico o enfermedad metabólica define un grupo de factores de riesgo metabólicos que se reúne en un solo individuo y conducen a la diabetes y a enfermedad cardiovascular. Las principales características del síndrome metabólico incluyen insulinoresistencia, hipertensión (presión arterial alta), anomalías del colesterol y un riesgo aumentado de coagulación. La insulinoresistencia se refiere a la capacidad disminuida de las células para responder a la acción de la insulina en promover el transporte de la glucosa del azúcar, de la sangre hacia el interior de los músculos y otros tejidos. En la mayoría de los casos, los pacientes con este grupo de factores de riesgo tienen sobrepeso o son obesos.

**Sumario de la invención**

La invención se basa en el descubrimiento de que la aP2 en suero regula la sensibilidad sistémica a la insulina y el metabolismo de la glucosa. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo específico de aP2 o un fragmento de unión a antígeno de aP2 del mismo, para su uso en un método de tratamiento de la diabetes o

reducción de la intolerancia a la glucosa o

reducción de la insulinoresistencia inducida por obesidad,

comprendiendo el método administrar la composición a un sujeto y en el que la administración de la composición al sujeto reduce la concentración de aP2 en suero. En el presente documento se describe el tratamiento de un síntoma de enfermedad metabólica administrando al sujeto una composición que se une a aP2 y la bloquea en la circulación (por ejemplo, aP2 en sangre o en suero), administrando una composición que se une a y reduce la cantidad de la proteína aP2 en la circulación. Por ejemplo, la intolerancia a la glucosa se reduce tras la administración de dicho inhibidor. Las composiciones ejemplares incluyen anticuerpos o fragmentos específicos de antígeno de los mismos.

La prevención o reducción de la gravedad de enfermedad metabólica implica administrar a un sujeto una composición que reduzca la concentración de aP2 en suero. El tratamiento comprende identificar a un sujeto caracterizado por un nivel elevado de aP2 en suero en comparación con el nivel de aP2 de un sujeto (o conjunto de sujetos) de control, normal, sano, de la misma edad y mismo sexo. Por ejemplo, un sujeto de control es delgado y se caracteriza por un nivel de aP2 en suero de 20 µg/l, y un sujeto que necesita intervención terapéutica se caracteriza por un nivel de aP2 que es elevado. El sujeto a tratar en la presente invención, como se indica en las reivindicaciones 1-6, tiene sobrepeso, es obeso y/o comprende un nivel de aP2 en suero mayor de 20 µg/l (por ejemplo, 25, 28, 30, 32, 35, 40 µg/l o más de aP2 en suero). Opcionalmente los sujetos se identifican como de peso normal (IMC 18,5-24,9), sobrepeso (IMC 25-29,9) u obesos (IMC de 30 o mayor).

En cada uno de los métodos terapéuticos descritos en el presente documento, la concentración de aP2 en suero se reduce al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 5 veces, 10 veces o más en comparación con la concentración de aP2 en suero antes del tratamiento. En un ejemplo, la composición que reduce la concentración de aP2 en suero es un anticuerpo específico de aP2. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal purificado. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a epítopos de aP2 accesibles para el anticuerpo, por ejemplo, los resaltados en la Fig. 3. Dichos anticuerpos se unen a epítopos de aP2 que están expuestos en la superficie basándose en la estructura tridimensional de la proteína en solución (por ejemplo, en sangre y suero) como se muestra en el modelo cristalográfico (Fig. 3). Por ejemplo, el anticuerpo se une a un epítipo discontinuo de aP2. Un epítipo discontinuo es uno en el que los aminoácidos están muy juntos en la estructura 3dimensional de la proteína (plegada), pero separados cuando no está plegada. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal cuya especificidad de unión comprende un epítipo conformacional que es accesible a la superficie en la molécula de aP2 tal como existe en un fluido corporal tal como sangre, suero o plasma. Por ejemplo, el epítipo comprende al menos una de las siguientes partes de una proteína aP2 humana: los restos 1-5, el resto 22, los restos 36-37, los restos 46-47, el resto 57, los restos 59-60, el resto 78, 80, 89, los restos 97-101, los restos 110-112, el resto 122 de la SEC ID N°: 4. Opcionalmente, el anticuerpo se une a dos o más de los epítopos (resto o cadena de restos) tal como se expongan en la superficie de la proteína aP2 en solución. En algunos ejemplos, el anticuerpo no se une a aP2 desnaturalizada o no se une a un epítipo lineal de aP2.

La invención no solo abarca el uso médico como se reivindica de un anticuerpo monoclonal intacto específico de aP2 que reduce la concentración de aP2 en suero y el uso del mismo como se reivindica, sino también un fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo, por ejemplo, un fragmento Fab o (Fab)<sub>2</sub>; una molécula Fv monocatenaria modificada por ingeniería genética; o una molécula quimérica, por ejemplo, un anticuerpo que contiene la especificidad de unión de un anticuerpo, por ejemplo, de origen murino, y las partes restantes de otro anticuerpo, por ejemplo, de origen humano.

Los tratamientos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para tratar o reducir la gravedad de trastornos clínicos que se caracterizan por una secreción de aP2 elevada de una manera aberrante, por ejemplo, niveles de aP2 elevados en la sangre o en el suero. Dichas afecciones incluyen el síndrome metabólico, la intolerancia a la glucosa, la obesidad y la diabetes.

5

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1-6.

**Breve descripción de los dibujos**

10 La Fig. 1a es una fotografía de un gel electroforético que muestra la secreción de aP2 en adipocitos. Un lisado de células enteras (LCE) y un medio acondicionado (MA) de adipocitos de TS (Tipo Silvestre) o carentes de FABP (DK) diferenciados, se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2, mal1, caveolina o AKT.

15 La Fig. 1b es un gráfico de barras que muestra la concentración de aP2 en suero de ratones de TS, aP2<sup>-/-</sup> (aP2KO), mal1<sup>-/-</sup> (mal 1 KO) y aP2-mal1<sup>-/-</sup>(DKO). Los niveles de aP2 se determinaron con un ELISA para aP2 como se describe en los procedimientos experimentales.

20 La Fig. 1c es un gráfico de barras que muestra la concentración de aP2 en suero en ratones delgados (TS con dieta regular, DR), con obesidad inducida por dieta (TS con dieta rica en grasas, DRG) o con obesidad genética carentes de leptina (ob).

25 La Fig. 1d es un gráfico de barras que muestra la concentración de aP2 en suero en ratones que se han sometido a trasplante de médula ósea. Los trasplantes de médula ósea de realizaron entre ratones de TS y carentes de FABP (DKO) y los niveles de aP2 en suero se determinaron con un ELISA para aP2. Inserto, transferencia de aP2 de medio acondicionado de macrófagos transfectados con plásmidos de control o aP2.

30 La Fig. 2a es una fotografía de un gel electroforético que muestra los resultados de un ensayo de transferencia de Western usando un anticuerpo específico de aP2. El lisado celular de adipocitos TS o carentes de FABP se transfirieron usando IgG control de conejo, suero pre-inmune o anticuerpos aP2.

35 La Fig. 2b es un gráfico de barras que muestra la concentración de aP2 en suero en ratones antes y después de la administración del anticuerpo aP2. Los niveles de aP2 en suero en ratones que se mantuvieron con una dieta rica en grasas y a los que se inyectó anticuerpos aP2 o control durante dos semanas, se analizaron con un ELISA para aP2.

40 La Fig. 2c es un gráfico de barras que muestra los niveles de glucosa en ratones con aP2 en suero disminuida. Ratones de TS mantenidos con una dieta rica en grasa recibieron una inyección de anticuerpos aP2 o IgG control durante dos semanas y los pesos corporales se determinaron antes y después de las inyecciones.

45 La Fig. 2d es una gráfica lineal que muestra los resultados de un ensayo de tolerancia a glucosa de ratones a los que se inyectó anticuerpos aP2 o control durante dos semanas.

50 La Fig. 2e es una gráfica lineal que muestra los resultados de un ensayo de tolerancia a insulina de ratones a los que se inyectó aP2 recombinante o control durante dos semanas.

55 La Fig. 2f es un gráfico de barras que muestra la tasa de producción hepática de glucosa de pinzamiento (*clamp*) (PHGc) en ratones a los que se inyectó anticuerpo aP2 o control durante un estudio de clamp (pinzamiento) hiperinsulinémico-euglucémico.

60 La Fig. 2g es un gráfico de barras que muestra la tasa de producción hepática de glucosa basal (PHGb) en ratones a los que se inyectó anticuerpo aP2 o control durante un estudio de clamp hiperinsulinémico-euglucémico.

65 La Fig. 2h es una gráfica lineal que muestra la tasa de producción hepática de glucosa basal (PHGb) en ratones carentes de FABP que recibieron una infusión de proteínas control o aP2 recombinante durante un estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico.

La Fig. 3 es un diagrama de epítomos discontinuos basado en una estructura cristalina de aP2 usando una herramienta informática, DiscoTope. Los epítomos diana se resaltan en la estructura, y los restos que constituyen estos epítomos se indican mediante restos en recuadro en la secuencia de aminoácidos mostrada debajo del diagrama y se subrayan en la SEC ID N°: 4 (Tabla 3, más adelante).

La Fig. 4a es una fotografía de un gel electroforético que muestra la secreción de aP2 en adipocitos. El lisado de células enteras (LCE) y el medio acondicionado (MA), de los adipocitos TS o aP2-mal 1<sup>-/-</sup> (DKO) diferenciados se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2, caveolina, AKT o adiponectina.

La Fig. 4b es una fotografía de un gel electroforético que muestra la secreción de aP2 en células HEK 293. El lisado de células enteras (LCE) o el medio acondicionado (MA) inmunoprecipitado de células HEK 293 transfectadas con plásmidos de Etiqueta-AKT, Etiqueta-GFP-aP2 o Etiqueta-GFP se transfirieron usando anticuerpo anti-Etiqueta.

La Fig. 4c es una fotografía de un gel electroforético que muestra la recogida de medio acondicionado de adipocitos TS o aP2<sup>-/-</sup> en los puntos de tiempo indicados desde el cambio de medio. El medio se resolvió con SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie para examinar todas las proteínas abundantes presentes en el medio. aP2 en suero de ratones de TS, aP2<sup>-/-</sup> (aP2KO), mal1<sup>-/-</sup> (mal 1 KO) y aP2-mal 1<sup>-/-</sup> (DKO).

La Fig. 4d es un gráfico de barras que muestra los niveles de aP2 determinados con un ELISA para aP2. La Fig. 4e es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones delgados (TS con dieta regular, DR), con obesidad inducida por dieta (TS con dieta rica en grasas, DRG) o con obesidad genética carentes de leptina (ob/ob). \*, p < 0,05.

La Fig. 4f es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones sometidos a trasplante de médula ósea. El trasplante de médula ósea se realizó entre ratones de TS y aP2-mal 1<sup>-/-</sup> (DKO) y los niveles de aP2 en

suelo se determinaron con un ELISA para aP2.

La Fig. 5a es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones con alimentación a voluntad (0), en ayunas 24 horas (24) o con realimentación de 4 horas después de 24 horas de ayuno (28). \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 5b es una fotografía de un gel electroforético que muestra la aP2 en medio acondicionado (MA) o lisado de células enteras (LCE) de adipocitos tratados con IMBX/dbAMPc (I/C) e insulina (Ins).

La Fig. 5c es una fotografía de un gel electroforético que muestra la aP2 en medio acondicionado o en lisado de células enteras de explantes grasos tratados con forskolina (FSK) o con IBMX.

La Fig. 5d es un gráfico de barras que muestra los niveles de aP2 en suero en ratones a los que se inyectó solución salina (Control) o Isoproterenol para inducir la lipólisis en comparación con sus niveles de aP2 iniciales.

La Fig. 5e es una fotografía de un gel electroforético que muestra la aP2 en medio acondicionado o en lisado de células enteras de adipocitos tratados con palmitato (C 16) o estearato (C 18).

La Fig. 5f es una fotomicrografía que muestra preadipocitos que expresan GFP-aP2 cultivados en medio regular (control) o en medio que contenía palmitato 0,5 mM durante una noche.

La Fig. 5g es una fotografía de un gel electroforético que muestra la aP2 en medio acondicionado y en lisado de células enteras de adipocitos tratados con IMBX/dbAMPc (I/C) o DEUP.

La Fig. 5h es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones a los que se infunde solución salina (Control) o Intralípido/heparina (Lípido) durante 5 horas. Estas figuras demuestran que la secreción de aP2 se activa mediante ácidos grasos liberados por lipólisis.

La Fig. 6a es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones antes y después de inyección con anticuerpo aP2. Panel superior, aP2 en suero en ratones que se mantuvieron con una dieta rica en grasas y a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante dos semanas. Los niveles de aP2 en suero se determinaron con un ELISA para aP2. \*,  $p < 0,05$ . Panel inferior, extractos de proteína total de tejido adiposo de ratones que se mantuvieron con una dieta rica en grasas y a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante dos semanas que se inmunotransfirieron usando anticuerpo anti-aP2.

La Fig. 6b es un gráfico de barras que muestra niveles de glucosa en ratones obesos con aP2 disminuida en suero. Ratones de TS mantenidos con una dieta rica en grasas se inyectaron con suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante dos semanas y los niveles de glucosa se determinaron después de 6 horas de la retirada del alimento; \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6c es un gráfico lineal que muestra el ensayo de tolerancia a glucosa de ratones mantenidos con una dieta rica en grasas a los que se les inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante dos semanas. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6d es un gráfico lineal que muestra el ensayo de tolerancia a insulina de ratones mantenidos con una dieta rica en grasas a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante tres semanas. \*  $p < 0,05$ .

