

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 346**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12002914 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2657340**

54 Título: **Inhibidores de la proteína que interacciona con tioredoxina (TXNIP) para terapia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2017

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**KRAMMER, PETER, PROF. DR. ;
GÜLOW KARSTEN, DR. y
SASS, SABINE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 346 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

Inhibidores de la proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP) para terapia

La presente invención proporciona un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP) o (b) la expresión del gen que codifica TXNIP para uso en un método que mejora la fertilidad femenina.

La ciencia de prolongación de la vida, también conocida como medicina antienvjecimiento, gerontología experimental y gerontología biomédica, es el estudio de ralentizar o invertir los procesos de envejecimiento para ampliar tanto la esperanza de vida máxima como la promedio, incluyendo la prolongación y la mejora de la fertilidad femenina. Algunos investigadores en este campo, y "prolongadores de la vida" o "longevistas" creen que futuros avances en el rejuvenecimiento de tejidos con células madre, reparación molecular y el reemplazo de órganos (como con órganos artificiales o xenotrasplantes) permitirán eventualmente a los seres humanos tener una esperanza de vida y un periodo de fertilidad indefinidos a través de un rejuvenecimiento completo hasta un estado sano y juvenil. La venta de productos supuestamente antienvjecimiento, tales como de nutrición, buen estado físico, cuidado de la piel, reemplazo hormonal, vitaminas, suplementos y hierbas, es una industria global lucrativa, en la que el mercado de Estados Unidos genera cerca de 50 millones de \$ en ingresos cada año. Sin embargo, los expertos médicos afirman que no se ha mostrado que el uso de tales productos afecte al proceso de envejecimiento, y muchas afirmaciones de los defensores de la medicina antienvjecimiento han sido muy criticadas por expertos médicos, incluyendo la Asociación Médica Americana.

Deroo et al., Endocrinology, vol. 145, nº 12, págs. 5485-5492 (2004) describen que el sistema antioxidante de tiorredoxina en el útero de ratones está regulado por el estradiol.

Por lo tanto, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar medios para prolongar tanto el periodo de fertilidad máximo como el promedio.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP) o (b) la expresión del gen que codifica TXNIP para uso en un método que mejora la fertilidad femenina,

caracterizado porque dicho compuesto es

- (i) un oligonucleótido antisentido o shARN que reduce o inhibe la expresión del gen que codifica TXNIP, o
- (ii) un anticuerpo dirigido contra TXNIP o un fragmento del mismo, o
- (iii) una versión inactiva de TXNIP o secuencias de ácido nucleico que codifican una versión inactiva de TXNIP.

Además, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que mejora la fertilidad femenina, reduciendo o inhibiendo la actividad biológica de TXNIP o la expresión del gen que codifica TXNIP, que comprende las etapas de:

- (a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende TXNIP o el gen que codifica TXNIP; y
- (b) someter a ensayo una actividad biológica de TXNIP;

en donde una inhibición o pérdida de la actividad biológica de TXNIP es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

Uno de los principales factores que contribuyen al envejecimiento y a la pérdida de fertilidad femenina (que está considerada por muchos científicos como una "enfermedad") y al mal funcionamiento de un organismo, es la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas celulares, lo que contribuye a una pérdida de la función y una mayor mortalidad en la población envejecida (1). Durante los experimentos que dan como resultado la presente invención, se ha encontrado que la proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP) influye negativamente en el equilibrio redox y en la capacidad de defensa celular durante el envejecimiento. La proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP), también conocida como VDUP1 (proteína 1 regulada al alza con vitamina D₃) o TBP-2 (proteína 2 que se une a tiorredoxina) fue identificada originalmente como una proteína que se regulaba al alza después de un tratamiento con vitamina D₃ de las células de leucemia HL-60 (3,4). TXNIP es un regulador importante del estado redox celular mediante interacción e inhibiendo de este modo la función antioxidante de la tiorredoxina (TXN) (5,6). Además, se ha demostrado que TXNIP desempeña un papel en diversos estados patológicos, tales como enfermedades metabólicas, cardíacas e inflamatorias, así como el cáncer. TXNIP se considera como un supresor tumoral, ya sea mediante una inhibición de la proliferación y/o una inducción de la apoptosis (4, 7-9). También se observó un papel principal para TXNIP en el desarrollo de la diabetes. Se encontró que se hiperexpresaba en pacientes predia-

béticos y diabéticos, y que una falta de expresión de TXNIP estaba asociada con una función mejorada de las células β y la tolerancia a la glucosa (8,10). Además, la expresión de TXNIP inducida por glucosa estaba implicada en la activación del inflammasoma e inducía la secreción de la citocina proinflamatoria interleucina-1 β y, por lo tanto, favorecía la destrucción de las células β (11).

- 5 Los inventores han encontrado que la expresión de TXNIP es mucho mayor en varios tipos de células humanas de individuos ancianos, lo que ocasiona una disminución de la resistencia al estrés frente al estrés oxidativo. De manera significativa, una alteración de TXNIP en *Drosophila melanogaster* aumentaba la actividad antioxidante de la tioredoxina (TXN) y, por lo tanto, mejoraba la resistencia a la inanición y al estrés oxidativo. De forma remarcable, una carencia de TXNIP también prolongaba significativamente la esperanza de vida sana y al mismo tiempo mejoraba la puesta de huevos. Los resultados de la presente invención indican que una carencia de TXNIP prolonga la esperanza de vida sana e influye positivamente en la fertilidad femenina, demostrando de nuevo que la prolongación de la longevidad y la fecundidad no están reguladas exclusivamente de una manera opuesta (2). Los datos sugieren además que una expresión mejorada de TXNIP durante el envejecimiento, podría representar un mecanismo universal que afecta a la esperanza de vida, la resistencia frente al estrés y las enfermedades en los ancianos.
- 10
- 15 En resumen, la presente invención describe un nuevo papel para el regulador redox TXNIP en el control de la esperanza de vida sana y la resistencia frente al estrés oxidativo. Sin desear estar vinculado a una teoría, se cree que TXNIP disminuye la disponibilidad y la actividad de TXN y, por lo tanto, perjudica la homeostasis redox celular. Dado que el estrés oxidativo es uno de los principales factores que influyen en la acumulación de daños y el deterioro celular durante el proceso de envejecimiento, una contrarregulación de la expresión de TXNIP permitiría mejorar la capacidad de defensa celular (1,25). Por otra parte, los resultados de la presente invención no excluyen la posibilidad de que una expresión mejorada de TXNIP durante el envejecimiento también pueda influir en las funciones de TXNIP no dependientes de redox. De esta manera también podría afectar al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad y el deterioro de la función celular. Los hallazgos de que TXNIP se incrementa durante el envejecimiento, conectan bien con el aumento de las enfermedades relacionadas con la edad en los ancianos, tales como la diabetes. En concordancia, una expresión mejorada de TXNIP también se podía observar en pacientes con artritis reumatoide. Es concebible que una mayor expresión de TXNIP, que se ha observado en diversos tejidos humanos durante el envejecimiento, contribuirá al deterioro de varias enfermedades relacionadas con la edad. Por lo tanto, la esperanza de vida sana puede aumentar antagonizando la regulación al alza de TXNIP durante el envejecimiento.
- 20
- 25

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: Generación mejorada de ROS en los linfocitos T de individuos ancianos.

Los linfocitos T se aislaron a partir de sangre de donantes jóvenes (20 - 25 años) y ancianos (> 55 años).

- 35 **a:** Los linfocitos T de donantes ancianos muestran una mayor generación de ROS inducida por activación. Los linfocitos T primarios se tiñeron con diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) y el aumento de la "intensidad media de fluorescencia" (IMF) se analizó por FACS (n = 11 donantes jóvenes y 16 donantes ancianos, respectivamente, p < 0,001).
- b, c:** Los linfocitos T de individuos ancianos muestran un aumento de la expresión de TXNIP en las células no estimuladas, así como después de activar los TCR, tal y como se determinó por **(b)** qPCR (p < 0,001) o **(c)** transferencia Western.
- 40 **d:** La expresión de TXN disminuye ligeramente en los linfocitos T de individuos ancianos, tal y como se determinó por qPCR (n = 5 donantes jóvenes y n = 13 donantes ancianos, respectivamente, p < 0,01).
- e:** La actividad de TXN se reduce en los linfocitos T de individuos ancianos, tal y como se determinó mediante un ensayo de la actividad de TXN (p < 0,01).

Figura 2: Una regulación al alza de TXNIP mejora la generación de ROS y la susceptibilidad a la muerte celular

- 45 **a, b:** Células Jurkat transducidas de forma estable con un vector de expresión inducible para TXNIP o un vector de control (ctr), se dejaron sin tratar o se trataron con 1 μ g/ml de Dox durante 24 horas y la expresión de TXNIP se analizó mediante **(a)** qPCR, o **(b)** transferencia Western.
- c:** La expresión de TXNIP o de ctr fueron inducidas, mediante tratamiento con Dox durante 24 horas o las células se dejaron sin tratar. Después, las células se tiñeron con DCF y se analizó la liberación de ROS por citometría de flujo (p = 0,001).
- 50 **d:** La muerte celular se evaluó mediante una medición FSC/SSC por citometría de flujo después de la estimulación con anticuerpos α -CD3 unidos a la placa durante 24 horas (p = 0,02). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 3: La regulación a la baja de TXNIP reduce la generación de ROS y aumenta la resistencia frente al estrés.

