

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 822**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/06 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/EP2014/061218**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14730477 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3003351**

54 Título: **Globulina fijadora de hormonas sexuales para su uso como un medicamento**

30 Prioridad:

30.05.2013 EP 13382202

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL
D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (100.0%)
Pg. Vall d' Hebron, 119-129
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ SELVA, DAVID;
SIMÓ CANONGE, RAFAEL;
HERNÁNDEZ PASCUAL, CRISTINA;
SAEZ LOPEZ, CRISTINA y
BARBOSA DESONGLES, ANNA**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 711 822 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

Globulina fijadora de hormonas sexuales para su uso como un medicamento

- 5 La presente invención se refiere al campo de los enfoques médicos para enfermedades en las que se produce la acumulación de lípidos en uno o varios tejidos y órganos animales, tales como la esteatosis hepática. La invención también se aplica a métodos cosméticos para reducir las reservas de lípidos.

Antecedentes de la técnica

10

La obesidad (o adiposidad) es un trastorno metabólico multifactorial causado por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, que puede tener factores genéticos y/o de comportamiento que afectan a la cantidad y calidad de la ingesta de alimentos, así como al estilo de vida. Se caracteriza por un aumento del peso corporal acompañado de una importante disregulación de la función del tejido adiposo. La obesidad está asociada con un conjunto de enfermedades crónicas y progresivas que incluyen diabetes de tipo 2, hiperinsulinemia, dislipidemia, patologías hepáticas e inflamación, entre otras. Por otro lado, el sobrepeso se define, en general, como tener más grasa corporal que lo que es óptimo para la salud. Tener sobrepeso es una afección común, en especial, cuando los suministros de alimentos son abundantes y los estilos de vida son sedentarios.

15

20 En biología, el tejido adiposo o la grasa corporal, o simplemente la grasa, es tejido conjuntivo suelto compuesto principalmente de adipocitos. Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene la fracción vascular estromal (FVE) de las células, incluyendo los preadipocitos, los fibroblastos, las células endoteliales vasculares y una variedad de células inmunitarias (es decir, macrófagos del tejido adiposo (MTA)). El tejido adiposo se deriva de los preadipocitos. Su función principal es almacenar energía en forma de lípidos, aunque también protege y aísla el

25 cuerpo. En los últimos años, el tejido adiposo ha sido reconocido como un importante órgano endocrino que produce hormonas tales como la leptina, el estrógeno, la resistina y la citocina TNF α . El tejido adiposo puede afectar a otros sistemas de órganos del cuerpo y puede provocar enfermedades. La obesidad o el sobrepeso en los seres humanos y en la mayoría de los animales depende de la cantidad de grasa corporal (tejido adiposo). Hay dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM).

30

La reducción del tejido adiposo del organismo también es un problema cosmético. Por ejemplo, existen muchas composiciones cosméticas con el objetivo de reducir las reservas de grasa en zonas específicas del cuerpo (muslos, caderas y abdomen). Como ejemplo, el documento de patente EP1541127B1 desvela el uso de moduladores de la acuagliceroporina adiposa (AQPap) en composiciones cosméticas como agentes adelgazantes. Los moduladores se

35 seleccionan entre extractos de coca en polvo, sapogeninas y licopeno en nanocápsulas que estimulan la actividad de AQPap, y compuestos que potencian la síntesis de AQPap, tales como la aesina, complejos de fosfolípidos y retinoides. La composición también puede comprender agentes adelgazantes lipolíticos e/o inhibidores de la lipogénesis e/o inhibidores de la diferenciación de adipocitos. El agente lipolítico puede ser un inhibidor de la fosfodiesterasa, un inhibidor de los receptores de LDL o VLDL, péptidos lipolíticos y proteínas lipolíticas.

40

La esteatosis hepática, también conocida como hígado graso o enfermedad del hígado graso (EHG), es una afección en la que se acumulan grandes vacuolas de triglicéridos en las células del hígado a través del proceso de esteatosis (es decir, la retención anormal de lípidos dentro de una célula). A pesar de tener múltiples causas, el hígado graso puede considerarse una enfermedad única que se presenta a nivel mundial en las personas que

45 consumen alcohol en exceso y en las personas obesas (con o sin efectos de la resistencia a la insulina). Entre estas causas, la esteatosis hepática está asociada con el alcohol o el síndrome metabólico (diabetes, hipertensión, obesidad y dislipidemia), pero también puede deberse a cualquiera de muchas causas. En cuanto al diagnóstico, la mayoría de los individuos son asintomáticos y, en general, se descubren por casualidad debido a pruebas de función hepática anómalas o a la hepatomegalia observada en afecciones médicas no relacionadas. Las enzimas hepáticas

50 elevadas se encuentran en el 50 % de los pacientes con esteatosis simple. En general, el nivel de alanina transaminasa en suero es superior al nivel de aspartato transaminasa en la variante no alcohólica y el opuesto en la EHG alcohólica (AST:ALT más de 2:1). En la actualidad, el tratamiento del hígado graso depende de su causa y, en general, el tratamiento de la causa subyacente revertirá el proceso de esteatosis si se implementa en una etapa temprana.