La Fig. 6e es un gráfico de barras que muestra la tasa de producción hepática de glucosa basal (PHGb) en ratones con una dieta rica en grasas a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante un estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6f es un gráfico de barras que muestra la tasa de producción hepática de glucosa de pinzamiento (PHGc) en ratones con una dieta rica en grasas a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante el estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6g es un gráfico de barras que muestra la tasa de infusión de glucosa (TIG) en ratones con una dieta rica en grasas a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante el estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6h es un gráfico de barras que muestra el metabolismo de glucosa de todo el cuerpo (DR) en ratones con una dieta rica en grasas a los que se inyectó suero pre-inmune (Control) o anticuerpo aP2 durante el estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico.

La Fig. 6i es un gráfico lineal que muestra un ensayo de tolerancia a glucosa de ratones con una dieta regular a los que se inyecta la proteína Gus de control o la aP2 recombinante durante dos semanas. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6j es un gráfico de barras que muestra la tasa de producción hepática de glucosa basal (PHGb) en ratones aP2-mal 1<sup>-/-</sup> que recibieron una infusión de proteína Gus de control o aP2 recombinante durante el estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. \*,  $p < 0,05$ .

La Fig. 6k es un gráfico de barras que muestra la expresión génica en hígados de ratones de TS que recibieron una infusión de proteína de control o aP2 recombinante (panel superior) o de ratones con una DRG inyectados con control o anticuerpo aP2 (panel inferior). Se analizaron la PEPCK y la G6P en tejidos hepáticos con PCR cuantitativa en tiempo real. \*,  $p < 0,05$ . Estas figuras demuestran la regulación de la homeostasis sistémica de la glucosa por aP2 en suero.

La Fig. 7a es una fotografía de un gel electroforético que muestra la secreción no clásica de aP2. El medio acondicionado de adipocitos tratados con control, brefeldin A (Bref A) o monensina (Mon) se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2 o adiponectina. El lisado de células enteras (LCE) también se transfirió usando anticuerpo anti-aP2.

La Fig. 7b es una fotografía de un gel electroforético que muestra la localización de aP2 en exosomas. El lisado de células enteras (LCE), el medio acondicionado (MA) y las fracciones exosomales (Exo) de adipocitos diferenciados se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2 o MFG-E8.

La Fig. 7c es una serie de diagramas que muestran la estructura y los cambios estructurales de aP2 de TS y mutante. Panel superior: estructura 3D de TS y de dos mutantes de aP2, panel inferior: potencial electrostático de TS y de dos mutantes aP2. Estas ilustraciones se prepararon con PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>) y la

aP2 de TS estaba basada en la estructura 3-D previamente descrita (PDB ID: 1LIE).

La Fig. 7d es una fotografía de un gel electroforético que muestra el lisado de células enteras (LCE), la fracción exosomal y el medio acondicionado inmunoprecipitado de células HEK 293 transfectadas con aP2 de TS o mutante que se transfirieron usando anticuerpo anti-etiqueta. La Fig. 7e es una fotografía de una transferencia de Western de exosomas aislados de adipocitos de control o adipocitos tratados con Forskolina, IBMX o palmitato que se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2 o MFG-E8.

La Fig. 7f es una fotografía de una transferencia de Western de exosomas aislados de sangre de ratones aP2<sup>-/-</sup>, TS o ratones de TS mantenidos con una dieta rica en grasas que se transfirieron usando anticuerpos anti-aP2 o MFG-E8.

La Fig. 7g es un diagrama que muestra el mecanismo de secreción de aP2. Después de la activación de la lipólisis por ayuno o por estímulo  $\beta$ -adrenérgico, la aP2 se transloca a la superficie de gotitas lipídicas donde se une a ácidos grasos liberados por lipólisis. La unión a ácidos grasos desencadena una señal que conduce a la aP2 a los exosomas en los que se liberó hacia el interior del espacio extracelular y a la corriente sanguínea. Después, la aP2 se desplaza al hígado y modula la gluconeogénesis. Estas figuras demuestran la secreción de aP2 dependiente de exosomas.

La Fig. 8 es una inmunotransferencia que muestra la secreción de aP2 de explantes grasos de ratones de TS y ob/ob. Secreción de aP2 en explantes grasos de ratones delgados y obesos. Se recogieron explantes grasos de ratones de TS mantenidos con una dieta regular o de ratones ob/ob y se lavaron cuidadosamente. Se añadió medio reciente y se incubó durante una noche y se recogió para análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-aP2 o adiponectina.

La Fig. 9 es una serie de inmunotransferencias que muestran la especificidad del anticuerpo aP2. Los lisados celulares de adipocitos TS o aP2<sup>-/-</sup> se resolvieron con SDS-PAGE y se inmunotransfirieron usando IgG pre-inmune o IgG anti-aP2 purificada.

Las Figs. 10a y b son gráficos de barras que muestran el peso corporal y los ácidos grasos libres en suero de ratones tratados con anticuerpo aP2. Los pesos corporales de los ratones tratados con suero pre-inmune (control) o anticuerpo aP2 se registraron el día 0 y el día 14 de la administración del anticuerpo. Fig 10a, los sueros se recogieron de ratones inyectados con anticuerpo anti-aP2 el día 0 y el día 14 de la administración del anticuerpo. Los ácidos grasos no esterificados en suero se determinaron usando un kit comercial (Wako Chemicals, Estados Unidos, Inc.).

La Fig. 11 es un gráfico de barras que muestra la aP2 en suero en ratones de TS después de una inyección de aP2 recombinante. Se extrajeron muestras de suero de los ratones en los puntos de tiempo indicados después de la inyección de aP2 y los niveles de aP2 se determinaron con un ELISA para aP2.

Las Figs. 12a-b son gráficos de barras que muestran el peso corporal y los ácidos grasos libres en suero de ratones inyectados con aP2 recombinante. Los pesos corporales de los ratones inyectados con proteína de control o aP2 recombinante se registraron el día 0 y el día 14 de la administración de la proteína.

Fig12a, los sueros que se extrajeron de ratones inyectados con proteína de control o aP2 recombinante se registraron el día 0 y el día 14 de la administración de la proteína. Los ácidos grasos no esterificados en suero se determinaron usando un kit comercial (Wako Chemicals Estados Unidos, Inc.).

La Fig. 13 es un gráfico lineal que muestra la aP2 en suero en ratones carentes de FABP (DKO) durante la infusión de aP2. Se extrajeron muestras de suero de los ratones que carecían de FABP durante la infusión de aP2 en los puntos de tiempo indicados. Los niveles de aP2 en suero se determinaron con un ELISA para aP2.

### Descripción detallada

La aP2 también se conoce como Proteína de Unión a Ácidos Grasos de Adipocitos (AFABP, *Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*), Proteína-4 de Unión a Ácidos Grasos (FABP-4, *Fatty Acid Binding Protein-4*), y Proteína de Unión a Lípidos de Adipocitos (ALBP, *Adipocyte Lipid Binding Protein*). Antes de la invención, se consideraba que la aP2 era una proteína citosólica. Ahora se ha descubierto que la chaperona de lípidos de tejido adiposo secretada, la aP2, regula el metabolismo de la glucosa hepática. Se ha descubierto que la aP2 es una proteína secretada de tejido adiposo en células de ratones y de otros mamíferos tales como seres humanos.

La aP2 en suero regula el metabolismo sistémico de la glucosa. La reducción de un síntoma de un trastorno clínico caracterizado por niveles de aP2 en circulación elevados de manera aberrante, se realiza administrando un agente bloqueante de aP2. Por ejemplo, la intolerancia a la glucosa se reduce después de la administración de dicho agente.

Composiciones ejemplares, tales como anticuerpos que se unen a aP2 en circulación, reducen de este modo el nivel o la actividad de aP2 en la sangre o en el suero.

A continuación se describen las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la aP2 tanto de ratón como de ser humano.

**Tabla 1: ADNc de la aP2 Murina**

1 cctttctcac ctggaagaca gctcctcctc gaaggtttac aaaatgtgtg atgcctttgt  
 61 gggaacctgg aagcttgtct ccagtgaaaa ctctgatgat tacatgaaag aagtgggagt  
 121 gggctttgcc acaaggaaag tggcagggcat ggccaagccc aacatgatca tcagcgtaaa  
 181 tggggatttg gtcaccatcc ggtcagagag tacttttaa aacaccgaga ttccttcaa  
 241 actgggcgtg gaattcgatg aatcaccgc agacgacagg aaggtgaaga gcatcataac  
 301 cctagatggc gggggcctgg tgcaggtgca gaagtgggat ggaaagtcga ccacaataaa  
 361 gagaaaacga gatggtgaca agctggtggt ggaatgtgtt atgaaaggcg tgacttccac  
 421 aagagtttat gaaagggcat gagccaaagg aagaggcctg gatggaaatt tgcatacaac  
 481 actacaatag tcagtcggat ttattgtttt ttttaagat atgattttcc actaataagc  
 541 aagcaattaa tttttctga agatgcattt tattggatat ggttatgttg attaaataaa  
 601 accttttag actt (SEC ID N° 1)

5

**Tabla 2: ADNc de la aP2 Humana**

1 ggaattccag gaggggtgcag ctctccttc accctgaaga ataactcag aaaactcaca  
 61 aaatgtgtga tgcttttga ggtacctgga aactgtctc cagtgaaac tttgatgatt  
 121 atatgaaaga agtaggagtg ggctttgcca ccaggaaagt ggctggcatg gccaaaccta  
 181 acatgatcat cagtgtgaat ggggatgta tcaccattaa atctgaaagt acctttaaaa  
 241 atactgagat ttcctcata ctgggccagg aatttgacga agtcactgca gatgacagga  
 301 aagtaagag caccataacc ttagatgggg gtgtcctggt acatgtgcag aaatgggatg  
 361 gaaaatcaac caccataag agaaaacgag aggatgataa actggtggtg gaatgcgta  
 421 tgaaaggcgt cacttccag agagtttat agagagcata agccaaggga cgttgacctg  
 481 gactgaagt cgcattgaac tctacaacat tctgtgggat atattgtca aaaagatatt  
 541 gttgtttcc ctgatttagc aagcaagtaa tttctcca agctgattt atcaatatg  
 601 gttacgttg ttaaataact ttttttagat ttag (SEC ID N° 2)

**Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de la aP2 Humana**

**MCDAFVGTWKLVSSENFDDDYMKEVGVGFATRKVAGMAKPNMIISVNGDVIT  
 10 IKSESTFKNTEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTI  
KRKREDDKLVVECVMKGVTSTRVYERA (SEC ID N° 4)**

**Tabla 4: Secuencia de aminoácidos de la aP2 de ratón**

**MCDAFVGTWKLVSSENFDDDYMKEVGVGFATRKVAGMAKPNMIISVNGDLVT  
 15 IRSESTFKNTEISFKLGVFDEITADDRKVKSIITLDGGALVQVQKWDGKSTTIK  
RKRDGDKLVVECVMKGVTSTRVYERA (SEC ID N° 5)**

Regulación de la secreción de aP2

20 Para confirmar que la aP2 se liberaba en sobrenadantes celulares, se analizó el medio acondicionado y el lisado celular de adipocitos TS (de tipo silvestre) o carentes de FABP en una transferencia de Western para detectar la presencia de aP2 (Fig. 1a). Se descubrió que la aP2 estaba presente de manera abundante en medio acondicionado mientras que en adipocitos, dos proteínas citosólicas, la caveolina y la AKT, eran indetectables en las mismas condiciones (Fig. 1a). Mal1, una isoforma minoritaria de las FABP (Proteínas de Unión a Ácidos Grasos) en adipocitos que comparte alta homología con la aP2, también se liberaba en el medio acondicionado (Fig. 1a). En su conjunto, las dos FABP de tejido adiposo se secretaban de adipocitos diferenciados.

30 Después se realizaron estudios para investigar la aP2 en suero en ratones con un sistema ELISA para aP2. La aP2 estaba presente en suero de ratones de TS y mal1<sup>-/-</sup> a una abundancia considerable (de 200 a 300 ng/ml) pero era indetectable en suero de ratones aP2<sup>-/-</sup> o aP2-mal 1<sup>-/-</sup> (Fig. 1b). La aP2 en suero era 20 veces más abundante que la adipoquina, leptina (10 ng/ml) y ligeramente inferior que la adipoquina, adiponectina (2-5 mg/ml). Para explorar la regulación prolongada de aP2 en suero en un escenario relativo a enfermedades metabólicas, se comparó el suero de ratones delgados y obesos que estaban inducidos con una alimentación de dieta rica en grasas o con carencia de leptina. La aP2 en suero estaba intensamente aumentada en ambos modelos de obesidad (Fig. 1c), lo que indicaba

que la aP2 secretada podía ser funcional y estaría relacionada con la regulación metabólica alterada en estas afecciones patológicas. La aP2 se expresa tanto en adipocitos como en macrófagos y la mutación de pérdida de función de aP2 en cualquier sitio protege a los ratones de desarrollar enfermedad metabólica (Furuhashi *et al.*, 2008, J Clin Invest. 118: 2640-50; Maeda *et al.*, 2005, Cell Metab 1, 107-119.).

También se descubrió que los macrófagos secretaban la aP2 (inserto de la Fig. 1d). Ratones obesos acumulan macrófagos en el tejido adiposo lo que contribuye a la insulinoresistencia. Por lo tanto, el aumento de aP2 en suero es el resultado del aumento de aP2 liberada de cualquier tipo de célula. Para determinar qué locus era el responsable del aumento de la aP2 en suero con obesidad, se trasplantó médula ósea entre ratones de TS y carentes de FABP. La aP2 en suero en estos ratones se examinó. Las células derivadas de médula ósea de ratones de TS no podían sustentar un nivel detectable de aP2 en suero en ratones carentes de FABP (Fig. 1d), lo que indicaba que los adipocitos, en lugar de las células hematopoyéticas, eran los principales contribuyentes de aP2 en suero en ratones.