- a, b:** Las células Jurkat fueron transducidas de forma estable con una estructura artificial de shARN inducible

contra TXNIP o un control revuelto (shCtr). Las células transducidas se incubaron con 1 µg/ml de Dox durante 24 horas y la expresión del ARNm de TXNIP se analizó mediante (a) qPCR y (b) niveles de proteína de TXNIP por transferencia Western, respectivamente.

5 **c:** Las células Jurkat transducidas de forma estable se dejaron sin tratar o se trataron con Dox durante 24 horas y posteriormente se estimularon con anticuerpos α-CD3 unidos a la placa durante 1 hora. Después, las células se tiñeron con DCF y la liberación de ROS se analizó por citometría de flujo (p = 0,006).

d: La muerte celular se evaluó mediante la medición FSC/SSC por citometría de flujo después de la estimulación con anticuerpos α-CD3 unidos a la placa durante 24 horas (p < 0,001).

10 **e:** Los linfocitos T de Jurkat se transdujeron de forma estable con un shARN contra TXNIP y su expresión se indujo mediante tratamiento con Dox (+ Dox) durante 24 horas o las células se dejaron sin tratar. Después, la muerte celular fue inducida por tratamiento con H₂O₂ 100 o 200 µM y la muerte celular se analizó mediante citometría de flujo en los puntos de tiempo indicados. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

15 Figura 4: Moscas carentes de TXNIP muestran una prolongación de la esperanza de vida, una resistencia mejorada frente al estrés y un aumento de la fertilidad femenina.

a: Aumento del peso corporal de moscas hembras adultas, carentes de TXNIP con 1 día de edad (media ± SEM, n = 40 moscas por grupo).

b: Moscas carentes de TXNIP muestran una prolongación de la esperanza de vida. Curvas de supervivencia de las moscas ctr y ARNi (p < 0,001, n = 200 moscas por grupo).

20 **c:** La carencia de TXNIP mejora la resistencia frente al estrés oxidativo. Curvas de supervivencia de moscas expuestas a paraquat 1 mM durante los tiempos indicados (n = 50 moscas por grupo).

d: Moscas carentes de TXNIP muestran una mayor resistencia al estrés por falta de alimento. Curvas de supervivencia de moscas con falta de alimento (n = 50 moscas por grupo).

25 **e:** Actividad mejorada de TXN en moscas carentes de TXNIP. Lisados de proteínas de moscas completas se sometieron a un ensayo de la actividad de TXN (n = 8 moscas por grupo, p = 0,01).

f: Moscas carentes de TXNIP muestran una mayor fertilidad. Los datos se presentan como el número medio de huevos puestos por hembra al día (± SD, p = 0,01). Se hizo un recuento de los huevos de 5 viales por grupo que contenían diez moscas por vial. Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente. Se muestra un experimento representativo.

30 Para todos los experimentos de supervivencia, se muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes.

Figura 5: La expresión de TXNIP se potencia en una variedad de tipos celulares

a: Los monocitos de donantes de sangre ancianos muestran una mayor expresión del ARNm de TXNIP, tal y como se determina por qPCR (p = 0,001).

35 **b:** El ARNm aislado a partir de hepatocitos de jóvenes y ancianos revela una mayor expresión de TXNIP en hepatocitos de donantes ancianos.

c: El análisis de matrices génicas de Affymetrix revela una expresión más elevada de TXNIP en las células madre mesenquimales y las células progenitoras hematopoyéticas, aisladas a partir de donantes ancianos.

40 **d:** Linfocitos T CD4⁺ aislados mediante MACS, de pacientes con artritis reumatoide muestran una mayor expresión de TXNIP analizada por qPCR (p = 0,04).

e: Los miembros de la familia arrestina ARRB1 y ARRB2 muestran una expresión del ARNm de TXNIP similar en los linfocitos T de donantes de sangre jóvenes (n = 8) y ancianos (n = 7), tal y como se determina por qPCR (p = 0,072 y 0,43, respectivamente).

Figura 6: Expresión incrementada de TXNIP en moscas de edad avanzada

45 **a, b:** Moscas TXNIP ARNi expresan niveles indetectables de TXNIP, tal y como se determina por cualquiera entre (a) qPCR o (b) transferencia Western. El ARN total fue extraído a partir del cuerpo completo de moscas adultas TXNIP ARNi (ARNi) y de controles (ctr) y la expresión génica se analizó mediante qPCR. Se prepararon lisados proteicos de moscas completas a partir de moscas ARNi o ctr y se realizó una inmunotransferencia frente a TXNIP o β-actina.

50 **c:** Apariencia y tamaño corporal de moscas hembras adultas ARNi y ctr, respectivamente.

d: Extractos de moscas completas se prepararon a partir de moscas hembras adultas con la edad indicada y se realizó una inmunotransferencia con anticuerpos contra TXNIP y β -actina, respectivamente.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la proteína que interacciona con tioredoxina (TXNIP) o (b) la expresión del gen que codifica TXNIP para uso en un método que mejora la fertilidad femenina,

caracterizada porque dicho compuesto es

- (i) un oligonucleótido antisentido o shARN que reduce o inhibe la expresión del gen que codifica TXNIP, o
- (ii) un anticuerpo dirigido contra TXNIP o un fragmento del mismo, o
- (iii) una versión inactiva de TXNIP o secuencias de ácido nucleico que codifican una versión inactiva de TXNIP.

10 Además, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que mejora la fertilidad femenina, reduciendo o inhibiendo la actividad biológica de TXNIP o la expresión del gen que codifica TXNIP, que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende TXNIP o el gen que codifica TXNIP; y

15 (b) someter a ensayo una actividad biológica de TXNIP;

en donde una inhibición o pérdida de la actividad biológica de TXNIP es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

20 Tal como se usa en este documento, "estrés oxidativo" significa un desequilibrio entre la producción y la manifestación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para eliminar fácilmente la toxicidad de los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Alteraciones en el estado redox normal de los tejidos pueden producir efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Algunas especies oxidativas reactivas pueden actuar incluso como mensajeros a través de un fenómeno denominado señalización redox. En los seres humanos, el estrés oxidativo está implicado en muchas enfermedades. Los ejemplos incluyen: anemia de células falciformes, aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome del cromosoma X frágil y síndrome de fatiga crónica. El estrés oxidativo a corto plazo también puede ser importante en la prevención del envejecimiento mediante la inducción de un proceso llamado mitohormesis.

25 La reducción o inhibición de la actividad biológica se puede realizar mediante una interacción o unión directa de un compuesto con TXNIP o mediante una interacción indirecta, por ejemplo, mediante la interacción con un compuesto que está asociado con la actividad biológica de TXNIP. La reducción o inhibición de la actividad biológica también se puede lograr mediante la aplicación de formas alteradas, por ejemplo, inactivas de TXNIP, preferiblemente en exceso.

30 Ejemplos de compuestos adecuados que reducen o inhiben la actividad biológica de TXNIP o la expresión del gen que codifica TXNIP con el objetivo de obtener un efecto terapéutico, son:

35 (a) plásmidos, vectores o virus naturales/sintéticos/mutados, oligonucleótidos con diferentes tipos de modificación (por ejemplo, PTO, LNA, 2'F-ANA, complejos de proteínas-nucleótidos, shARN ("ARN de horquilla pequeña" o "ARN de horquilla corta" que es una secuencia de ARN que forma un giro estrecho en forma de horquilla que se puede usar para silenciar la expresión de genes a través de ARN interferente), ARN_i, siARN o micro-_{mi}ARN, metilmetoxi-, fosforamidatos, PNA, morfolino, fosforamidato, ciclohexeno (CeNA), gapmeros, ribozimas, aptámeros, oligos de CpG, ADN-zimas, riboconmutadores o lípidos o moléculas que contienen lípidos;

(b) péptidos, complejos peptídicos que incluyen todos los tipos de enlazadores,

(c) moléculas pequeñas;

(d) anticuerpos y sus derivados, especialmente quimeras, fragmentos Fab, fragmentos Fc;

40 (e) vehículos, liposomas, nanopartículas, complejos o cualquier otro sistema de entrega que contiene las estructuras artificiales mencionadas anteriormente; o

(f) agentes oxidantes o agentes modificadores de sulfhidrilo (grupos SH).

Otros compuestos adecuados para los fines de la presente invención y métodos de cómo identificar/seleccionar tales compuestos, se describen con más detalle a continuación.

50 Preferiblemente, en una composición farmacéutica, tales compuestos como los descritos anteriormente se combinan

con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se entiende que incluye cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedador al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales y el compuesto activo se puede administrar al sujeto en una dosis efectiva.

Una "dosis efectiva" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para afectar al tratamiento deseado. Una "dosis efectiva" útil para tratamiento se puede determinar usando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase por ejemplo (12)).

La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar mediante diferentes vías, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia y del tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo de terapia, la salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo.

El experto en la técnica puede identificar fácilmente o generar compuestos útiles para los tratamientos de la presente invención, basándose en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de TXNIP y la secuencia de nucleótidos del gen que codifica esta proteína. Las secuencias respectivas se encuentran en la base de datos del NCBI (secuencia de referencia del NCBI: NP 006463.3)

De acuerdo con la presente invención, el compuesto útil para reducir o inhibir la expresión del gen que codifica TXNIP, es un oligonucleótido antisentido, shARN o siARN, específico de TXNIP.