55

Entre los documentos que conducen a la reducción del peso corporal cabe mencionar la Presentación previa al documento "Desarrollo de un Nuevo modelo de ratón que expresa la SHBG humana", 2 de enero de 2013, página 1 (URL: http://www.youtube.com/watch?v=q-RAP2FCj4o&feature=player_embedded y las diapositivas correspondientes que se pueden descargar en URP: <http://www.slideshare.net/VHIR/desarrollo-de-un-nuevo-modelo-de-ratn-que-expresa-la-shbg-humana-implicaciones-en-la-obesidad-distribucin-de-la-grasa-corporal-y-diabetes-del-tipo-2>). Estas presentaciones desvelan que la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) reduce el peso corporal y la inflamación en ratones y que podría ser útil para desarrollar una terapia basada en la modulación de la SHBG para mantener esta SHBG a niveles altos.

60

65 También la publicación PCT WO2010/057135 (Universidad de California) desvela un polipéptido SHBG o un

fragmento del mismo para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes.

El documento EP2143430 (Kowa Co) desvela el tratamiento médico de la esteatosis hepática con compuestos de poliprenilo, en particular, con un ácido poliprenilcarboxílico. Estos compuestos redujeron las cantidades de lípidos en el hígado y mejoraron la función hepática.

El documento de Peter *et al.*, "Relationships of Circulating Sex Hormone-Binding Globulin With Metabolic Traits in Humans", *Diabetes-2010*, vol. n.º 59(2), pág.: 3167-3173, desvela posibles mecanismos mediante los que altos niveles de SHBG circulante pueden prevenir el desarrollo de la diabetes. El documento concluye que un alto nivel de grasa hepática se asocia más fuertemente con la SHBG baja circulante. Los posibles mecanismos mediante los que la alta SHBG circulante evita el desarrollo de la diabetes de tipo 2 incluyen la regulación de la glucemia en ayunas, pero no la alteración de la función secretora de la insulina.

Por lo tanto, debido a la alta frecuencia de algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente, y de los enfoques terapéuticos no resolutivos en absoluto para las mismas, cabe destacar la necesidad de muchos enfoques de tratamiento adicionales para enfrentarse a todas aquellas enfermedades en las que se produzca una acumulación anómala de la grasa en algunos tejidos de animales.

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que la proteína globulina fijadora de hormonas sexuales en mamíferos redujo el contenido de lípidos en células de mamíferos, principalmente debido a su papel como agente lipolítico, así como de inhibidor de la vía de la lipogénesis.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o a cualquier fragmento de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en mamíferos, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera.

La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) o la globulina fijadora de esteroides sexuales (SSBG) es una glicoproteína plasmática dimérica con una masa molecular de aproximadamente 90 kDa (dos subunidades). Esta glicoproteína se une a las hormonas sexuales, para ser específicos, a los andrógenos y a los estrógenos. Otras hormonas esteroideas tales como la progesterona, el cortisol y otros corticosteroides son unidos por la transcortina. En los seres humanos, la SHBG es producida principalmente por el hígado, y se libera en el torrente sanguíneo. Otros sitios que producen SHBG incluyen el cerebro, el útero, los testículos y la placenta. La SHBG producida por los testículos se denomina proteína de unión al andrógeno. El gen para SHBG se encuentra en el cromosoma 17.

En los seres humanos, la SHBG se expresa como 5 isoformas diferentes debido al corte y empalme alternativo. Una isoforma proteica es una forma alternativa o expresión de la misma proteína en un organismo, derivada de diferentes genes o de un gen único mediante corte y empalme alternativo. El número de acceso de estas cinco isoformas humanas corresponde a los números de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (accesible desde NCBI): UniProt P04278-1 para la isoforma 1 (SEQ ID NO: 1); UniProt P04278-2 para la isoforma 2 (SEQ ID NO: 2); UniProt P04278-3 para la isoforma 3 (SEQ ID NO: 3); UniProtP04278-4 para la isoforma 4 (SEQ ID NO: 4); y UniProtP04278-5 para la isoforma 5 (SEQ ID NO: 5), todas del 1 de abril de 1990, Versión 2. La secuencia canónica es la de la isoforma 1, que contiene 402 aminoácidos. Toda la información posicional de las otras isoformas se refiere a la misma. La isoforma 1 y la isoforma 2 están principalmente presentes en el hígado y en los testículos. La proteína puede contener modificaciones posteriores a la traducción, tales como restos lapidados y glicosilaciones (O-Glicosilación y N-Glicosilaciones). La transcripción de nucleótidos a partir de la que tiene lugar el corte y empalme alternativo corresponde a varias secuencias identificadas en la base de datos del NCBI con el Número de Acceso NM_001040, del 12 de mayo de 2013, Versión 3; o X05403, del 21 de marzo de 1995, Versión 1.