#### La aP2 en suero regula el metabolismo sistémico de la glucosa

Las hormonas secretadas por adipocitos (es decir, las adipoquinas) desempeñan un papel en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Rosen *et al.*, 2006, Nature 444: 847-853). Dado que la aP2 aumenta con la obesidad y en afecciones diabéticas, se realizaron experimentos para determinar si disminuyendo la aP2 en suero en la obesidad se podría mejorar el control glucémico si la aP2 aumentada desempeñaba un papel en el metabolismo de la glucosa alterado como se observaba en la obesidad. Para agotar eficazmente la aP2 en suero, se desarrolló un anticuerpo que reconocía específicamente la aP2. Los estudios usando el anticuerpo confirmaron que éste detectaba específicamente la aP2 a una sensibilidad muy alta (Fig. 2a). Este anticuerpo se inyectó a ratones obesos. Los ratones se indujeron a la obesidad con una alimentación rica en grasas durante 16 semanas. La administración del anticuerpo aP2 suprimió de manera eficaz y rápida la concentración de aP2 en suero (Fig. 2c). El tratamiento con el anticuerpo aP2 no alteró el peso corporal de estos ratones pero causó una disminución significativa en el nivel de glucosa en sangre dos semanas después de su administración (Fig. 2c). Los ratones que recibieron la inyección del anticuerpo aP2 también mejoraron drásticamente la tasa de eliminación de glucosa y mejoraron la respuesta a la insulina, determinado por ensayos de tolerancia a glucosa y a insulina (Fig. 2d y 2e). De hecho, el tratamiento con el anticuerpo aP2 anuló esencialmente la intolerancia a la glucosa asociada con obesidad inducida por dieta en estos ratones, lo que indica que la reducción de aP2 en suero confiere un beneficio clínico para los que padecen diabetes de tipo II.

Para determinar el locus de acción de aP2 *in vivo*, se realizaron estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. Se descubrió que los ratones que recibían inyecciones con el anticuerpo aP2 tenían una producción hepática de glucosa disminuida (Fig. 2g) lo que indicaba que el hígado es una diana principal de los efectos hipoglucémicos de los anticuerpos aP2.

En experimentos recíprocos para determinar la producción metabólica de aP2 en suero aumentada, se produjo aP2 recombinante purificada y se infundió en ratones conscientes carentes de FABP. Después se realizó un estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico para monitorizar el metabolismo de glucosa de todo el cuerpo de estos ratones. Los ratones FABP<sup>-/-</sup> infundidos con aP2 tuvieron una producción hepática de glucosa basal (PHGb) significativamente aumentada (Fig. 2g). Éste es un efecto intenso, considerando que estos ratones solo se han infundido con aP2 durante 4 h en el momento en el que se determinó la PHGb.

Para investigar adicionalmente los efectos del aumento de la aP2 en suero, se inyectó aP2 recombinante por vía intraperitoneal a ratones de TS mantenidos con una dieta regular de pienso. La administración de aP2 no alteró el peso corporal de los ratones pero los ratones delgados y, por otro lado, sanos, desarrollaron intolerancia a la glucosa, determinado por ensayos de tolerancia a glucosa después de recibir una inyección de aP2 durante dos semanas (Fig. 2h). Esta observación indicó que la aP2 en suero regulaba el metabolismo sistémico de la glucosa y el aumento de la aP2 en suero solo en un corto periodo de tiempo podía causar eliminación de glucosa alterada independiente de los cambios de peso corporal y de la contribución de la dieta.

#### Tejido adiposo y trastornos metabólicos

La acumulación de pruebas en los últimos quince años ha establecido que el tejido adiposo es uno de los órganos endocrinos más grandes responsable de la regulación metabólica. Los efectos del tejido graso sobre la homeostasis sistémica de la energía están mediados por diversas hormonas. También se ha demostrado que el tejido adiposo en sujetos obesos produce una lista creciente de citoquinas inflamatorias, y la inflamación crónica del tejido adiposo ha surgido como una característica importante vinculada con la obesidad y con trastornos metabólicos relacionados. Por tanto, en contextos tanto fisiológicos como patológicos, el tejido adiposo representa un locus clave en el que interaccionan y se integran moléculas de señalización endógenas y nutrientes, finalmente dando como resultado la regulación sistémica de la homeostasis energética. Como sitio de almacenamiento de lípidos principal del organismo, el tejido adiposo es también el proveedor clave de energía durante el ayuno. La lipólisis del tejido adiposo contribuye a la mayoría de los ácidos grasos en suero, que se captan y oxidan en el músculo y también activan la producción de la glucosa en el hígado. La elevación asociada a la lipólisis de la producción hepática de la

glucosa es un fenómeno homeostático crítico que se sabe que está descompensado en la obesidad. Antes de la invención, el mecanismo por el cual este proceso estaba señalizado entre el tejido adiposo y el hígado no se entendía por completo.

5 Estudios anteriores han demostrado que las chaperonas de lípidos del tejido adiposo, y en particular la aP2, son integradores críticos de señales de lípidos con respuestas metabólicas e inflamatorias. Ratones con déficit de estas chaperonas, conocidas como proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), presentan una notable protección contra una multitud de anomalías metabólicas asociadas con la obesidad, incluyendo la insulinoresistencia, la diabetes de tipo II, la hepatoesteatosis y la aterosclerosis. Los efectos del déficit de FABP en tejido adiposo son sistémicos, lo que se pone de manifiesto mediante los cambios globales en las rutas metabólicas y respuestas de tejidos hepáticos, musculares y otros.

15 En la búsqueda de moléculas secretoras de grasa que podrían actuar de mediadores sobre los efectos beneficiosos del tejido adiposo con déficit de FABP, se descubrió un ácido graso, el c16:1n7-palmitoleato. Este ácido graso aumenta fuertemente la acción de la insulina en músculo, mientras que suprime simultáneamente la infiltración adiposa del hígado. Por otro lado, la función de las hormonas peptídicas en el déficit de FABP está menos clara. Ratones nulos FABP tienen niveles alterados de leptina y adiponectina, pero una investigación detallada confirmó que ninguna era responsable de la mejora del metabolismo de la glucosa y de los lípidos de ratones carentes de FABP.

20 La propia aP2 se ha identificado en suero humano, aumentando la posibilidad de que la aP2 en suero podría estar implicada en la regulación metabólica en la obesidad. El metabolismo de glucosa mejorado en ratones carentes de FABP ocurriría al menos en parte como resultado de la pérdida de aP2 en suero, si esta molécula se secreta en efecto de adipocitos de una manera regulada.

25 Para generar los datos descritos en el presente documento se usaron los siguientes materiales y métodos

#### Animales

30 Ratones con mutaciones nulas homocigotas en aP2 y mal1 se retrocruzaron más de 12 generaciones en un fondo genético C57BL/6J. Los ratones se mantuvieron con una dieta regular (DR) con pienso o se dispusieron con una dieta rica en grasas (Research Diets, Inc) a las 4 semanas de vida durante 20 semanas para inducir la obesidad a través de la dieta. Ratones carentes de leptina (ob/ob) se adquirieron en Jackson Laboratory. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Se realizaron ensayos de tolerancia a glucosa e insulina usando métodos convencionales.

#### Cuantificación de aP2 en suero

40 Se extrajo sangre de ratones por sangrado de la cola después de 6 horas de retirada de alimento y se centrifugó en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 30 minutos. La aP2 en suero se determinó con un sistema ELISA (Biovendor Inc.). Para monitorizar la regulación nutricional de aP2 en suero, se extrajeron muestras de sangre de ratones inmediatamente antes del inicio del ciclo de oscuridad después de lo cual los animales se pusieron en jaulas sin alimento. Después de 24 horas de ayuno, se extrajo un segundo conjunto de muestras de sangre y se proporcionó alimento. Se realizó un muestreo de sangre final 4 horas después de la realimentación. Para determinar los niveles de aP2 durante la lipólisis, se extrajo sangre de 12 ratones a niveles iniciales. Después de esto, a 6 ratones se les inyectó isoproterenol (10 mg/kg de peso corporal) y los otros 6 recibieron control de vehículo. Se extrajeron muestras de sangre 15 min después de la inyección para medir la aP2.

#### Trasplante de médula ósea

50 Ratones receptores de seis semanas de vida se irradiaron con dos dosis de 5 Gy (total 10 Gy) de una fuente de cesio distanciada por un intervalo de 4 horas para minimizar la toxicidad por radiación. Se extrajo médula ósea vaciando los fémures y las tibias de ratones donantes del mismo sexo (6-8 semanas de vida) con medio RPMI 1640 de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cuatro horas después de la segunda irradiación, se inyectaron  $5 \times 10^6$  células de médula ósea en 0,2 ml de medio en el plexo venoso retro-orbital. Comenzando una semana antes y 4 semanas después del trasplante de médula ósea, se añadieron 100 mg/l de neomicina y 10 mg/l de sulfato de polimixina B al agua acidificada.

#### Producción, purificación y administración de aP2 recombinante y anticuerpo aP2

60 La aP2 recombinante o la proteína Gus de control con una etiqueta de 6x His se produjo en *E. coli* y se purificó con el Kit de Purificación Spin 6xHis B-PER (Pierce Biotechnology, Inc.). Adicionalmente, las proteínas se purificaron retirando la endotoxina con un sistema comercial (Lonza, Inc.). 100 µg de proteína control o aP2 se inyectaron en ratones de TS mantenidos con una dieta regular en pienso dos veces al día durante dos semanas. Se produjo anticuerpo policlonal de conejo contra aP2 de ratón usando la proteína aP2 recombinante de longitud completa y el anticuerpo se purificó del suero del sangrado final usando el sistema Spin NAb™ (Pierce Biotechnology, Inc.). El

suero pre-inmune se purificó de manera similar y se usó como control. El anticuerpo purificado se diluyó en solución salina a 1 µg/µl y se inyectó en los ratones mantenidos con una dieta rica en grasas (Research diet, Inc) a una dosis de 50 mg/kg.

5 Construcción de vector y transfección

La GFP (plásmido ID 10825) y la AKT (plásmido ID 9021) etiquetadas con Flag se obtuvieron en Addgene. La aP2 de longitud completa etiquetada con Flag y sin región portal se clonó en pEGFP-C1. Con el sistema de mutagénesis Quickchange se creó la variante 59I de aP2 K22 (Stratagene). Con las construcciones indicadas se transfectaron células HEK 293 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation).

10 Cultivo celular

15 Las células HEK 293 se mantuvieron en DMEM con suero bovino fetal al 10 %. Se establecieron líneas de células carentes de FABP como se ha descrito anteriormente. Cao, H. *et al.* Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134, 933-944 (2008). Makowski, L. *et al.* Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 7, 699-705 (2001). Los pre-adipocitos se mantuvieron en DMEM con suero de ternero bovino al 10 % y se diferenciaron en adipocitos en DMEM con suero de ternero cósmico al 10 % (CCS) usando un protocolo de diferenciación convencional. Para inducir la lipólisis, adipocitos diferenciados se trataron con forskolina a 20 nM, o con IBMX 1 mM/dibutilil AMPc 1 mM durante una hora. Para los tratamientos con lípidos, se disolvió palmitato o estearato 0,25 mM en DMEM con CCS al 10 % y se añadieron a adipocitos cultivados en placas de 12 pocillos. Después de una hora, el medio se reemplazó con el mismo medio que contenía lípidos y el medio acondicionado se recogió una hora después. Para extraer los explantes grasos, se diseccionaron depósitos de tejido adiposo epididimal de ratones y se aclararon dos veces en PBS. Después, las muestras de tejido adiposo se transfirieron en DMEM con CCS al 10 % y se trituraron a un tamaño promedio de 1 a 2 mm. Los explantes tisulares se lavaron ampliamente con DMEM y se cultivaron en DMEM que contenía CCS al 10 %. La lipólisis se indujo de la misma manera que los adipocitos.

20 Microscopía de fluorescencia

25 Las células se cultivaron en cubreobjetos en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se fijaron en paraformaldehído al 4 %. Los núcleos se tiñeron con DAPI y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con los reactivos antifade de ProLong Gold (Invitrogen Corporation). La formación de imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer Z1.

30 Aislamiento de exosomas

35 Para aislar exosomas de adipocitos, se recogió medio acondicionado y se centrifugó a 1.200 g durante 10 minutos. Después, el medio se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, se centrifugó dos veces a 10.000 g durante 30 minutos y se cargó en gradientes de sacarosa al 20 %. La fracción exosomal se sedimentó por centrifugación a 100.000 g durante 150 minutos. Para aislar los exosomas del suero, se extrajo sangre de los ratones y se centrifugó en una microcentrífuga a una velocidad máxima durante 30 minutos para recoger el plasma. El plasma se diluyó en un mismo volumen de PBS y se cargó en un gradiente de sacarosa al 20 % y los exosomas se sedimentaron por centrifugación a 200.000 g durante 90 minutos.

40 Extracción de ARN y análisis de PCR cuantitativa en tiempo real

45 El ARN total se aisló de tejidos hepáticos usando reactivo Trizol (Invitrogen). La transcripción inversa se realizó con un sistema de síntesis de primera cadena de ADNc Superscript (Applied Biosystems Inc.) usando 1 µg de ARN. Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (Real-Time) RT en un termociclador de PCR (Applied Biosystems Inc.). El programa de la PCR fue: 2 min 30 s a 95 °C para la activación enzimática, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, y 1 min a 72 °C para la extensión. Se realizó un análisis de curva de fusión para confirmar los productos de la PCR en tiempo real. Todas las cuantificaciones se normalizaron con respecto al ARNr 18 S. Las secuencias cebadoras usadas fueron las siguientes:

50 PEPCK, directa: CTGCATAACGGTCTGGACTTC (SEC ID N°: 6), inversa:  
CAGCAACTGCCCGTACTCC (SEC ID N°: 7); G6P, directa:  
CGACTCGCTATCTCCAAGTGA (SEC ID N°: 8), inversa:  
GTTGAACCAGTCTCCGACCA (SEC ID N°: 9).