La generación de oligonucleótidos antisentido adecuados incluye la determinación de un sitio o sitios dentro del gen que codifica TXNIP para que se produzca la interacción antisentido de forma que tenga lugar el efecto deseado, por ejemplo, la inhibición de la expresión de la proteína. Un sitio intragénico preferido es (a) la región que incluye el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen o (b) una región del ARNm que es un "bucle" o un "engrosamiento", es decir, que no forma parte de una estructura secundaria. Si se han identificado uno o varios sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, que se hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado. En el contexto de esta invención, "hibridación" significa enlace de hidrógeno, que puede ser un enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre nucleósidos o bases de nucleótidos complementarias. "Complementario", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran que son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por lo tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o un apareamiento preciso, de forma que tiene lugar una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido no tiene que ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana, para ser específicamente hibridable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto con la molécula diana de ADN o ARN interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar una unión no específica del compuesto antisentido con secuencias que no son diana, en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en el caso de un tratamiento terapéutico.

El experto en la materia puede generar compuestos antisentido, shARNs y siARNs de acuerdo con la presente invención, basándose en la secuencia de ADN conocida para TXNIP.

"Oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nucleicas de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen porciones que no son de origen natural que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren frecuentemente sobre las formas naturales, debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una captación celular mejorada, una afinidad mejorada hacia el ácido nucleico diana y una mayor estabilidad en presencia de nucleasas. Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida del compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, que incluyen pero no se limitan a miméticos de oligonucleótidos, tales como los que se describen a continuación. Los compuestos antisentido de acuerdo con esta invención comprenden desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 bases nucleicas (es decir, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 nucleósidos enlazados). Compuestos antisentido particularmente preferidos son los oligonucleótidos antisentido, incluso más preferiblemente los que comprenden

desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 bases nucleicas. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, secuencias guía externas (EGS), oligonucleótidos (oligozimas) y otros ARNs catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan con el ácido nucleico diana e inhiben su expresión.

5 Alternativamente, el compuesto de la invención es un vector que permite transcribir un oligonucleótido antisentido de la invención, por ejemplo, en un hospedador mamífero. Preferiblemente, un vector de este tipo es un vector útil para la terapia génica. Los vectores preferidos útiles para la terapia génica son vectores víricos, por ejemplo, adenovirus, virus herpes, vaccinia o, más preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Incluso más preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que se pueden emplear en la presente invención son: virus de la leucemia de Moloney murino (MoMuLV), virus del sarcoma de Harvey murino (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Lo más preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primateo no humano, tal como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), que proporciona una gama de hospedadores más amplia, en comparación con vectores murinos. Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere una ayuda con el fin de producir partículas infecciosas. Esta ayuda se puede proporcionar, por ejemplo, usando líneas celulares auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de la LTR. Las líneas celulares auxiliares adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable, de modo que se pueden identificar las células transducidas. Además, los vectores retrovirales se pueden modificar de tal manera que se convierten en dianas específicas. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la inserción de un polinucleótido que codifica un azúcar, un glicolípido o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para generar vectores específicos de la diana. Otros vectores y métodos adecuados para una terapia génica *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por las personas expertas en la técnica; véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/29469 o WO 97/00957.

25 En los casos en los que la expresión solo se debe producir en un órgano diana particular, las secuencias de ADN para la transcripción de los oligonucleótidos antisentido pueden estar enlazadas a un promotor específico de tejido y utilizarse para terapia génica. Tales promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo (26 a 29)).

30 Dentro de una estructura de oligonucleótido, los grupos fosfato se conocen comúnmente como los que forman la estructura principal internucleósida del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos, útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Las cadenas principales modificadas de oligonucleótidos que pueden dar como resultado una mayor estabilidad, son conocidas por la persona experta en la técnica, preferiblemente tal modificación es un enlace fosforotioato.

35 Un mimético de oligonucleótido preferido es un mimético de oligonucleótido que se ha observado que tiene excelentes propiedades de hibridación, y que se conoce como un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases nucleicas se conservan y se unen directa o indirectamente con átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal (véase, por ejemplo (30)).

40 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o varios restos de azúcar, sustituidos o modificados. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, el alqueno y el alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos. Un resto de azúcar modificado, particularmente preferido es un resto de azúcar 2'-O-metoxietilo.

45 Los oligonucleótidos de la invención también puede incluir modificaciones o sustituciones de bases nucleicas. Las bases nucleicas modificadas incluyen otras bases nucleicas sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, etc., prefiriéndose las sustituciones de 5-metilcitosina puesto que se ha observado que estas modificaciones aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

50 Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química del oligonucleótido con uno o varios restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano, un resto de palmitilo o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

55 La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, particularmente

oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado con el fin de conferir al oligonucleótido una mayor resistencia frente a la degradación por nucleasas, un aumento de la captación celular y/o un aumento de la afinidad de la unión hacia el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado una escisión de la diana de ARN, con lo que mejora en gran medida la eficacia de la inhibición oligonucleotídica de la expresión génica. En consecuencia, se pueden obtener frecuentemente resultados comparables con oligonucleótidos más cortos, cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente. Tales compuestos también se conocen en la técnica como híbridos o gámeros.

En una realización preferida, adicional de la presente invención, los compuestos para uso en un método de tratamiento son compuestos que reducen o inhiben la actividad biológica de TXNIP.

Ejemplos de compuestos capaces de reducir o inhibir la actividad biológica de TXNIP son anticuerpos (neutralizantes) dirigidos contra TXNIP o fragmentos del mismo que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión. El término "anticuerpo", preferiblemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como a preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de un antígeno que contiene, por ejemplo, un fragmento de TXNIP, por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo (31). Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" (Ac) o "anticuerpo monoclonal" (AcMo), se entiende que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener una unión no específica menor que un anticuerpo intacto (32). Por lo tanto, estos fragmentos se prefieren, así como los productos de un banco de expresión de FAB o de otras inmunoglobulinas. Además, los anticuerpos útiles para los fines de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

Alternativamente, los compuestos preferidos para los fines de la invención son versiones inactivas de TXNIP o secuencias de ácidos nucleicos que codifican versiones inactivas de TXNIP que se pueden introducir de acuerdo con los enfoques/vectores descritos anteriormente. Tales versiones inactivas pueden ser generadas de acuerdo con métodos de mutagénesis bien conocidos. Tales compuestos pueden tener un efecto terapéutico en el cuerpo humano, mediante el desplazamiento de su homólogo funcionalmente activo, en particular, cuando se aplican en exceso. Los análisis de versiones potencialmente inactivas de TXNIP se pueden llevar a cabo mediante un ensayo de una actividad biológica de TXNIP.

La presente invención también se refiere a un método para identificar un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de TXNIP y/o su expresión, para mejorar la fertilidad femenina, que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende TXNIP o su gen; y

(b) someter a ensayo una actividad biológica de TXNIP;

en donde una inhibición o pérdida de una actividad biológica de TXNIP, preferiblemente en comparación con un sistema de prueba en ausencia de dicho compuesto de la prueba, es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

Ejemplos de tales moléculas candidatas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. Tales moléculas se pueden diseñar racionalmente usando técnicas conocidas.

Preferiblemente, dicho sistema de prueba utilizado para la detección comprende sustancias con propiedades químicas y/o físicas similares, lo más preferiblemente, dichas sustancias son casi idénticas. Los compuestos que se pueden someter a ensayo e identificar de acuerdo con un método de la presente invención, pueden ser bancos de expresión, por ejemplo, genotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, ligandos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o similares.

El documento WO 98/25146 describe además métodos para escrutar bancos de complejos en busca de compuestos que tienen una propiedad deseada, especialmente, la capacidad de ser agonista, de unirse a o de ser antagonista de un polipéptido o de su receptor celular. Los complejos en tales bancos comprenden un compuesto sometido a ensayo, un marcador que señala al menos una etapa en la síntesis del compuesto y un enlace susceptible de ser modificado por una molécula informadora. La modificación del enlace se utiliza para indicar que un complejo contiene un compuesto que tiene una propiedad deseada. El marcador se puede descodificar para revelar al menos una etapa en la síntesis de un compuesto de este tipo. Otros métodos para identificar compuestos que interactúan con TXNIP o moléculas de ácido nucleico que codifican tales moléculas son, por ejemplo, el escrutinio *in vitro* con el

sistema de presentación en fagos, así como ensayos de unión a un filtro o una medición en "tiempo real" de una interacción.

El experto en la técnica también conoce bien que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, pueden actuar como un sustrato o ligando de TXNIP.

- 5 Todos estos métodos se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención para identificar un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de TXNIP.

El gen que codifica TXNIP también puede servir como una diana para el escrutinio de inhibidores. Los inhibidores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se unen al ARNm de los genes que codifican TXNIP, desestabilizando de este modo la conformación natural del ARNm y obstaculizando la transcripción y/o la traducción. Además, se describen métodos en la bibliografía para la identificación de moléculas de ácido nucleico, tales como un fragmento de ARN que imita la estructura de una molécula de ARN diana definida o sin definir, a la que se une un compuesto dentro de una célula, dando como resultado un retraso del crecimiento celular o la muerte celular; véase, por ejemplo, el documento WO 98/18947 y las referencias citadas en el mismo. Estas moléculas de ácido nucleico se pueden emplear para identificar compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para identificar dianas de ARN desconocidas para uso en el tratamiento de una afección. Estos métodos y composiciones se pueden utilizar para la identificación de compuestos útiles para reducir los niveles de expresión de TXNIP.

Por otra parte, los genes que codifican un regulador putativo de TXNIP y/o que ejercen sus efectos aguas arriba o aguas abajo de TXNIP, se pueden identificar usando, por ejemplo, mutagénesis por inserción utilizando, por ejemplo, vectores dirigidos a genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos también pueden ser derivados o análogos funcionales de inhibidores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser, por ejemplo, factores transactivadores que se unen a TXNIP o a secuencias reguladoras del gen que los codifican. La identificación de factores transactivadores se puede llevar a cabo utilizando métodos convencionales en la técnica. Para determinar si una proteína se une a la propia proteína o a secuencias reguladoras, se pueden llevar a cabo análisis convencionales naturales de cambio en gel. Con el fin de identificar un factor transactivador que se une a la proteína o a la secuencia reguladora, la proteína o la secuencia reguladora se puede utilizar como un reactivo de afinidad en métodos convencionales de purificación de proteínas o como una sonda para el escrutinio de un banco de expresión. También se puede conseguir la identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interaccionan con TXNIP, por ejemplo, tal y como se describe en (33) mediante el uso del sistema denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema, TXNIP está ligado al dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4. Una cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen indicador de lacZ dirigido por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con una genoteca de ADNc que expresará proteínas o péptidos vegetales del mismo, fusionados con un dominio de activación. Por lo tanto, si un péptido codificado por uno de los ADNc es capaz de interaccionar con el péptido de fusión que comprende un péptido de TXNIP, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen indicador. De esta manera, TXNIP y el gen que codifica TXNIP se pueden utilizar para identificar péptidos y proteínas que interaccionan con TXNIP. Es evidente para una persona experta en la técnica que este y otros sistemas similares, se pueden emplear adicionalmente para la identificación de inhibidores.

Los ejemplos siguientes explican la invención con más detalle.

Ejemplo 1

40 Materiales y métodos

(A) Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm SD, si no se indica lo contrario. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante pruebas t de Student de dos colas no pareadas. Se utilizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras para determinar la significación de las curvas de supervivencia. Una diferencia estadísticamente significativa se definía como * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

(B) Productos químicos

El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) se obtuvo en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). La ionomicina se adquirió en Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los demás productos químicos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania). Los anticuerpos conjugados con fluorocromo se compraron en BD Biosciences (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo monoclonal (OKT3) contra CD3 humano se preparó como se describe en (13).

(C) qPCR

El ARN total se aisló a partir de linfocitos T primarios, linfocitos T Jurkat o lisados de mosca completa con el mini kit RNeasy (Qiagen Hilden, Alemania) o el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió de forma inversa y la qPCR se realizó como se ha descrito previamente (15). El gen de mantenimiento GAPDH se utilizó como gen de control para la normalización. Las secuencias de los cebadores eran las

siguientes: *GAPDH*, 5'-GCA AAT TCC ATG GCA CCG T-3' y 5'-TCG CCC CAC TTG ATT TTG G-3'; *TXNIP*, 5'-TCA TGG TGA TGT TCA AGA AGA TC-3' y 5'-ACT TCA CAC CTC CAC TAT C-3'; *TXN*, 5'-GAC GCT GCA GGT GAT AAA C-3' y 5'-CTG ACA GTC ATC CAC ATC TAC-3'; *ARRB1*, 5'-AGT GGC CGT GGA ACT GCC CTT CA-3' y 5'-GGA ACT TCC CGA TGC GGG GGT TC-3'; *ARRB2*, 5'-GGG CAA GCG GGA CTT CGT AGA-3' y 5'-TGC GGT CCT TCA GGT AGT CAG GG-3'.

(D) Condiciones del cultivo celular y tratamientos

Las células Jurkat J16-145 se obtuvieron a partir de la línea celular linfoblastoide humana Jurkat J16 (13). Las células Jurkat se cultivaron en IMDM que contenía 10% de FCS. Linfocitos T periféricos humanos recién aislados, se cultivaron a una concentración de 2×10^6 células/ml en RPMI 1640 (+ l-glutamina) que contenía 10% de FCS. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Los ensayos se realizaron sobre células primarias que habían reposado durante una noche.

(E) Donantes de sangre

Se aislaron linfocitos T a partir de la sangre de donantes humanos sanos con una edad de 20 - 25 años (11 donantes jóvenes) y superior a 55 años (16 donantes ancianos). Se obtuvo un consentimiento por escrito de todos los sujetos antes de la inclusión en el estudio. El estudio se realizó de acuerdo con las normas éticas del Centro Alemán de Investigación Oncológica y la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética II de la Universidad Ruprecht-Karl de Heidelberg, Alemania.

(F) Aislamiento de los linfocitos T periféricos humanos

Los linfocitos T primarios humanos se purificaron como se describe en (13). La pureza de los linfocitos T preparados se verificó mediante tinción con anticuerpos anti-CD3 conjugados con PE, seguida por análisis de FACS.

(G) Evaluación de la muerte celular

La muerte celular se evaluó como la disminución en el perfil de dispersión frontal a lateral, en comparación con células vivas y se recalculó como "muerte celular específica", como se ha descrito previamente (13).

(H) Determinación de la generación de ROS

Las células se tiñeron con H₂DCF-DA (5 μM) durante 10 minutos. A continuación, se dividieron las células y, o bien se estimularon con anticuerpos anti-CD3 unidos a la placa (30 μg/ml) durante 1 h o no se trataron. Las células se lavaron dos veces con PBS helado y la generación de ROS se determinó por análisis FACS. La generación de ROS se cuantificó como el aumento en la intensidad de fluorescencia media (IFM), calculado como se ha informado anteriormente (14).

(I) Transferencia Western

Para el análisis de transferencia Western, se prepararon extractos de células completas a partir de células o moscas mediante lisis en tampón de lisis RIPA helado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 120 mM, 1% de NP-40, 0,5% de Nadesocolato, 0,1% de SDS, EDTA 2 mM, NaF 25 mM, NaVO₄ 0,2 mM, DTT 1 mM, y cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche) durante 30 min. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen Carlsbad, CA, EE.UU.), seguido de bloqueo en 5% de leche. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-TXNIP (1:10000, proporcionado por T. Dick), anti-actina (1:8000, Acris Herford, Alemania), anti-catalasa (1:10000, Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) y anti-TXN (1:10000) (una donación amable del Dr. T. Dick del German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania).

(J) Generación de linfocitos T Jurkat que hiperexpresan TXNIP inducible con doxiciclina (Dox)

El ADNc de TXNIP humano se amplificó a partir del vector de expresión de TXNIP, IOH42128-pEFDEST51 (Open Biosystems Heidelberg, Alemania) con la pareja de cebadores 5'-CCGGAATTCATGGTATGTTCAAGAAGATCAAG-3' y 5'-CGGGGTACCTCACTGCACATTGTTGTTGAGG-3', y se clonó en pRev-TRE-Tight (Clontech, EE.UU.). Los retrovirus se generaron mediante transfección de células Phoenix con pRev-TRE-TXNIP. Las células Jurkat M2, que albergaban el transactivador dependiente de Dox, se infectaron y se cultivaron en medio complementado con 100 μg/ml de higromicina durante 7 días. Las células resultantes se subclonaron dos veces y se escrutaron en busca de expresión de TXNIP inducible con Dox, mediante transferencia Western.

(K) Atenuación génica de TXNIP estable en lentivirus

Para la producción de las partículas de lentivirus, células HEK293T tratadas previamente con cloroquina 25 μM durante 1 hora, se transfectaron con vectores que contenían el shARN contra TXNIP (Open Biosystems, Heidelberg) y una mezcla de plásmidos para *gag*, *pol*, *env* y *VSV-G* para la pseudotipificación. Ocho horas después de la transfección, se reemplazó el medio de las células de empaquetamiento. Después de dos días, el material sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 μm, complementado con polibreno (8 μg/ml). Se infectaron 1×10^5 células

diana mediante inoculación con 1 ml de material sobrenadante vírico. Las células Jurkat transducidas de forma estable fueron seleccionadas por resistencia a la puromicina (1 µg/ml de puromicina) y la expresión de shARN dependiente de Dox se controló mediante transferencia Western.

(L) Ensayo de la actividad de TXN

- 5 El análisis de la actividad de TXN se evaluó en lisados proteicos de linfocitos T primarios y moscas completas.

(M) Existencias de *Drosophila* y mantenimiento

Para la atenuación génica de TXNIP mediada por ARNi en las moscas, w¹¹⁸; se obtuvieron moscas hembras P(GD4976)y15203 a partir del “Vienna *Drosophila* RNAi Center” (VDRC, Viena, Austria) y se cruzaron con machos *tubGal4* proporcionados por B. A. Edgar. Las moscas se criaron a 25°C en medio estándar.

10 (N) Análisis de la fertilidad en *Drosophila*

Para el análisis del comportamiento de la puesta de huevos, 10 hembras recién eclosionadas (el día 3 después de la eclosión) y cinco machos (el día 3 después de la eclosión) se juntaron en viales y se colocaron sobre placas de agar que contenían zumo de uva, durante 24 horas. Se hizo un recuento del número de huevos puestos por cada hembra en las placas de agar.