55 Tinción con Coomassie, inmunoprecipitación e inmunotransferencia

60 El lisado proteico tisular y el medio acondicionado de adipocitos se separaron en geles SDS PAGE y se tiñeron con Coomassie (Biorad Laboratory), o se detectaron con inmunotransferencia usando los siguientes anticuerpos: adiponectina de Santa Cruz Biotechnology, MFG-E8 de Calbiochem, caveolina-1 de BD Bioscience, AKT de Cell Signaling Technology. La aP2 etiquetada con Flag se inmunoprecipitó usando 4 ml de medio acondicionado de

células HEK 293 transfectadas después de incubación con perlas de agarosa Flag 30  $\mu$ l (Sigma) durante una noche a 4 °C. Las proteínas unidas a las perlas de agarosa se eluyeron con tampón de carga SDS y se resolvieron con SDS-PAGE.

5 Infusión de intralípidos y aP2

Cuatro días antes de los experimentos, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal). La vena yugular derecha de los mismos se cateterizó con tubos de polietileno PE-10 (diámetros interno y externo, 0,28 mm y 0,61 mm, respectivamente; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NK) cargados con solución de heparina (100 USP U/ml). El extremo distal del catéter se canalizó bajo la piel, se exteriorizó en el área interescapular y después se anudó para su inmovilización.

Los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche antes de los experimentos y recibieron una infusión de Intralípido a 3 ml/kg (Abbott) y heparina (6 U/h) durante 5 horas. La aP2 recombinante se infundió a 8  $\mu$ g/kg/min durante 5 horas.

15 Estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico

Los ratones se cateterizaron como se ha descrito anteriormente. Se realizaron estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico mediante una modificación de un procedimiento publicado<sup>15</sup>. Después de ayunar durante una noche, se infundió [3-<sup>3</sup>H]-glucosa purificada con HPLC (0,05  $\mu$ Ci/min; PerkinElmer Life y Analytical Sciences, Boston, MA) durante el periodo basal de 2 h y se extrajeron muestras de sangre al final para calcular la tasa de producción hepática de glucosa basal. Después del periodo basal, se realizó un estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico durante 120 min con una infusión continua cebada de insulina humana (Humulin R; Eli Lilly, Indianapolis, IN) a una tasa de 12,5 mU/kg/min. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 20 min para la medición inmediata de las concentraciones de glucosa plasmática, y se infundió glucosa al 25 % a tasas variables para mantener la glucosa plasmática a concentraciones basales. La renovación de glucosa de todo el cuerpo estimulada con insulina se calculó mediante una infusión continua de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa en todos los estudios de pinzamiento (0,1  $\mu$ Ci/min). Todas las infusiones se realizaron usando bombas de microdiálisis de flujo controlado (CMA/Microdialysis North Chelmsford, MA). Se extrajeron muestras de sangre 80, 85, 90, 100, 110 y 120 min después del inicio de los pinzamientos para la determinación de las concentraciones de [<sup>3</sup>H]-glucosa plasmática y de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O. Al final de los estudios de pinzamiento, los animales se sacrificaron. Al cabo de 5 min, se recogió el tejido hepático y se conservó a -80 °C para análisis posterior.

35 La aP2 se secreta de adipocitos *in vitro*

Desde su identificación inicial, se había considerado que la aP2 era una proteína citosólica pero recientemente se ha identificado mediante una exploración proteómica en el sobrenadante de adipocitos 3T3-L1 diferenciados y posteriormente en suero humano. Se realizaron estudios para determinar si los adipocitos secretaban la aP2 específicamente o si se liberaba durante la renovación celular. El examen de los niveles de aP2 en el medio acondicionado y en el lisado celular recogido de adipocitos de tipo silvestre (TS) o carentes de FABP reveló la abundante presencia de esta proteína en el medio acondicionado de células de TS (Fig. 4a). Por otro lado, dos proteínas citosólicas abundantes en adipocitos, la caveolina y la Akt, eran indetectables en las mismas condiciones, lo que sugería la posibilidad de una secreción activa (Fig. 4a). Sin embargo, como una de las proteínas citosólicas más abundantes en adipocitos, la presencia de aP2 en medio acondicionado podría aún deberse a una liberación no específica resultante de la muerte y/o lisis celular. Para determinar la naturaleza de la salida de aP2 de las células, la aP2 etiquetada con Flag se transfectó en células HEK 293 junto con GFP y Akt etiquetadas de manera similar como controles y las cantidades de cada plásmido se titularon cuidadosamente para asegurar que todas las proteínas se expresaban a niveles similares dentro de las células (Fig. 4b). Tanto el medio acondicionado como el lisado celular se exploraron con anticuerpo anti-Flag para eliminar cualquier variación que pudiera haberse introducido por las diferentes sensibilidades entre anticuerpos. En estos experimentos, la aP2 fue fácilmente detectable en el medio acondicionado, mientras que la GFP y la AKT fueron indetectables en las mismas condiciones (Fig. 4b). Estos datos indican que la aP2 se secreta activamente y que su presencia en el medio acondicionado no se debía a la lisis o muerte celular inespecífica. Para investigar la abundancia relativa de aP2 entre todas proteínas secretadas por adipocitos, el medio acondicionado de adipocitos se resolvió mediante electroforesis unidimensional. Estos datos revelan que la aP2 es una de las proteínas más abundantes secretadas de adipocitos (Fig. 4c) presentes a un nivel comparable al de la adiponectina e indica que la aP2 tiene una importante función biológica fuera de las células.

60 Regulación de la secreción de aP2 *in vivo*

Para examinar la regulación de la secreción de aP2, se examinaron los niveles de aP2 en suero de ratones utilizando un sistema ELISA. En ratones de TS y mal1<sup>-/-</sup>, la aP2 estaba presente a niveles considerables (de 100 a 300 ng/ml) en suero, pero era indetectable en controles de aP2<sup>-/-</sup> y aP2-mal1<sup>-/-</sup> (Fig. 4d). La aP2 en suero es de 10 a 30 veces más abundante que la leptina (aproximadamente 12,5 ng/ml), aunque significativamente inferior que los

niveles de adiponectina (5-10  $\mu\text{g/ml}$ ). Para explorar la regulación de aP2 en suero en el contexto de enfermedad metabólica, se compararon los perfiles séricos de ratones delgados y los modelos de obesidad de ratón tanto genético como inducido por la dieta. La aP2 en suero estaba notablemente aumentada (~4 veces) en ambos modelos de obesidad (Fig. 4e), lo que sugería que la aP2 podría estar relacionada con regulación metabólica alterada en estas afecciones patológicas. Consecuentemente, se había comunicado que los niveles aumentados de aP2 en circulación estaban asociados con obesidad en seres humanos.

Los niveles de aP2 aumentados durante la obesidad podrían deberse a una expresión de aP2 elevada, a una masa grasa expandida o a una secreción de aP2 aumentada. Aunque se sabe que la obesidad no tiene un fuerte impacto sobre la expresión global de aP2, se realizaron estudios para diferenciar si un aumento del volumen de la masa grasa o una descompensación de la secreción era responsable de los niveles elevados de aP2 en suero observados en ratones obesos. Se extrajeron explantes grasos de ratones delgados y obesos (ob/ob) y se examinó la liberación de aP2 *ex vivo* en un cultivo de explantes. La secreción de aP2 de una masa de explante graso equivalente de ratones obesos era significativamente mayor que la de los controles delgados, lo que indicaba que los ratones obesos tenían descompensada la secreción de aP2 (Fig. 8). La secreción de adiponectina se redujo significativamente en explantes de obesos, verificando la fidelidad de este sistema capturando el perfil secretor del tejido adiposo (Fig. 8).

La aP2 se expresa tanto en adipocitos como en macrófagos y una mutación de pérdida de función de aP2 en cualquier tipo de célula puede contribuir a las respuestas metabólicas mejoradas en ratones. Dado que los ratones obesos acumulan macrófagos en el tejido adiposo, un suceso que se ha propuesto que contribuye a la insulinoresistencia, el aumento de aP2 en suero y en explantes grasos, podría deberse a una liberación de aP2 aumentada de macrófagos de tejido adiposo. Para determinar el tipo célula responsable del aumento de aP2 en suero en el contexto de obesidad, se realizó un trasplante de médula ósea entre ratones de TS y carentes de FABP. Un examen de suero reveló que las células derivadas de médula ósea de ratones de TS no podían sustentar un nivel detectable de aP2 en suero en ratones carentes de FABP (Fig. 4f). Este hallazgo respaldó la idea de que los adipocitos, y no las células hematopoyéticas, eran el contribuyente predominante de aP2 en suero en ratones, y que la aP2 es una nueva adipoproteína con un perfil sérico alterado en la obesidad.

#### La secreción de aP2 está regulada por ácidos grasos liberados por lipólisis

Se realizaron estudios para evaluar si una proteína metabólicamente activa secretada de adipocitos podría estar regulada por estados metabólicos y fluctuaciones de nutrientes. Dicha regulación podría esclarecer el metabolismo de descompensación en condiciones patológicas. Por tanto, se realizaron experimentos para determinar si los niveles de aP2 en suero cambiaban en respuesta al ayuno y a la realimentación. Los niveles de aP2 en circulación en ratones en ayunas durante 24 horas aumentaron significativamente en comparación con los niveles durante la alimentación a voluntad, pero se suprimían rápidamente después de 4 horas de realimentación (Fig. 5a). Por lo tanto, los nutrientes y el estado metabólico pueden modular los niveles de aP2 en suero, lo que a su vez sugiere que la aP2 podría formar parte de un programa sistémico que regulase la homeostasis de la energía.

La función primaria del tejido adiposo en la homeostasis de la energía es proporcionar ácidos grasos vía lipólisis a otros tejidos durante el ayuno. Para investigar si la secreción de aP2 estaba vinculada con la lipólisis, se diferenciaron preadipocitos y se estimuló la lipólisis en las células. El tratamiento con isobutilmetilxantina (IBMX) y dbAMPc indujo un fuerte aumento en la secreción de aP2 de adipocitos al cabo de una hora (Fig. 5b). Cuando las células se trataron conjuntamente con insulina para suprimir la lipólisis, la secreción de aP2 se suprimió (Fig. 5b). Para investigar adicionalmente la secreción de aP2 de adipocitos en un entorno tisular, se recogieron explantes grasos y se cultivaron *ex vivo*. La secreción de aP2 se examinó en condiciones iniciales o después de la estimulación de la lipólisis. El tratamiento con IBMX o con forskolina causó un aumento muy sustancial en la secreción de aP2 (Fig. 5c) confirmando que este proceso está muy vinculado con la lipólisis. Para explorar el impacto de la lipólisis sobre la secreción de aP2 *in vivo*, los ratones recibieron una inyección de isoproterenol, un agonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico que activa fuertemente la lipólisis. Los ratones que recibieron isoproterenol mostraron un rápido aumento en los niveles de aP2 en suero en comparación con los animales de control tratados con vehículo (Fig. 5d) lo que indicaba que la secreción de aP2 estaba regulada por la lipólisis *in vivo* y que la aP2 en suero elevada en ratones durante el ayuno estaba causada por una actividad lipolítica aumentada en el tejido adiposo.

Para investigar adicionalmente si los ácidos grasos liberados por lipólisis regulaban la secreción de aP2, se trataron adipocitos con palmitato y estearato. Ambos lípidos aumentan significativamente la secreción de aP2 (Fig. 5e). El tratamiento con ácidos grasos también causó la translocación de una aP2 etiquetada con GFP a gotitas lipídicas (Fig. 5f) lo que sugería que los lípidos también regulaban la localización celular de la aP2 y que podían conducirla a una ruta secretora.

La lipólisis es un proceso complicado que implica múltiples rutas de señalización, muchas de las cuales pueden regular posiblemente la secreción de aP2. Para determinar el significado de los ácidos grasos en la secreción de la aP2 inducida por lipólisis, se trataron adipocitos con dietilumbeliferil fosfato (DEUP), un inhibidor de triglicérido hidrolasas, seguido de inducción de lipólisis para impedir la liberación de ácidos grasos de depósitos de triglicéridos

(TG). El tratamiento con DEUP bloqueó completamente la secreción de aP2 inducida por lipólisis, lo que indicaba que para la secreción de la aP2 se requería la liberación de ácidos grasos (Fig. 5g).

Para ensayar el efecto de los ácidos grasos sobre la secreción de aP2 *in vivo*, se realizó una infusión de intralípido/heparina en ratones vivos, conscientes. El aumento de ácidos grasos en suero por infusión de intralípido también indujo la secreción de aP2 (Fig. 5h) lo que indicaba que los ácidos grasos estimulaban la secreción de aP2 *in vivo*.

#### La aP2 en suero regula críticamente el metabolismo hepático de glucosa en ratones

Los ratones carentes de FABP están protegidos de múltiples componentes del síndrome metabólico, particularmente de la diabetes de tipo 2. También se ha indicado que, en seres humanos, la aP2 elevada en suero está asociada con diabetes, enfermedad cardiovascular y otros trastornos metabólicos. Sin embargo, antes de la invención, aún no se había establecido una relación causal entre la aP2 en circulación y el metabolismo de lípidos y/o de hidratos de carbono. El íntimo acoplamiento de la secreción de aP2 con la lipólisis sugiere que la aP2 en suero podría tener efectos sinérgicos sobre la regulación metabólica resultante de fluctuaciones en los ácidos grasos.