15 (O) Estudios de la esperanza de vida en *Drosophila*

Moscas que habían eclosionado recientemente se mantuvieron a 25°C en viales (10 moscas por vial; los machos y las hembras estaban separados) que contenían alimento convencional. Cada 2-3 días, las moscas fueron transferidas a viales de nuevo aporte y se registraron las moscas muertas.

Ejemplo 2

20 **Generación mejorada de ROS en linfocitos T de individuos ancianos**

Anteriormente se ha mostrado que las señales oxidativas tienen un papel importante en la regulación de una respuesta inmune mediada por linfocitos T (13-15). Para analizar los cambios relacionados con la edad en la generación de ROS, se aislaron linfocitos T primarios procedentes de individuos ancianos (> 55 años) y jóvenes (20 - 25 años) y la generación de ROS inducida por activación se comparó entre estos dos grupos. Sorprendentemente, se observó un aumento de la producción de ROS en los linfocitos T de donantes ancianos después de la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR) (Fig. 1a). En busca de moléculas que regulaban ROS en los individuos ancianos, se identificó una mejora significativa de la expresión de la TXNIP reguladora redox negativa en los linfocitos T de individuos ancianos, en el ARNm, así como a nivel de proteínas (Fig. 1b, c). Una regulación a la baja completa inducida por activación que se observó después de estimular los TCR en linfocitos T de donantes jóvenes, no era tan eficaz como en los linfocitos T de los ancianos. En consecuencia, la expresión de TXNIP restante podría impedir una activación adecuada de las células, ya que se observó que una regulación a la baja era necesaria para la captación de glucosa y el crecimiento celular asociado (16). Investigaciones consecutivas mostraron un aumento de la expresión en varios tipos de células primarias, es decir, monocitos, hepatocitos y también en células madre mesenquimales o células madre hematopoyéticas de individuos ancianos (Figura 5a, b, c). Esto es coherente con un informe anterior que muestra una expresión mejorada de TXNIP en las cortezas de los individuos ancianos (17). Por otra parte, también se han encontrado mayores niveles de TXNIP en linfocitos T CD4⁺ de pacientes con artritis reumatoide (Figura 5d), en donde el sistema inmune está asociado con un fenotipo de envejecimiento acelerado (18). Curiosamente, un análisis del principal ligando de la interacción con TXNIP, tioredoxina (TXN), reveló una regulación a la baja de la expresión de TXN en los linfocitos T de individuos ancianos (Fig. 1c, d). En consecuencia, se observó una reducción significativa de la actividad de TXN en linfocitos T aislados a partir de donantes ancianos, en comparación con donantes jóvenes (Fig. 1e). Estos datos muestran que una expresión elevada de TXNIP está asociada con una disminución de la capacidad antioxidante de TXN en los linfocitos T de individuos ancianos.

Ejemplo 3

La regulación al alza de TXNIP mejora la generación de ROS y la susceptibilidad a muerte celular

45 Para examinar el papel de TXNIP en los linfocitos T, se empleó el uso de un sistema de hiperexpresión inducible de TXNIP en la línea celular modelo humano de linfocitos T Jurkat. La expresión de TXNIP se indujo mediante la aplicación de 1 µg/ml de doxiciclina (Dox) durante 24 horas en aproximadamente dos veces (Fig. 2a, b). En línea con los resultados obtenidos en los linfocitos T de individuos ancianos, la hiperexpresión inducida de TXNIP conducía a un aumento significativo en la liberación de ROS inducida por activación después de la activación con CD3 durante 1 hora (Fig. 2c). Para el mantenimiento de la homeostasis normal de los linfocitos T, la eliminación de los linfocitos T específicos de antígeno después de una respuesta inmune es crucial. Esto se consigue mediante la activación de la muerte celular inducida por activación (AICD) a través de las vías de la apoptosis, después de una reestimulación del TCR (19, 20). Aquí, las señales oxidativas activadas por TCR tienen un papel importante en el control de la inducción de AICD (13). Por lo tanto, se investigó el efecto de una expresión de TXNIP mejorada sobre la AICD. Célu-

las Jurkat inducidas con TXNIP se estimularon con anticuerpos α -CD3 unidos a la placa durante 24 horas para inducir la AICD. Como se muestra en la Fig. 2d, la hiperexpresión de TXNIP conducía a un aumento significativo de la AICD. En conjunto, estos resultados muestran que una expresión mejorada de TXNIP influye en la liberación de ROS inducida por activación y la muerte celular en linfocitos T Jurkat.

5 Ejemplo 4

La regulación a la baja de TXNIP reduce la generación de ROS y mejora la resistencia al estrés

Para investigar el efecto de la regulación a la baja de TXNIP, se utilizó un sistema de shARN inducible. La incubación con Dox durante 24 horas inducía la expresión del shARN de TXNIP y, en consecuencia, conducía a la regulación a la baja de los niveles de ARNm y de proteína de TXNIP (Fig. 3a, b). Se encontró que la pérdida de expresión de TXNIP en los linfocitos T Jurkat disminuía la tasa de generación de ROS inducida por activación después de la activación con anticuerpos agonistas para CD3, en comparación con las células de control o células no inducidas (Fig. 3c). Estos resultados se corresponden con los datos observados para los linfocitos T primarios, ya que niveles más bajos de TXNIP en donantes jóvenes están correlacionados con una menor generación de ROS inducida por activación. A continuación, se investigó el efecto de la regulación a la baja de TXNIP sobre la inducción de AICD. Después de la inducción del shARN específico contra TXNIP mediante tratamiento con Dox, las células Jurkat fueron estimuladas con anticuerpos α -CD3 unidos a la placa durante 24 horas y se analizó la muerte celular. En comparación con las células de control transducidas o no inducidas, la regulación a la baja específica de TXNIP conducía a una reducción significativa de la AICD (Fig. 3d) lo que muestra, además, que la expresión de TXNIP participa en la regulación de la muerte celular en las células inmunes. Para acentuar aún más estos hallazgos, se analizó la inducción de la muerte celular a través de diversos estímulos después de una regulación a la baja específica de TXNIP, empleando citometría de flujo. En línea con los resultados obtenidos con los linfocitos T primarios de donantes jóvenes frente a donantes ancianos (Fig. 1f), la regulación a la baja específica de TXNIP conducía a una mejora de la supervivencia después de la inducción del estrés oxidativo mediante tratamiento con H_2O_2 (Fig. 3e). Sin embargo, la inducción de la muerte celular a través de otros factores de estrés celulares, como la estaurosporina o CD95, activados por anticuerpos agonistas, no mostraba niveles alterados de inducción de muerte celular si TXNIP se regulaba a la baja o no (datos no mostrados), lo que indica que las vías de señalización proximales dependientes de ROS, aguas arriba de la transcripción de CD95L, están afectadas por TXNIP. En conjunto, estos datos sugieren que TXNIP atenuada génicamente en linfocitos T Jurkat, no solo afectaba al equilibrio redox, sino que también aumentaba la resistencia a la inducción de muerte celular después del estrés oxidativo.

30 Ejemplo 5

Moscas carentes de TXNIP muestran una prolongación de la esperanza de vida, una mejora de la resistencia al estrés y un aumento de la fertilidad femenina

Para analizar si TXNIP es un marcador cuya expresión se correlaciona con la edad o si TXNIP es un regulador crucial de la esperanza de vida, se investigó la función de TXNIP *in vivo*. El genoma de *Drosophila* contiene un homólogo de TXNIP humana con una similitud global de aproximadamente el 47%. En *Drosophila*, se había descrito que tiene una función en el desarrollo del sistema nervioso (21,22). Se crearon moscas carentes de TXNIP mediante el cruce de moscas con ARNi *UAS-TXNIP* con conductores *tubulina-GAL4* que llevaban a una regulación a la baja ubicua de TXNIP. El ARNi para TXNIP daba lugar a una marcada reducción de la expresión de TXNIP, tal y como se determinó mediante qPCR y transferencia Western (Fig. 6a, b). Un examen macroscópico de las moscas mostró que las moscas carentes de TXNIP son más grandes (Fig. 6c). Esto también se reflejaba en un mayor peso corporal de las moscas carentes de TXNIP, en comparación con las moscas de control (Fig. 6a). Ya que se observó una regulación al alza de la expresión de TXNIP en varios tipos de células humanas, se planteó si las moscas ancianas de control también mostraban niveles de TXNIP más altos, en comparación con las moscas jóvenes. De hecho, una inmunotransferencia de extractos de proteínas de moscas completas procedentes de las moscas de control, reveló un aumento significativo de la expresión de la proteína TXNIP en moscas con una edad de 47 días, en comparación con las moscas jóvenes el día 1 después del nacimiento. Las moscas carentes de TXNIP no tienen una expresión proteica durante toda la vida, lo que confirma una atenuación génica de TXNIP muy eficaz (Fig. 6d). A continuación, se investigó si TXNIP también tiene un papel esencial en la resistencia frente a diversos inductores de estrés, análoga a la que se había observado en los linfocitos T Jurkat carentes de TXNIP. Por lo tanto, se sometió a ensayo la supervivencia de las moscas carentes de TXNIP bajo privación de alimentos y tratamiento con paraquat, un inductor del estrés oxidativo. Las moscas se transfirieron a viales solo de agar para los ensayos de privación de alimentos o a agar complementado con paraquat 1 mM para la prueba de resistencia al estrés oxidativo. Una carencia de TXNIP aumentaba notablemente la supervivencia de las moscas tanto con privación de alimento como bajo exposición a paraquat (Fig. 4b, c). Por otra parte, correspondiendo a datos *in vitro*, la carencia de TXNIP causaba un aumento de la actividad de TXN en lisados proteicos de moscas completas (Fig. 4d), afectando de este modo también a la capacidad antioxidativa de *Drosophila*. Con el fin de investigar si la carencia de TXNIP está implicada directamente en la regulación del envejecimiento, se determinó la esperanza de vida en moscas carentes de TXNIP y en controles. Sorprendentemente, se observó que la alteración genética de TXNIP prolonga significativamente la esperanza de vida sana de machos y hembras de *Drosophila*, indicando una función de TXNIP como regulador crucial de la esperanza de vida. La esperanza de vida media aumentaba un 18% en moscas hembras con ARNi para TXNIP, mientras que la esperanza de vida máxima aumentaba en un 5% ($p < 0,01$) en moscas machos con ARNi y un 13% ($p <$

0,001) en las hembras, en comparación con las moscas de control, respectivamente (Fig.4e). En concordancia con estos datos, los estudios anteriores también han indicado diferencias en la prolongación de la esperanza de vida entre organismos de sexo femenino y masculino (23, 24). Por lo tanto, esto identifica a TXNIP como un regulador directo de la esperanza de vida *in vivo*. Además, se observó un aumento de la fertilidad femenina, según lo determinado por la frecuencia de puesta de huevos después de la inhibición de la expresión de TXNIP. Las moscas carentes de TXNIP mostraban un aumento de hasta el 30% en la puesta de huevos dentro del período de tiempo observado de 24 horas (Fig. 4f). Estos datos indican que la carencia de TXNIP conduce a un desacoplamiento de la esperanza de vida y la fertilidad, como también se observa después del tratamiento con rapamicina en *Drosophila* en un informe anterior (23). En conjunto, los fenotipos descritos anteriormente muestran una función de TXNIP no solo en la regulación del envejecimiento y la longevidad de las moscas, sino también en el control de la resistencia al estrés y la fertilidad.

Lista de referencias

1. Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495, (2005).
2. Grandison, R. C., Piper, M. D. & Partridge, L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462, 1061-1064, (2009).
3. Chen, K. S. & DeLuca, H. F. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* 1219, 26-32, (1994).
4. Han, S. H. et al. VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene* 22, 4035-4046, (2003).
5. Nishiyama, A. et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 274, 21645-21650, (1999).
6. Junn, E. et al. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* 164, 6287-6295, (2000).
7. Chen, C. L. et al. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* 111, 4365-4374, (2008).
8. Chen, J., Saxena, G., Mungrue, I. N., Lusic, A. J. & Shalev, A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 57, 938-944, (2008).
9. Zhou, J., Yu, Q. & Chng, W. J. TXNIP (VDUP-1, TBP-2): A major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*, (2011).
10. Gokulakrishnan, K., Mohanavalli, K. T., Monickaraj, F., Mohan, V. & Balasubramanyam, M. Subclinical inflammation/oxidation as revealed by altered gene expression profiles in subjects with impaired glucose tolerance and Type 2 diabetes patients. *Mol Cell Biochem* 324, 173-181, (2009).
11. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136-140, (2010).
12. Fingl et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman y Gilman, compiladores. Macmillan Publishing Co., New York, págs. 1-46 ((1975).
13. Gulow, K. et al. HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J Immunol* 174, 5249-5260, (2005).
14. Kaminski, M., Kiessling, M., Suss, D., Krammer, P. H. & Gulow, K. Novel role for mitochondria: protein kinase C-theta-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol* 27, 3625-3639, (2007).
15. Kaminski, M. M. et al. Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J Immunol* 184, 4827-4841, (2010).
16. Elgort, M. G., O'Shea, J. M., Jiang, Y. & Ayer, D. E. Transcriptional and Translational Downregulation of Thioredoxin Interacting Protein Is Required for Metabolic Reprogramming during G(1). *Genes Cancer* 1, 893-907, (2010).
17. Papadia, S. et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11, 476-487, (2008).
18. Weyand, C. M., Fujii, H., Shao, L. & Goronzy, J. J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 583-588, (2009).

19. Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M. & Krammer, P. H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441, (1995).
20. Bouillet, P. & O'Reilly, L. A. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 9, 514-519, (2009).
- 5 21. Mandalaywala, N. V. et al. The tumor suppressor, vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1), functions downstream of REPO during *Drosophila* gliogenesis. *Dev Biol* 315, 489-504, (2008).
22. Chang, S., Mandalaywala, N. V., Snyder, R. G., Levendusky, M. C. & Dearborn, R. E., Jr. Hedgehog-dependent downregulation of the tumor suppressor, vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1), precedes lamina development in *Drosophila*. *Brain Res* 1324, 1-13, (2010).
- 10 23. Bjedov, I. et al. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 11, 35-46, (2010).
24. Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321-326, (2010).
25. Watanabe, R., Nakamura, H., Masutani, H. & Yodoi, J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther* 127, 261-270, (2010).
- 15 26. Zimmermann et al., (1994) *Neuron* 12, 11-24.
27. Vidal et al., (1990) *EMBO J.* 9, 833-840.
28. Mayford et al., (1995), *Cell* 81, 891-904.
29. Pinkert et al., (1987) *Genes & Dev.* 1, 268-76.
30. Nielsen et al., *Science* 254 (1991), 1497-1500.
- 20 31. Köhler et al., *Nature* 256 (1975), 495.
32. Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983).
33. Scofield, *Science* 274 (1996), 2063-2065.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la proteína que interacciona con tiorredoxina (TXNIP) o (b) la expresión del gen que codifica TXNIP para uso en un método que mejora la fertilidad femenina, caracterizado porque dicho compuesto es

- 5 (i) un oligonucleótido antisentido o shARN que reduce o inhibe la expresión del gen que codifica TXNIP, o
 (ii) un anticuerpo dirigido contra TXNIP o un fragmento del mismo, o
 (iii) una versión inactiva de TXNIP o secuencias de ácido nucleico que codifican una versión inactiva de TXNIP.

2. Un método para identificar un compuesto que mejora la fertilidad femenina reduciendo o inhibiendo la actividad biológica de TXNIP o la expresión del gen que codifica TXNIP, que comprende las etapas de:

- 10 (a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende TXNIP o el gen que codifica TXNIP; y
 (b) someter a ensayo una actividad biológica de TXNIP;

en donde una inhibición o una pérdida de la actividad biológica de TXNIP es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que la inhibición o la pérdida de la actividad biológica de TXNIP se determina mediante comparación con un sistema de prueba caracterizado por la ausencia de dicho compuesto de prueba.