Los niveles elevados de lipólisis durante la obesidad liberan el exceso de ácidos grasos en suero. Estos ácidos grasos causan insulinoresistencia y aumentan la producción hepática de glucosa activando el programa gluconeogénico. Por lo tanto, la aP2 en circulación representa una diana para mediar este efecto. Los efectos beneficiosos del déficit de FABP sobre la regulación metabólica podrían estar mediados, al menos en parte, por la pérdida de función de aP2 en suero, dado que sus niveles están significativamente elevados en la obesidad. Para investigar esta hipótesis, se desarrolló un anticuerpo neutralizante para reducir la aP2 en suero. El anticuerpo detecta específicamente la aP2 con una sensibilidad muy alta (Fig. 9). Este anticuerpo se inyectó a ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasas y los resultados confirmaron que el anticuerpo aP2 reducía drásticamente de manera eficaz y rápida la aP2 en suero a los niveles observados en controles delgados sin alterar los niveles de aP2 en el tejido adiposo (Fig. 6a). La administración del anticuerpo no alteró el peso corporal o los niveles de ácidos grasos en suero de estos ratones (Fig. 10), pero ocasionaron una disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre al cabo de dos semanas de tratamiento (Fig. 6b). En un ensayo de tolerancia a glucosa, los ratones que recibieron el anticuerpo aP2 mostraron curvas de eliminación de glucosa notablemente mejoradas en comparación con los animales de control (Fig. 6c). Los ratones obesos con aP2 en suero disminuida también presentaron una respuesta sistémica a la insulina potenciada como se determina mediante ensayos de tolerancia a insulina (Fig. 6d). Estos resultados indican que la aP2 en suero elevada representa un componente necesario para la insulinoresistencia inducida por obesidad y la intolerancia a la glucosa y que la supresión de la aP2 en circulación es útil como un método para bloquear el deterioro metabólico asociado con la obesidad.

Se examinó el flujo de glucosa de todo el cuerpo y los efectos específicos de tejido de la reducción drástica de aP2 mediada por el anticuerpo usando estudios de pinzamiento (*clamp*) hiperinsulinémico-euglucémico en ratones tratados con el anticuerpo aP2 o con vehículo. La reducción de aP2 en suero en ratones obesos dio como resultado una producción hepática de glucosa basal y de pinzamiento significativamente disminuida (Fig. 6e, f) lo que indica que el hígado es la diana principal de la aP2 en circulación en la regulación del metabolismo de la glucosa. Durante los estudios de pinzamiento, ratones obesos a los que se inyectó el anticuerpo necesitaron tasas de infusión de glucosa significativamente aumentadas para mantener la euglucemia, pero no presentaron cambios en su tasa de metabolismo de glucosa en comparación con los controles (Fig. 6g, h). Estos resultados indican que la tasa de infusión de glucosa elevada en estos animales está dirigida principalmente por la producción hepática de glucosa disminuida. Estos datos están en línea con lo que se había observado en los FABP genosuprimidos (*knockout*) de todo el cuerpo, que también se caracterizan por una producción hepática de glucosa significativamente disminuida tanto en obesidad genética como inducida por la dieta. Por lo tanto, los efectos de aP2 sobre el metabolismo hepático de la glucosa están principalmente mediados por la forma secretada de esta proteína.

#### La aP2 en circulación regula la producción de glucosa en el hígado

Para abordar directamente si la aP2 en suero elevada tenía un impacto negativo sobre el mecanismo de la glucosa, se creó una condición de aP2 en suero elevada en ratones de otra manera metabólicamente normales. La aP2 recombinante se inyectó en ratones alimentados con una dieta regular con pienso. La administración de una sola dosis de aP2 recombinante a los ratones condujo a niveles aumentados de aP2 en suero que duraron varias horas (Fig. 11). La aP2 recombinante se inyectó dos veces al día para garantizar que los ratones mantenían la aP2 elevada en circulación durante la mayor parte de cada periodo de tiempo de 24 h. La administración de aP2 recombinante no alteró el peso corporal o los niveles de ácidos grasos libres en suero de los ratones durante este periodo (Fig. 12). Sin embargo, los animales delgados, sanos, mostraron intolerancia a glucosa leve después de recibir la aP2 recombinante durante dos semanas, determinado mediante un ensayo de tolerancia a glucosa (Fig. 6i). Esta observación indicó que la aP2 en suero regula el metabolismo de la glucosa y que el aumento de aP2 en suero por sí solo, puede causar metabolismo de glucosa alterado, incluso en ausencia de cualquier contribución en la dieta y alteraciones en el peso corporal. La aP2 recombinante se infundió a ratones conscientes carentes de FABP y se examinaron los efectos agudos de aP2 en suero sobre el metabolismo de la glucosa con un pinzamiento (*clamp*) hiperinsulinémico-euglucémico. En este entorno, la infusión de aP2 en ratones causó un rápido aumento en

los niveles de aP2 en suero y se estableció niveles en suero estacionarios altos después de una hora que duraron hasta el final del experimento (Fig. 13). Durante el estudio de pinzamiento, los ratones que recibieron aP2 presentaron una producción hepática de glucosa basal (PHGb) significativamente aumentada (Fig. 6j). Éste es un profundo efecto considerando que estos ratones solo habían recibido una infusión de aP2 durante 4 horas en el momento en el que se examinó la producción hepática de glucosa. Estos hallazgos y la ausencia de alteraciones en las tasas del metabolismo de la glucosa confirman adicionalmente la hipótesis de que el hígado es la diana principal de la aP2 en suero. La expresión de genes que regulan la producción hepática de glucosa se examinó en experimentos tanto de infusión como de empobrecimiento de aP2. Los dos genes clave en la ruta de la gluconeogénesis, el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y el de la glucosa-6-fosfatasa (G6P), se regularon positivamente de manera significativa en ratones a los que se había infundido la aP2 en comparación con el control (Fig. 7k panel superior). A la inversa, los ratones que recibieron el anticuerpo aP2 presentaron descensos drásticos en estos genes gluconeogénicos (Fig. 6k plante inferior). Estos datos indican que la aP2 en suero regula la gluconeogénesis en el hígado y que los niveles elevados de la aP2 en suero en la obesidad contribuyen a la producción hepática de glucosa aumentada a menudo observada en afecciones diabéticas.

#### Secreción de aP2 asociada a exosomas *in vitro* e *in vivo*

Para entender mejor cómo la secreción de aP2 está vinculada a, y regulada por, la lipólisis, se examinó, el mecanismo molecular de la secreción de aP2. En primer lugar, adipocitos diferenciados se trataron con inhibidores de las rutas secretoras clásicas y se examinaron proteínas secretadas en el medio acondicionado. Aunque el tratamiento tanto con brefeldin A como con monesina bloqueó eficazmente la secreción de adiponectina, ninguna tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la liberación de aP2 (Fig. 7a), lo que indica que la aP2 se secreta mediante una ruta no clásica. Este hallazgo es coherente con el hecho de que la aP2 carece de una secuencia peptídica señal.

Uno de una diversidad de mecanismos previamente descritos para la secreción no clásica es la ruta dependiente de exosomas. Para determinar si la secreción de aP2 utiliza esta ruta, se aislaron exosomas de medio acondicionado de adipocitos; se examinó la presencia de aP2 en estas fracciones. La aP2 estaba enriquecida y era fácilmente detectable en la fracción exosomal, de una manera similar al factor 8 EGF globular de grasa láctea (MFG-E8), un marcador de exosomas establecido (Fig. 7b), lo que indicaba que la aP2 realmente se secretaba mediante exosomas en los adipocitos.

#### La Secreción Exosomal Regulada de una Chaperona Lipídica de Tejido Adiposo Vincula la Lipólisis con la Producción Hepática de Glucosa

El direccionamiento en membranas es una etapa clave para la secreción mediada por exosomas. Aunque la mayor parte de la aP2 se localiza en el citosol, se ha descubierto que la aP2 interacciona transitoriamente con membranas fosfolipídicas. La estructura 3D de la aP2 se compone de un barril  $\beta$  de 10 cadenas con dos hélices  $\alpha$  superiores que sirven como el portal para la entrada de ácidos grasos<sup>25</sup> (Fig. 7c, panel izquierdo). Se han propuesto dos componentes de la proteína aP2 que contribuyen a su asociación a membranas: (1) un borde de fuertes potenciales de superficie positivos, aportados por los restos de lisina, que median una interacción electrostática con los fosfolípidos cargados negativamente y (2) la región portal que interacciona directamente con la membrana. Para explorar los mecanismos que podrían ser la base de la translocación de aP2 en el exosoma, se crearon mutantes de aP2 con los dos restos de superficie críticos, la lisina 22 y la 59, cambiadas a isoleucina (Fig. 7c, panel central) o con delección completa de la región portal (Fig. 7c, panel derecho). Estas mutaciones no alteraron el plegamiento global de la aP2 sino que bloquearon la secreción de aP2 de las células (Fig. 7d), indicando que la asociación de aP2 con la membrana fosfolipídica es un requisito absoluto para su secreción. Los mutantes de aP2 descritos anteriormente, que pierden su capacidad secretora, también habían reducido drásticamente la localización exosomal (Fig. 7d), lo que indicaba que el direccionamiento del exosoma es una etapa esencial para la secreción de aP2.

Habiendo observado la inducción de la secreción de aP2 por lipólisis, la translocalización de aP2 en los exosomas se examinó durante bien la lipólisis o la exposición a ácidos grasos. En ambas condiciones, se observó un claro enriquecimiento de aP2 en los exosomas (Fig. 7e), lo que sugería que el aumento del direccionamiento de aP2 a los exosomas durante la lipólisis da como resultado su secreción elevada. En la sangre se han identificado microvesículas similares a exosomas, aunque normalmente se había considerado que las células hematopoyéticas eran la fuente de estas vesículas. Para investigar si en la circulación también existían exosomas asociados a aP2, la fracción exosomal del plasma de ratones se aisló y se transfirió para aP2. Los exosomas asociados a aP2 existen en la circulación de ratones de TS pero no en ratones aP2 genosuprimidos (Fig. 7f), lo que sugiere que los adipocitos secretarían exosomas que se comunicarían con otros órganos. Los resultados mostraron niveles significativamente aumentados de aP2 en los exosomas en circulación de ratones obesos, lo que indica que los exosomas asociados a aP2 podrían estar implicados en la descompensación metabólica inducida por obesidad (Fig. 7f).

Estos datos proporcionan pruebas de que la aP2 es una nueva adipoquina que se regula por el estado nutricional y obesidad. En adipocitos, la secreción de aP2 está activada por lípidos y lipólisis y está mediada por una ruta secretora asociada a exosomas (Fig. 7g). En los ratones, la aP2 en suero procede completamente de adipocitos con un notable aumento en los modelos de obesidad inducida por dieta o genética, así como en la lipólisis *in vivo*. El empobrecimiento de aP2 en suero en ratones obesos suprime la producción hepática de glucosa elevada, mientras

que el aumento inverso de aP2 en suero en ratones delgados conduce a una producción hepática de glucosa aumentada. Estos resultados indican que la aP2 secretada es un componente clave del sistema de comunicación adipo-hepático que vincula la lipólisis con la producción hepática de glucosa (Fig. 7g).

5 Los ácidos grasos libres en suero representan una fuente de energía clave durante el ayuno, pero también se reconoce que la lipólisis elevada y los ácidos grasos en suero están vinculados con la descompensación de la homeostasis sistémica de la glucosa y representa una de las causas subyacentes críticas de los trastornos metabólicos inducidos por la obesidad. El exceso de ácidos grasos produce insulinoresistencia en el músculo y en el hígado, reduciendo la utilización de la glucosa y atenuando la supresión de la producción de glucosa mediada por la insulina, respectivamente. Utilizando las condiciones hormonales bien controladas de un pinzamiento pancreático, también se ha observado que los ácidos grasos aumentan directamente la producción hepática de glucosa independiente de la acción de la insulina o del glucagón. Este efecto se ha atribuido a la activación de las rutas de la gluconeogénesis por ácidos grasos. Se ha observado que algunos modelos de ratón y condiciones, desacoplan la producción hepática de glucosa del aumento de ácidos grasos en suero, lo que sugiere que se requieren otros factores para vincular la lipólisis y los ácidos grasos con la gluconeogénesis hepática. Los hallazgos presentados en el presente documento identifican a la aP2 como una proteína secretada de adipocitos y uno de estos factores.

La identificación de aP2 como una adipocina ofrece varias ideas sobre las funciones endocrinas del tejido adiposo. Esta proteína es única en cuanto a su capacidad para unir directamente lípidos y para secretarse en respuesta a la lipólisis. Por tanto, sirve como un detector del estado lipídico del tejido adiposo o como una señal en otros órganos metabólicos en respuesta a la regulación metabólica o cambios en la dieta. De manera adicional, la secreción de aP2 asociada con exosomas, estimulada por lipólisis, ayudaría a explicar cómo los adipocitos sustentan una capacidad secretora drástica a pesar del volumen masivo de gotitas lipídicas y de las limitaciones impuestas en el retículo endoplasmático. Cuando la aP2 se activa por ácidos grasos, se transloca a gotitas lipídicas o a cuerpos lipídicos. Los cuerpos lipídicos funcionan como orgánulos de tránsito a membranas, y se identificaron determinadas proteínas residentes en cuerpos lipídicos, tales como la perilipina A, que se secretaban mediante exosomas. Por tanto, es posible que el mecanismo de secreción de aP2 permita a los adipocitos satisfacer las demandas de suministrar eficazmente lípidos y proteínas fuera de la célula (Fig. 7g).

El estrecho acoplamiento de la secreción de aP2 y de los niveles en suero con la lipólisis del tejido adiposo indica que la aP2 representa una nueva parte de las consecuencias fisiológicas y/o patofisiológicas de la respuesta lipolítica. La necesidad aparente de aP2 como un componente sérico para ácidos grasos para activar por completo la gluconeogénesis en el hígado argumenta que la hiper-aP2-emia inducida por obesidad sería la base de la producción hepática de glucosa elevada que es la marca distintiva de la hiperglucemia en sujetos con diabetes de tipo 2.