Figura 1

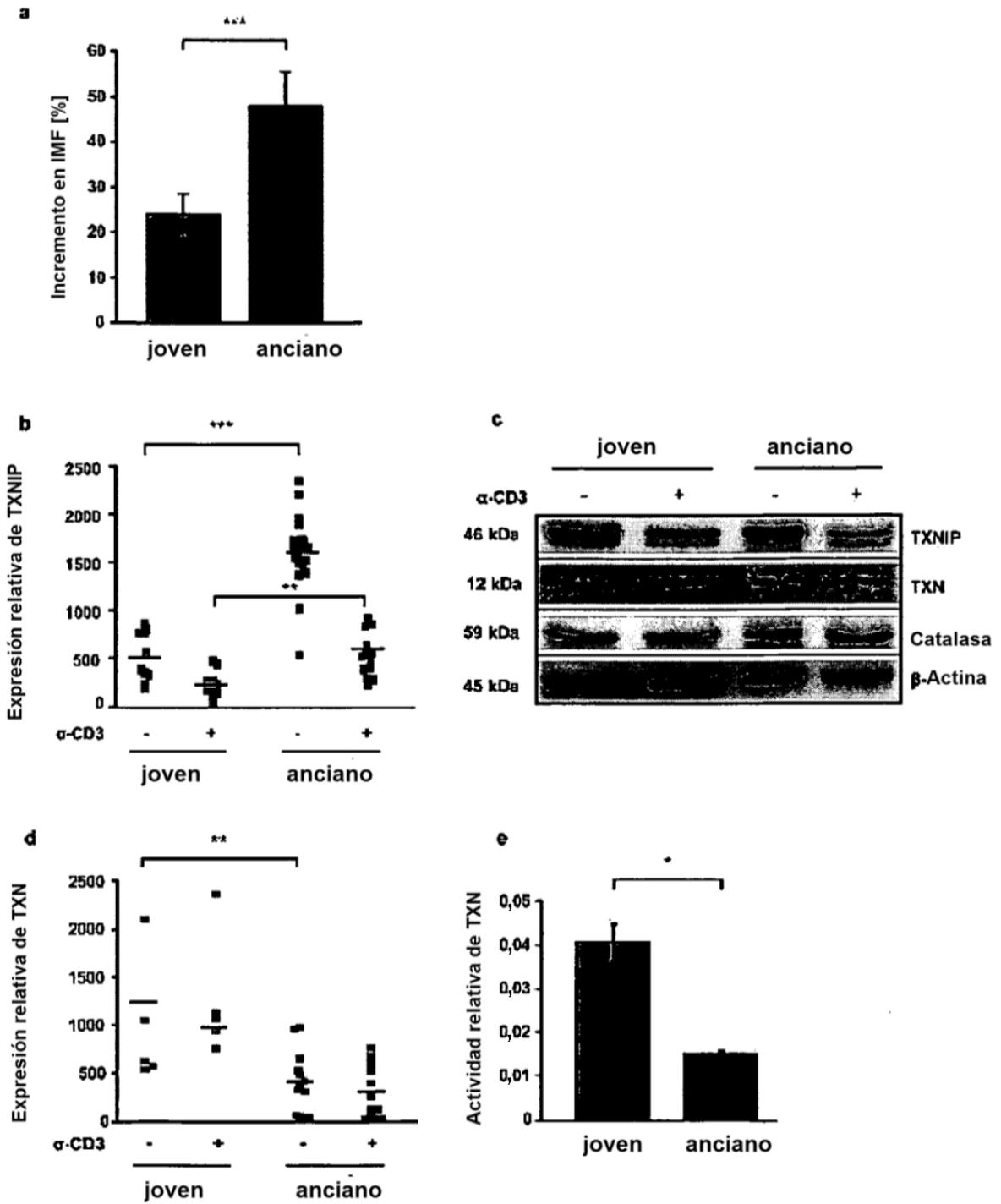


Figura 1

Figura 2

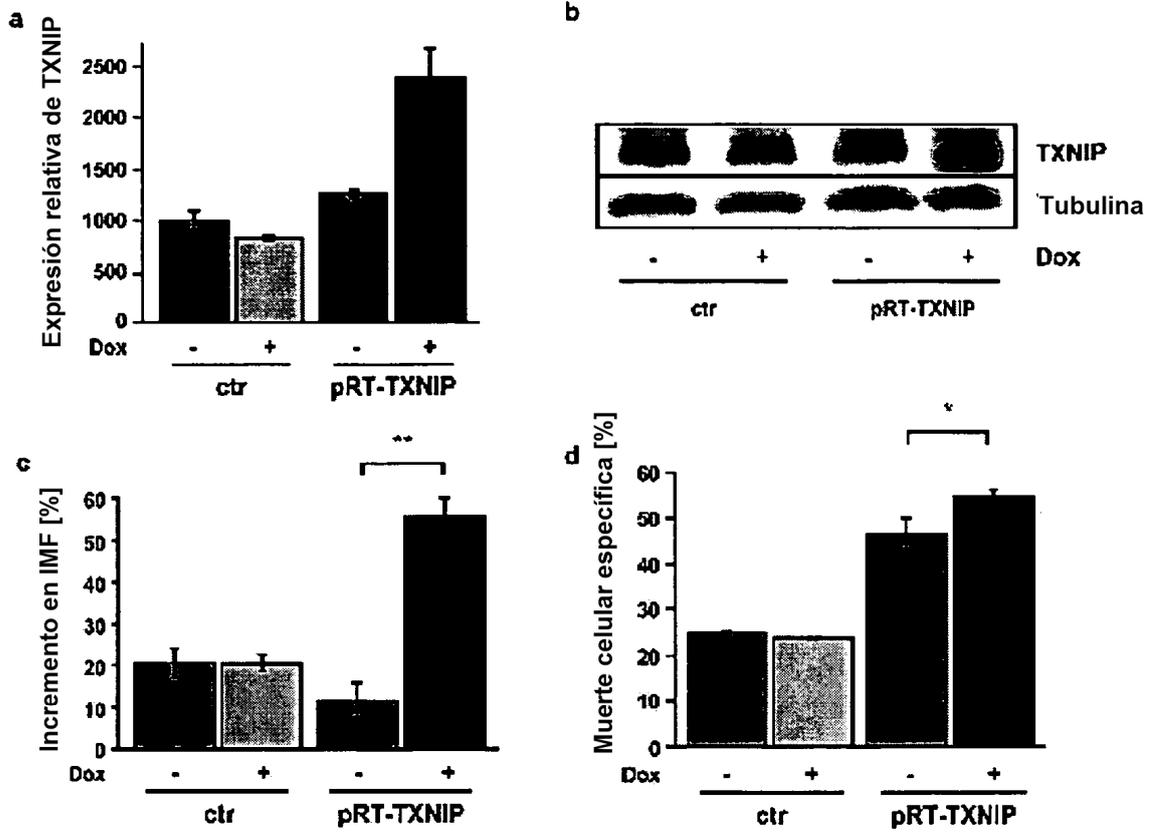


Figura 2

Figura 3

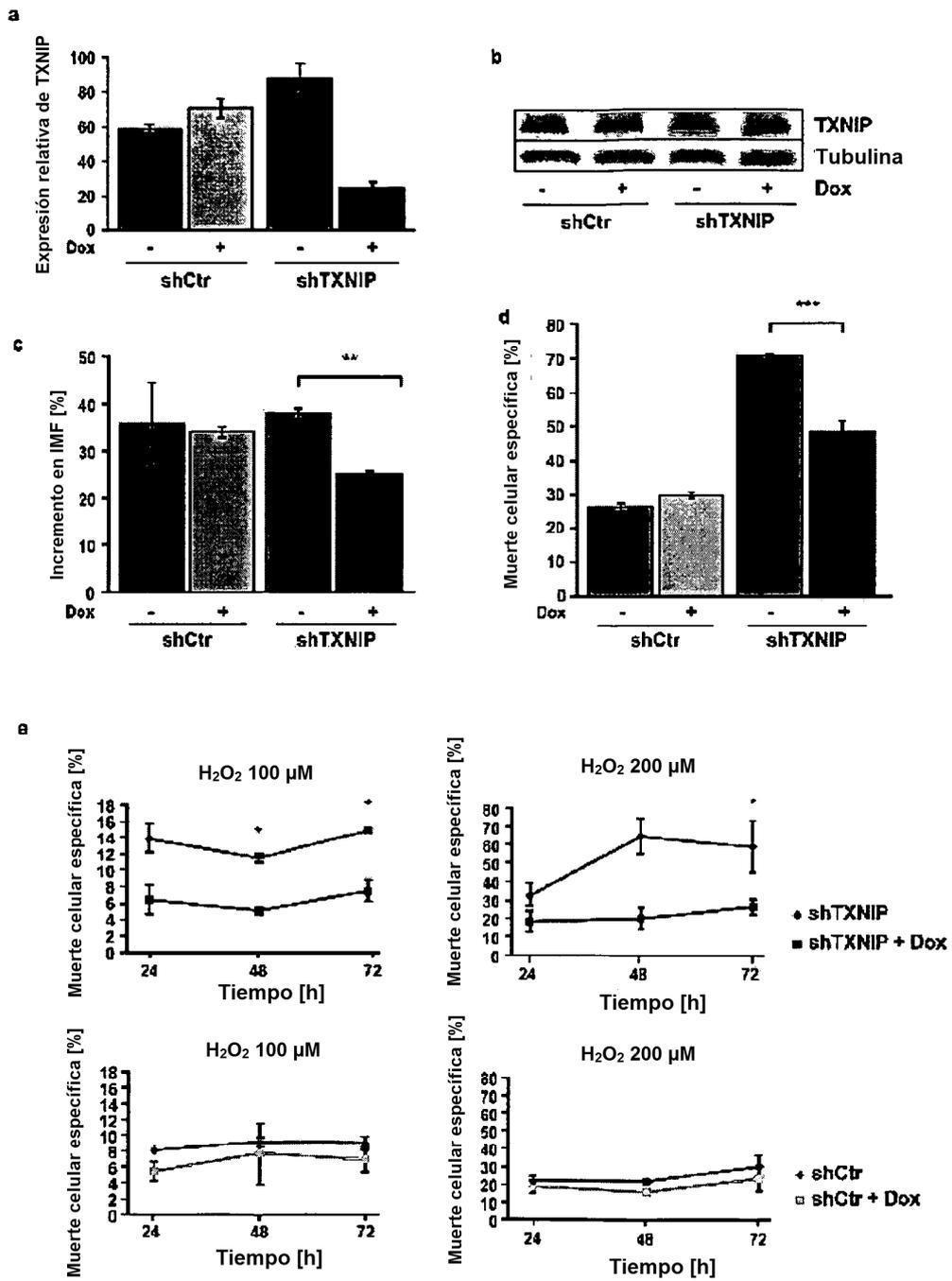


Figura 4

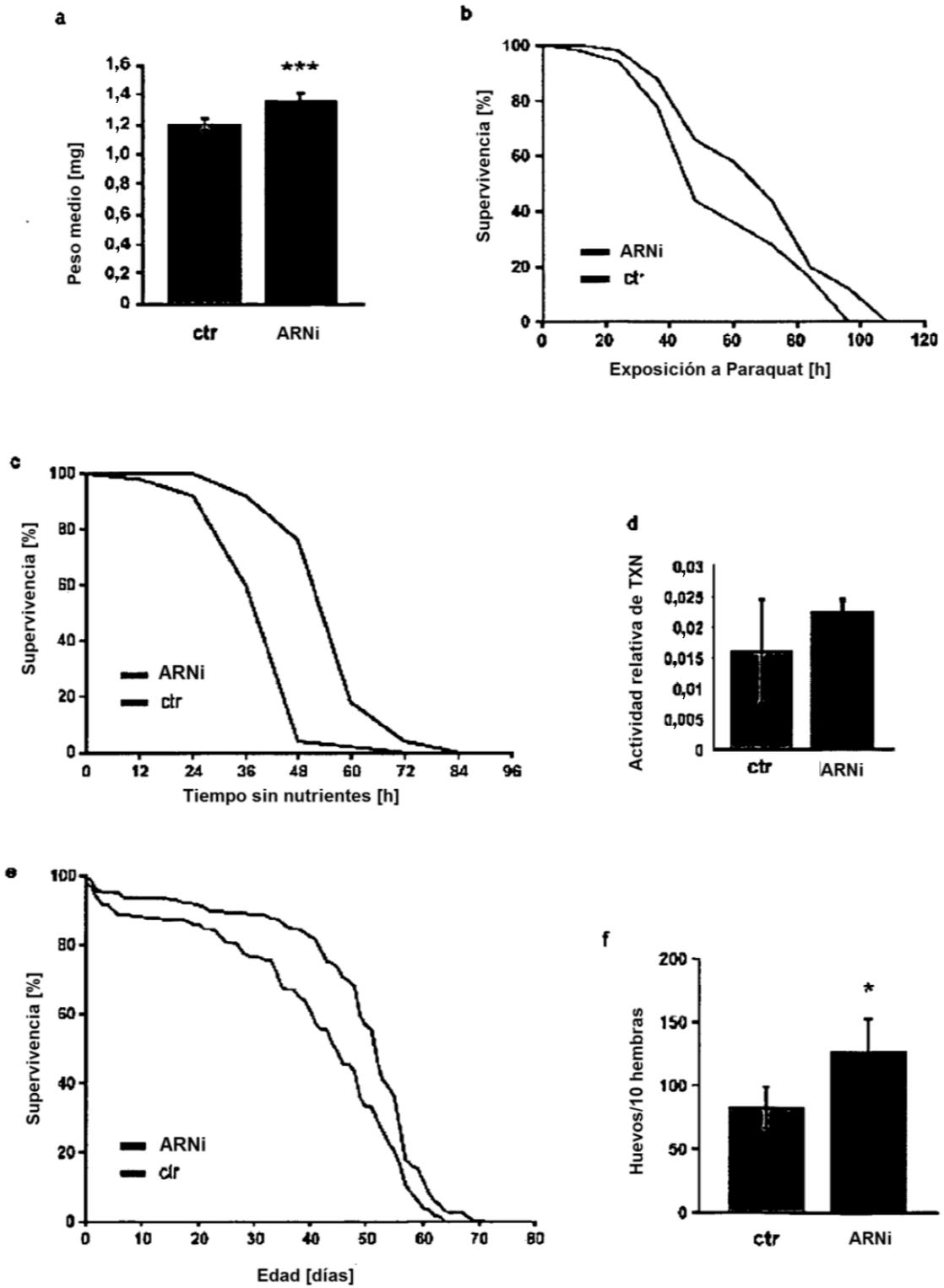


Figura 4

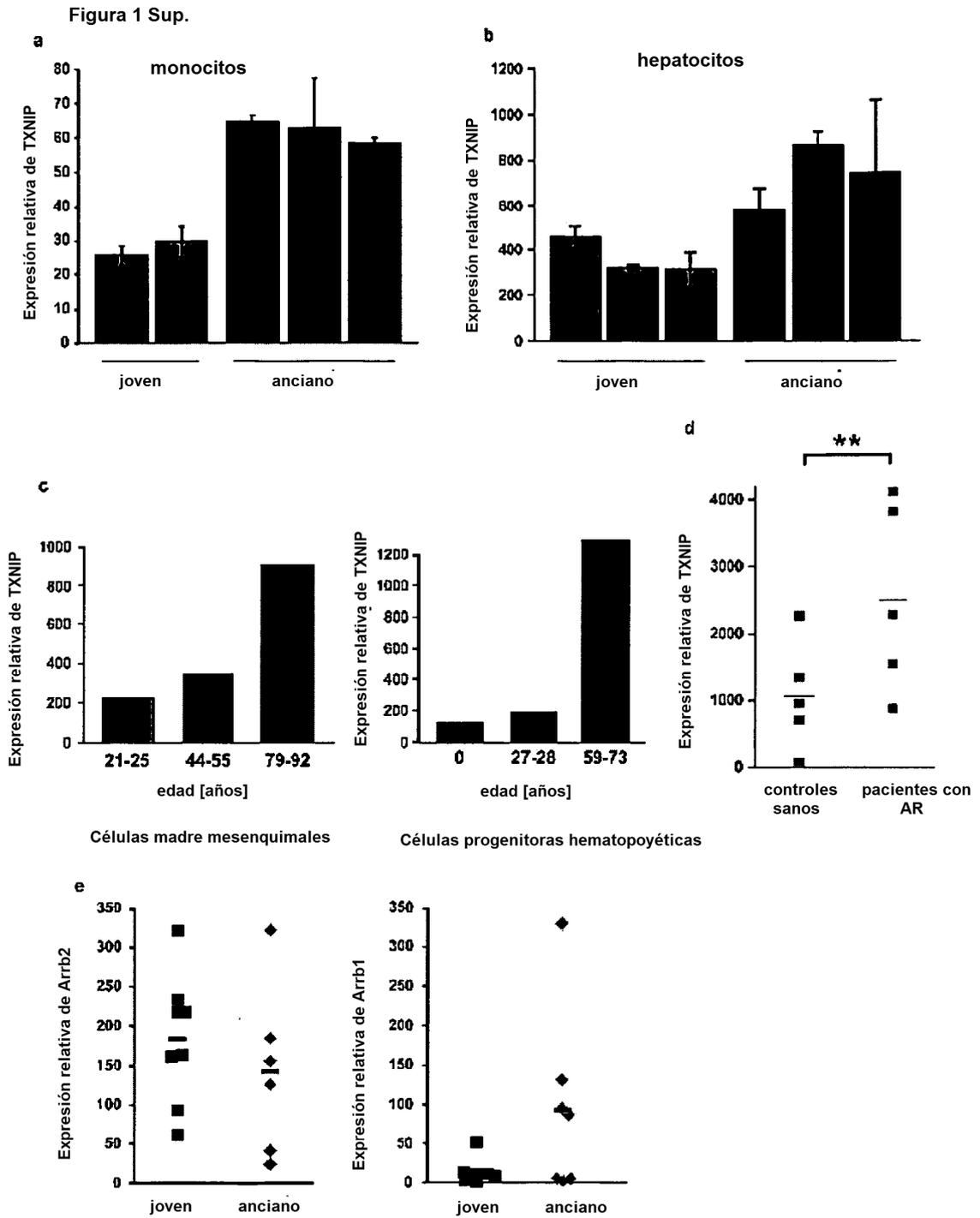


Figura 5

Figura 4 Sup.

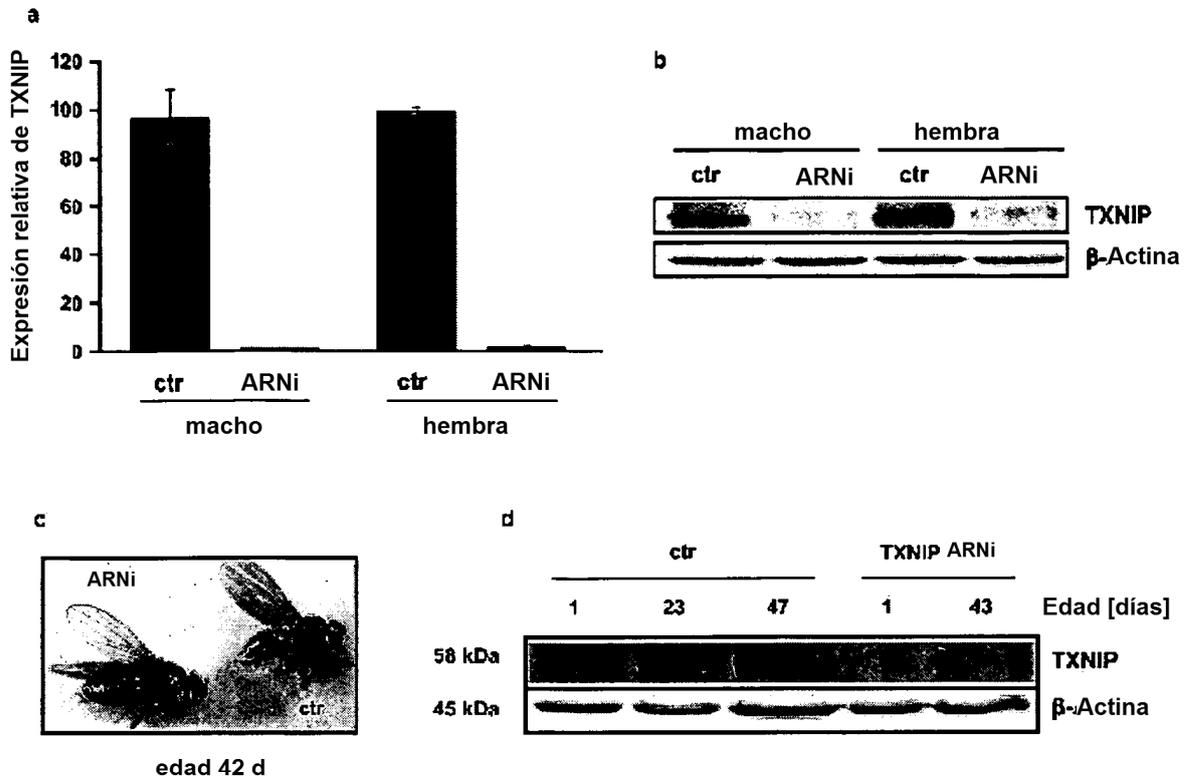


Figura 6