Las pruebas apuntan al papel central de la aP2 en enfermedades metabólicas no solo en modelos experimentales sino también en seres humanos. Aunque el valor terapéutico de la inhibición de aP2 es un objetivo clínico, su direccionamiento químico en tejidos ha sido un reto. Los datos descritos en el presente documento demuestran que cuando los niveles aumentados de aP2 en suero, asociados con obesidad, se normalizan usando un anticuerpo neutralizante, el metabolismo de la glucosa se potencia enormemente sin ninguna alteración en los niveles de aP2 en el tejido adiposo. Los niveles de aP2 en suero se asocian con riesgo de enfermedad metabólica en seres humanos y la aP2 en circulación, en ayunas, está más fuertemente relacionada con riesgo metabólico que con aumento de ácidos grasos libres en ayunas. La administración de composiciones para neutralizar la aP2 en suero es una estrategia eficaz para tratar trastornos metabólicos, especialmente la diabetes de tipo 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> President and Fellows of Harvard College
- <120> aP2 SECRETADA Y MÉTODOS DE INHIBICIÓN DE LA MISMA
- <130> 21508-076N01EP
- <140> EP10707783.6
- <141> 05-03-2010
- <150> 61/209.251
- <151> 05-03-2009
- <150> 61/229.170
- <151> 28-01-2010
- <160> 8

ES 2 542 737 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 614  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 1

cctttctcac ctggaagaca gctcctcctc gaaggtttac aaaatgtgtg atgcctttgt 60  
 gggaaacctgg aagcttgtct ccagtgaaaa cttcgatgat tacatgaaag aagtgggagt 120  
 gggctttgcc acaaggaaag tggcaggcat ggccaagccc aacatgatca tcagcgtaaa 180  
 tggggatttg gtcaccatcc ggtcagagag tacttttaaa aacaccgaga tttccttcaa 240  
 actgggctgt gaattcgatg aaatcaccgc agacgacagg aaggtgaaga gcatcataac 300  
 cctagatggc ggggccctgg tgcaggtgca gaagtgggat ggaaagtcga ccacaataaa 360  
 gagaaaacga gatggtgaca agctggtggt ggaatgtgtt atgaaaggcg tgacttccac 420  
 aagagtttat gaaagggcat gagccaaagg aagaggcctg gatggaaatt tgcataaac 480  
 actacaatag tcagtcggat ttattgtttt ttttaaagat atgattttcc actaataagc 540  
 aagcaattaa tttttctga agatgcattt tattggatat ggttatgttg attaaataaa 600  
 accttttttag actt 614

10

<210> 2  
 <211> 634  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ggaattccag gaggtgag cttccttctc accttgaaga ataactcctag aaaactcaca 60  
 aaatgtgtga tgcttttgta ggtacctgga aacttgtctc cagtgaaaac tttgatgatt 120  
 atatgaaaga agtaggagtg ggctttgcca ccaggaaagt ggctggcatg gccaaaccta 180  
 acatgatcat cagtgtgaat ggggatgtga tcaccattaa atctgaaagt accttataaa 240  
 atactgagat ttccttcata ctgggccagg aatttgacga agtcaactgca gatgacagga 300  
 aagtcaagag caccataacc ttagatgggg gtgtcctggt acatgtgcag aatgggatg 360  
 gaaaatcaac caccataaag agaaaacgag aggatgataa actgggtggtg gaatgctca 420  
 tgaaggcgt cacttccacg agagtttatg agagagcata agccaagga cgttgacctg 480  
 gactgaagtt cgcattgaac tctacaacat tctgtgggat atattgttca aaaagatatt 540  
 gttgttttcc ctgatttagc aagcaagtaa ttttctcca agctgatttt attcaatatg 600  
 gttacgttg ttaaataact ttttttagat ttag 634

20

<210> 4  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25

ES 2 542 737 T3

<400> 4

Met Cys Asp Ala Phe Val Gly Thr Trp Lys Leu Val Ser Ser Glu Asn  
 1 5 10 15

Phe Asp Asp Tyr Met Lys Glu Val Gly Val Gly Phe Ala Thr Arg Lys  
 20 25 30

Val Ala Gly Met Ala Lys Pro Asn Met Ile Ile Ser Val Asn Gly Asp  
 35 40 45

Val Ile Thr Ile Lys Ser Glu Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser  
 50 55 60

Phe Ile Leu Gly Gln Glu Phe Asp Glu Val Thr Ala Asp Asp Arg Lys  
 65 70 75 80

Val Lys Ser Thr Ile Thr Leu Asp Gly Gly Val Leu Val His Val Gln  
 85 90 95

Lys Trp Asp Gly Lys Ser Thr Thr Ile Lys Arg Lys Arg Glu Asp Asp  
 100 105 110

Lys Leu Val Val Glu Cys Val Met Lys Gly Val Thr Ser Thr Arg Val  
 115 120 125

Tyr Glu Arg Ala  
 130

5 <210> 5  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 5

ES 2 542 737 T3

Met Cys Asp Ala Phe Val Gly Thr Trp Lys Leu Val Ser Ser Glu Asn  
 1 5 10 15

Phe Asp Asp Tyr Met Lys Glu Val Gly Val Gly Phe Ala Thr Arg Lys  
 20 25 30

Val Ala Gly Met Ala Lys Pro Asn Met Ile Ile Ser Val Asn Gly Asp  
 35 40 45

Leu Val Thr Ile Arg Ser Glu Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser  
 50 55 60

Phe Lys Leu Gly Val Glu Phe Asp Glu Ile Thr Ala Asp Asp Arg Lys  
 65 70 75 80

Val Lys Ser Ile Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Leu Val Gln Val Gln  
 85 90 95

Lys Trp Asp Gly Lys Ser Thr Thr Ile Lys Arg Lys Arg Asp Gly Asp  
 100 105 110

Lys Leu Val Val Glu Cys Val Met Lys Gly Val Thr Ser Thr Arg Val  
 115 120 125

Tyr Glu Arg Ala  
 130

5 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 6  
 ctgcataacg gctggactt c 21

15 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 7  
 cagcaactgc ccgtactcc 19

25 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 542 737 T3

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 8  
cgactcgcta tctccaagtg a 21

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

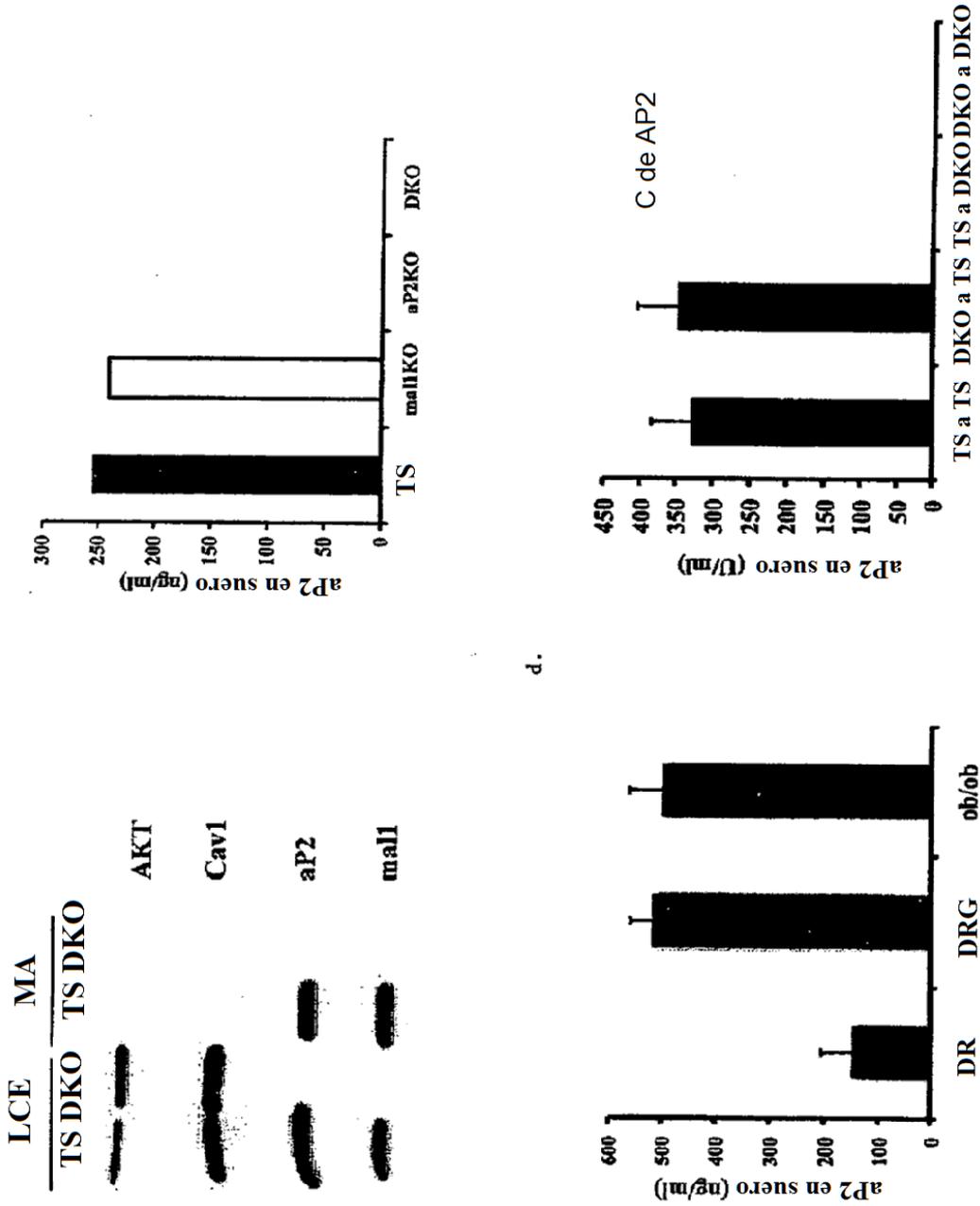
<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

15 <400> 9  
ggtgaaccag tctccgacca 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende un anticuerpo específico de aP2 o un fragmento de unión a aP2 del mismo, para su uso en un método de tratamiento de la diabetes o reducción de la intolerancia a la glucosa o reducción de la insulinoresistencia inducida por obesidad, comprendiendo el método la administración de la composición a un sujeto y en el que la administración de la composición al sujeto reduce la concentración de aP2 en suero.
- 10 2. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene sobrepeso, es obeso y/o tiene un nivel de aP2 en suero mayor de 20 µg/l.
- 15 3. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1, en la que la concentración de aP2 en suero se reduce al menos un 10 %.
- 20 4. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo específico de aP2 se une a un epítipo discontinuo de aP2.
- 25 5. La composición para su uso en el método de la reivindicación 4, en la que el epítipo se expone en la superficie sobre una estructura tridimensional de aP2 en solución.
6. La composición para su uso en el método de la reivindicación 4, en la que el epítipo comprende al menos una de las siguientes secuencias: los restos 1-5, el resto 22, los restos 36-37, los restos 46-47, el resto 57, los restos 59-60, el resto 78, el resto 80, el resto 89, los restos 97-101, los restos 110-112, el resto 122 de la SEC ID N°: 4.



d.

Fig. 1

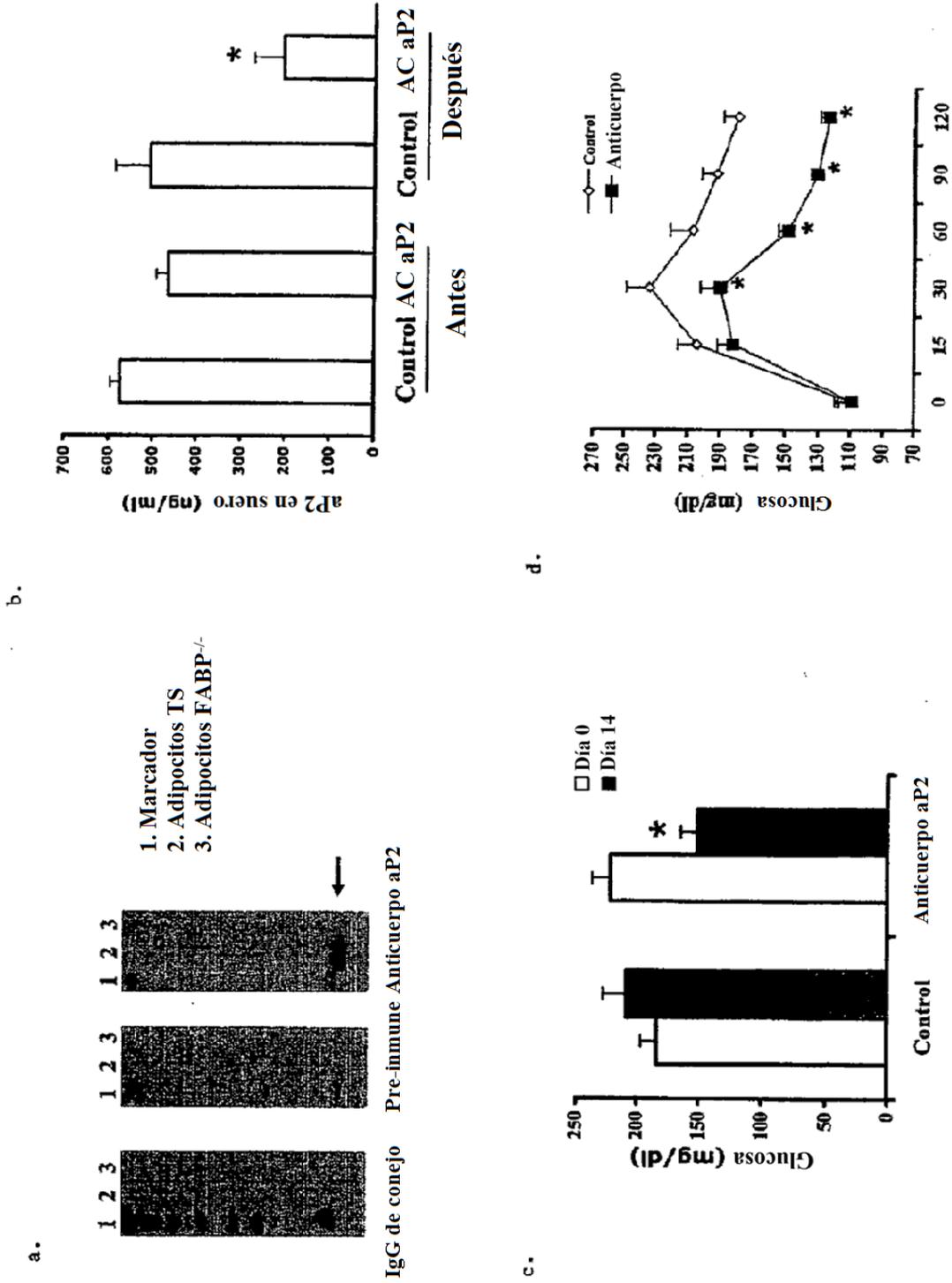


Fig. 2

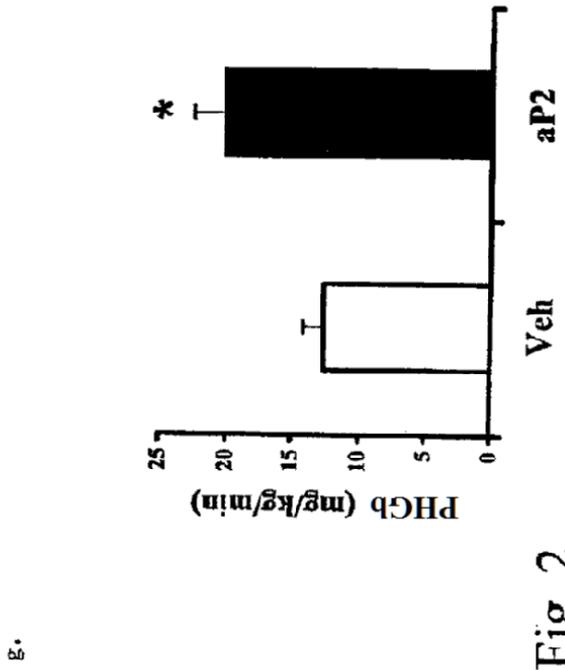
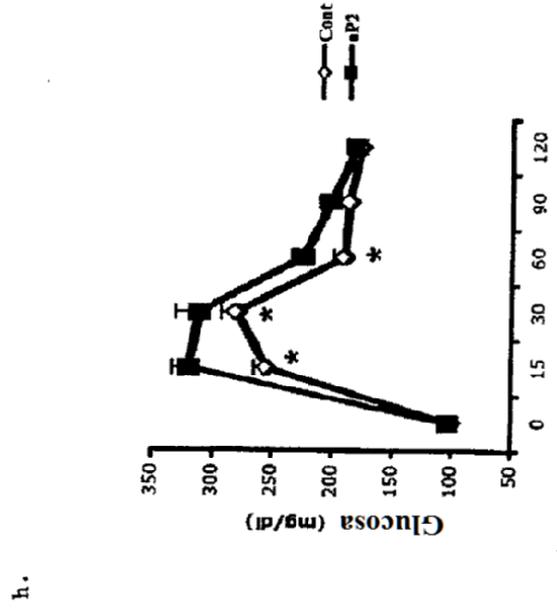
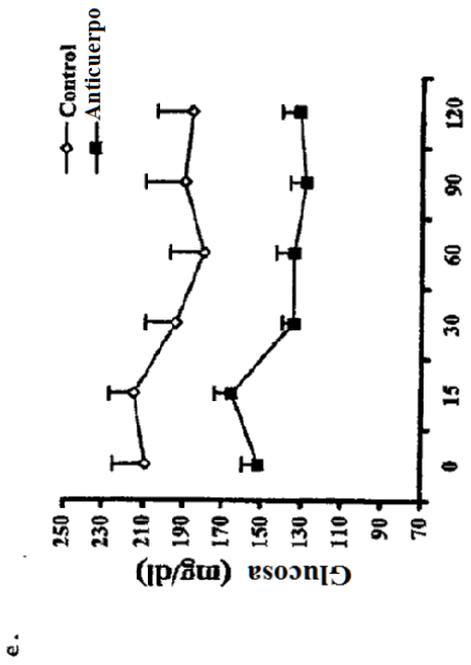
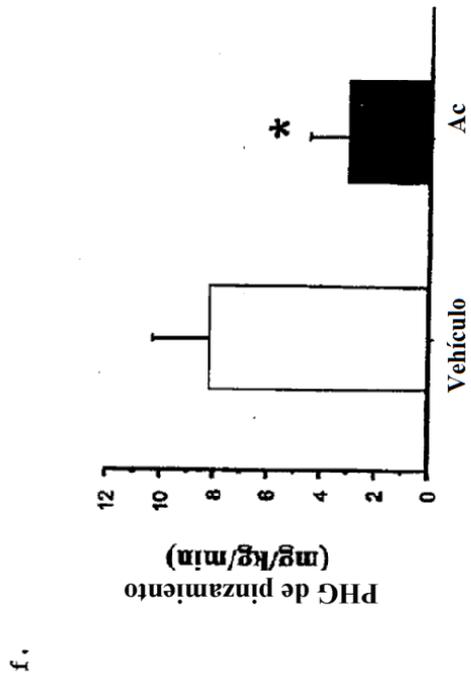


Fig. 2



Con una herramienta informática, DiscoTope, se predicen los epítomos discontinuos basándose en la estructura cristalina de aP2 (resaltados sobre la estructura) y los restos que constituyen estos epítomos se marcan en los recuadros indicados abajo.

>gi|4557579|ref|NP\_001433.1| proteína 4 de unión a ácidos grasos, adipocitos [*Homo sapiens*]

MCD**A**FVGTWKLVSSE**N**FDDY**M**KEVGVGFATR**K**VAG**M**AK**P**NMIISV**N**GDVITIKSES**T**FK  
 NTEISFILGQEFDEVT**A**DR**K**VKSTIT**L**DGGV**L**VHV**K**WD**G**KSTTI**K**R**R**ED**D**KL**V**VE**C**  
 VM**R**G**V**TSTRVY**E**RA (SEC ID N°: 4)

FIG. 3

Fig. 4a

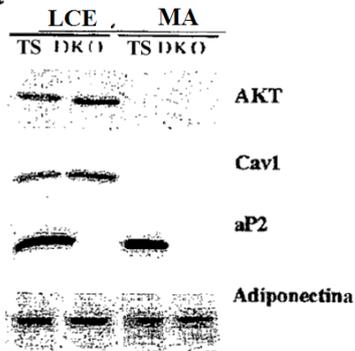


Fig. 4b

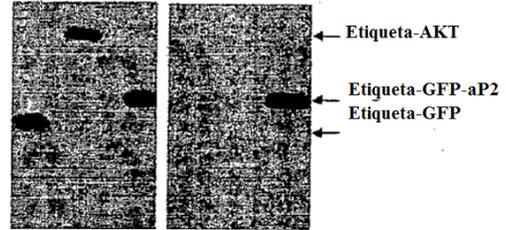


Fig. 4c

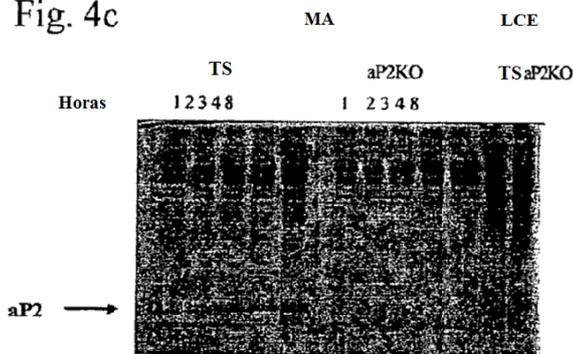


Fig. 4d

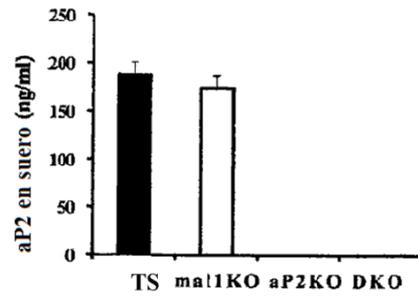


Fig. 4e

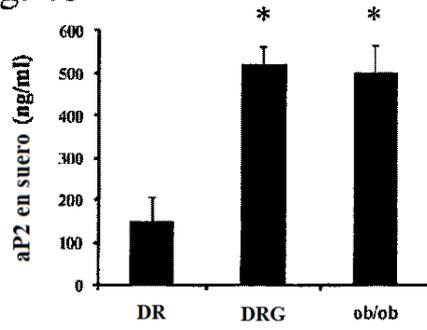


Fig. 4f

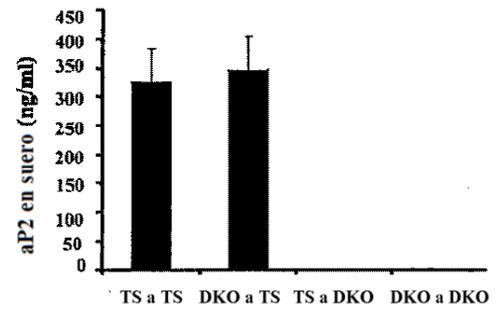


Fig. 5a

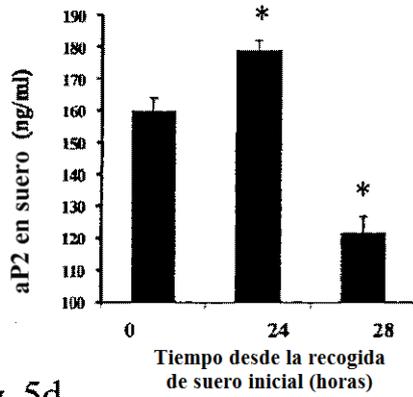


Fig. 5b

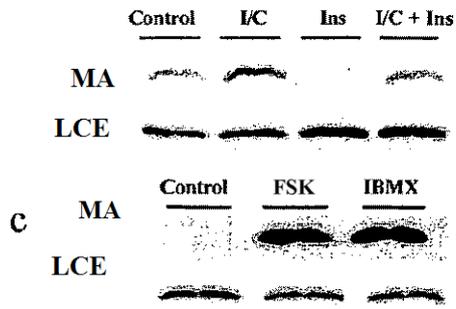


Fig. 5d

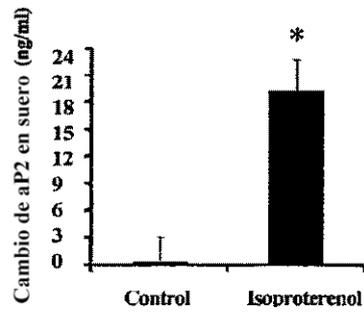
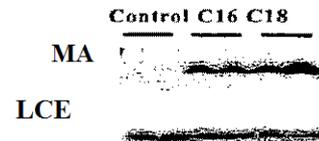


Fig. 5e



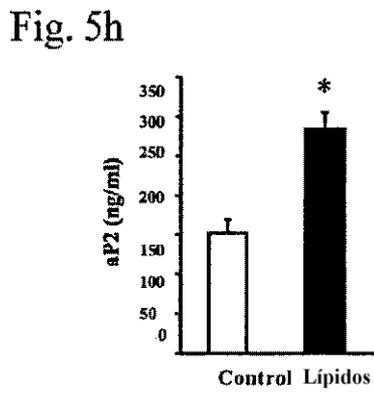
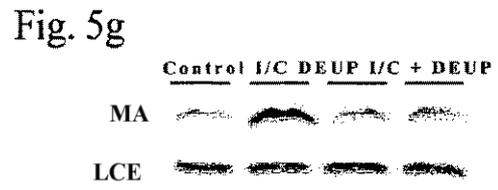
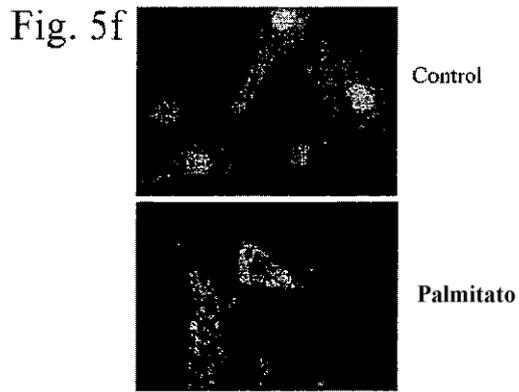


Fig. 6a

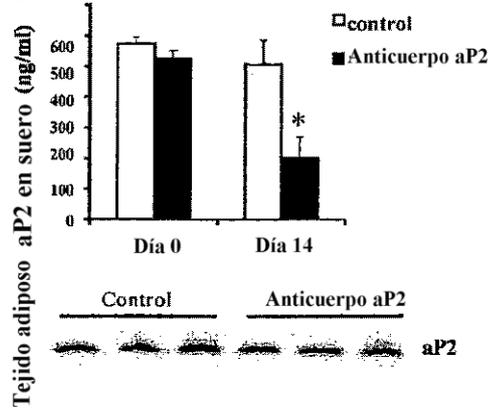


Fig. 6b

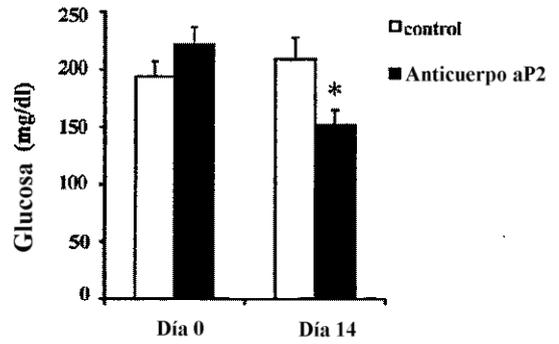


Fig. 6c

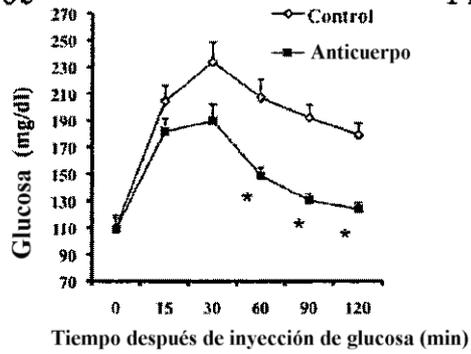


Fig. 6d

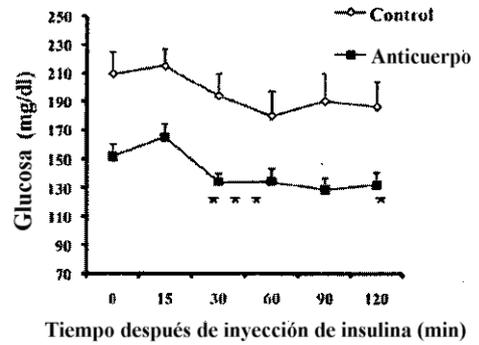


Fig. 6e

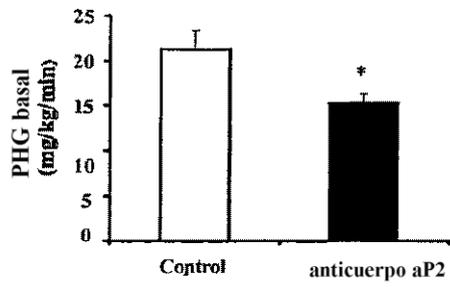


Fig. 6f

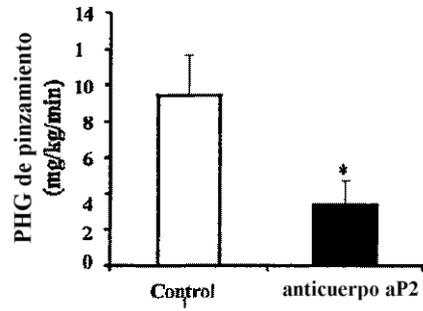


Fig. 6g

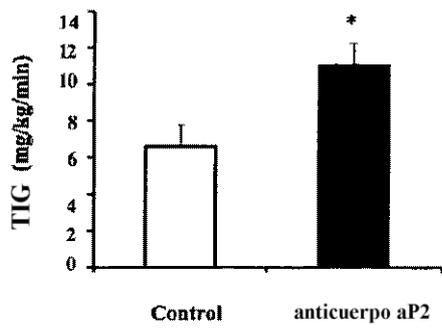


Fig. 6h

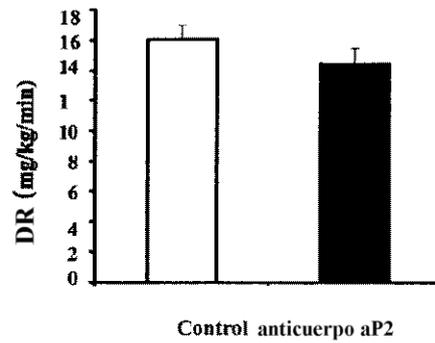


Fig. 6i

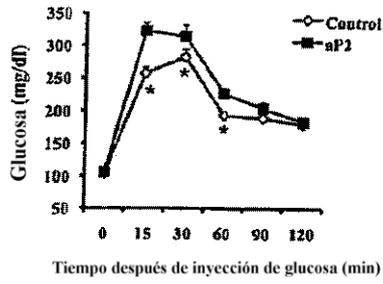


Fig. 6j

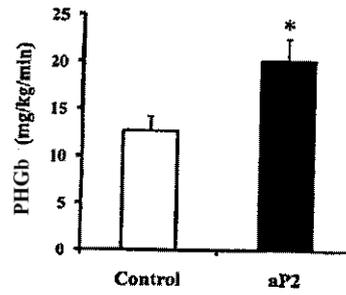


Fig. 6k

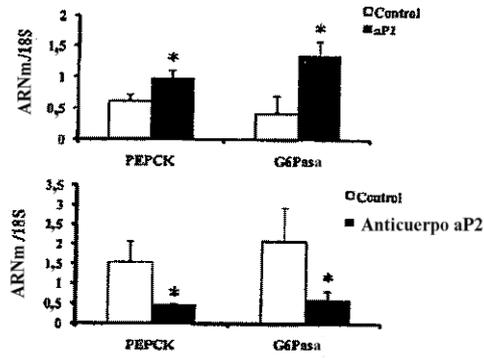


Fig. 7a

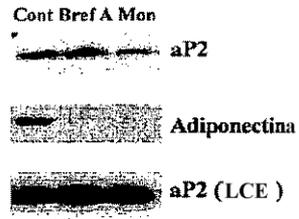


Fig. 7b

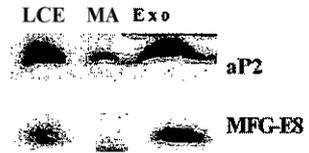


Fig. 7c

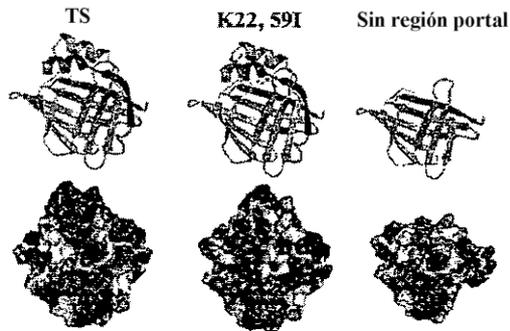


Fig. 7d

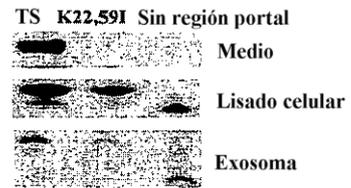


Fig. 7e

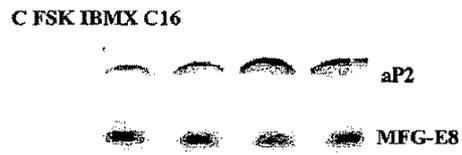
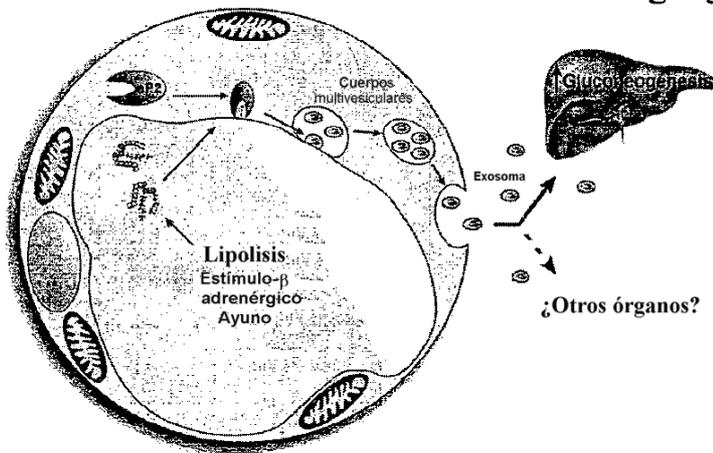
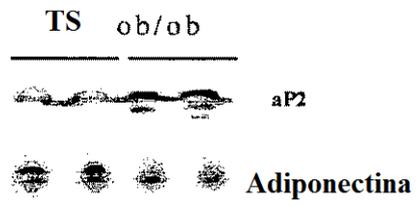


Fig. 7f



Fig. 7g





**Medio acondicionado de explantes grasos**

Fig. 8

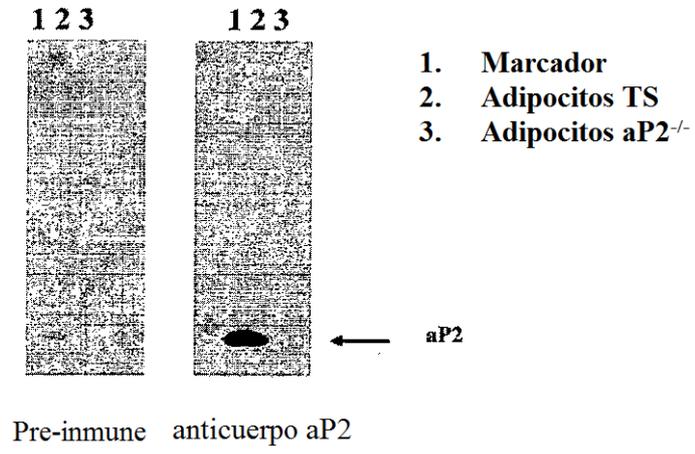


Fig. 9

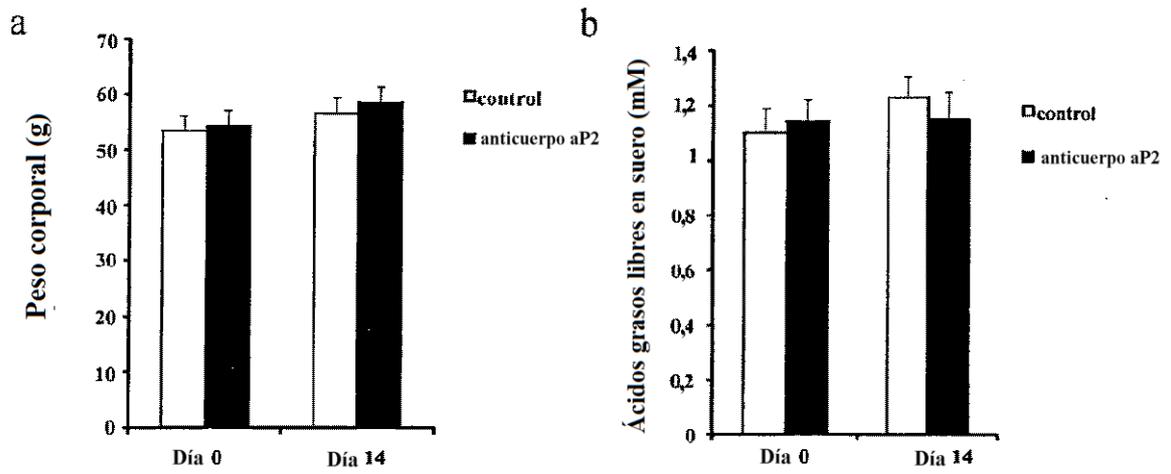


Fig. 10

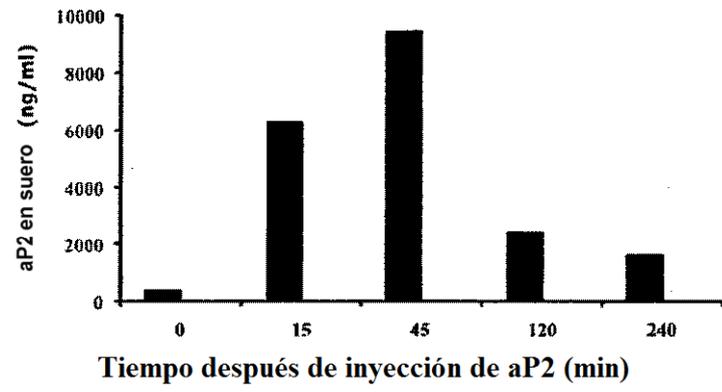


Fig. 11

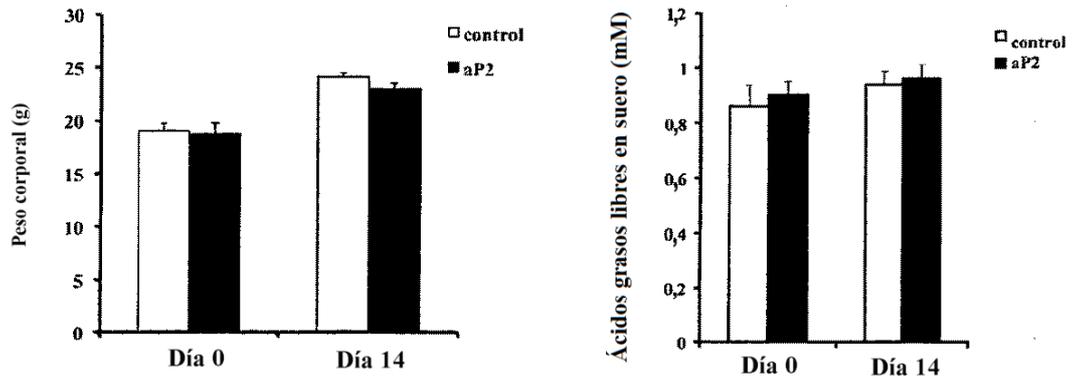


Fig 12

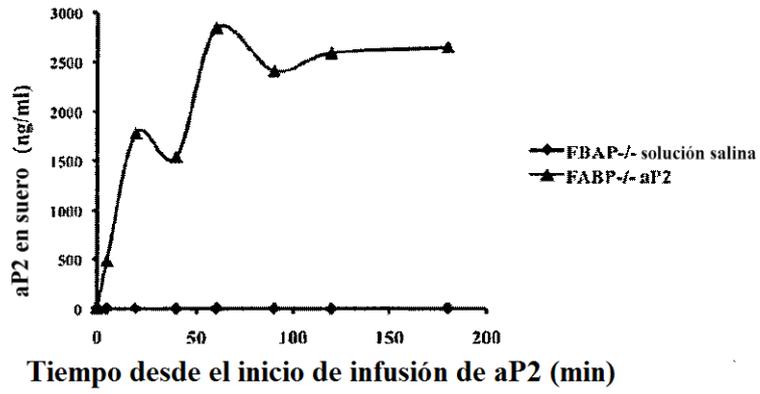


Fig. 13