La SHBG está presente en todos los mamíferos. En ratones, la proteína tiene 403 aminoácidos (SEQ ID NO: 6) y solo hay una isoforma que se sigue modificando (glicosilación, enlaces disulfuro) tras la traducción. El número de acceso de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot es P97497 del 1 de mayo de 1997, Versión 1. La transcripción de nucleótidos correspondiente de la que deriva la proteína es la entrada de la base de datos NCBI con el Número de Acceso NM_011367, 18 de abril de 2013, Versión 2.

Como se expuso anteriormente, en los seres humanos, la proteína globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) se expresa en el hígado. La expresión está bajo el control de hormonas y factores nutricionales. El hígado humano secreta SHBG en la sangre, donde se une a los andrógenos y estrógenos con una alta afinidad, regulando su biodisponibilidad. El índice de masa corporal es un importante determinante de las concentraciones de SHBG en la sangre de los varones y de las mujeres. Los niveles bajos de SHBG en suero en individuos con sobrepeso son un biomarcador para el síndrome metabólico, y son predictivos de la diabetes de tipo 2 y del riesgo de enfermedad

cardiovascular. Los ejemplos del uso de SHBG como biomarcador se pueden encontrar en el documento de Sutton-Tyrrell *et al.*, "Sex-hormone-binding Globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the Study of Women Across the Nation (SWAN)", *Circulation* - 2005, Vol. n.º 111, pág.:1242-1249. Otro documento que indica a la SHBG como biomarcador es el de Kalme *et al.*, "Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men", *J. Clin. Endocrinol. Metab*-2004, Vol. n.º 90, pág.:1550-1556. Además, las mediciones de SHBG se usan en bases clínicas para determinar las cantidades de estradiol y testosterona libres, y para detectar trastornos metabólicos y otras enfermedades.

10 Otro documento que indica a la SHBG como marcador del riesgo de una enfermedad es el de Stefan *et al.*, "Sex-HormoneBinding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes", *The New England Journal of Medicine* - 2009, 361, pág. 2675-2678. En dicho documento también se describe la relación entre los niveles de SHBG y la grasa hepática en los seres humanos. Aunque se postula que las condiciones que provocan el hígado graso pueden ser dianas lógicas cuando se pretenden aumentar los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales en los seres humanos, no se proporcionan datos.

No se sabe mucho acerca de las vías mecánicas implicadas en los procesos que incluyen la SHBG. No obstante, hay evidencias reales de que la fructosa o la glucosa pueden suprimir la expresión de SHBG en los hepatocitos. Estos datos se pueden obtener de Selva *et al.*, "Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormonebinding globulin gene", *The Journal of Clinical Investigation* - 2007, Vol. n.º. 117 (12), pág: 3979-3987. En dicho documento, Selva *et al.* mostraron que la supresión de los niveles de SHBG se debían a la reducción de los niveles hepáticos del factor nuclear de los hepatocitos 4 α (HNF-4a) debido a la lipogénesis inducida por monosacáridos.

25 En ninguno de los documentos desvelados anteriormente, la SHBG ha demostrado ser eficaz como agente terapéutico o como agente profiláctico de la esteatosis hepática. Por lo tanto, la presente invención representa la primera vez que se desvelan estos efectos de la SHBG, y debido a la extensión del efecto terapéutico, y de los datos concluyentes, debe considerarse una contribución real a la técnica.

30 Otro aspecto de la invención es el uso de una cantidad cosméticamente eficaz de globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, para reducir la grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso de debajo de la piel, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera.

Este aspecto de la invención engloba la aplicación cosmética de aquellas cantidades eficaces de SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma como los expuestos anteriormente en mamíferos, incluyendo los humanos (varones y mujeres), que son mamíferos sanos y que tienen acumulación de grasa en la zona subcutánea. En estos mamíferos, la SHBG se puede aplicar solo con fines estéticos para mejorar el aspecto corporal con dosis generalmente más bajas que las cantidades terapéuticamente eficaces empleadas cuando la SHBG se usa como un medicamento en el tratamiento y/o en la prevención de la esteatosis hepática en mamíferos.

Otro aspecto más de la invención es el uso de SHBG y/o cualquier fragmento de la misma como agente reductor de lípidos en una muestra aislada que comprende células de mamífero, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera. Este aspecto tiene por objeto el uso de la SHBG de mamífero y/o de cualquier fragmento de la misma como los expuestos anteriormente como reactivo en ensayos bioquímicos en los que se usan células de mamífero aisladas para estudiar procesos celulares mecanicistas, vías metabólicas o para ensayar sustancias en métodos de detección.

Breve descripción de los dibujos

55 La FIG. 1 es un diagrama de barras que muestra, en el eje Y, la concentración de glicerol (Gli) (μ M), para cada muestra analizada (M) del eje X en células HepG2. Iso significa isoproterenol; C es el control; SHBG es la globulina fijadora de hormonas sexuales y la concentración (nM) entre paréntesis es la concentración final en el cultivo celular.

60 La FIG. 2 también muestra un diagrama de barras para el ensayo de lipólisis como en la FIG. 1, pero realizado en adipocitos.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra el peso corporal (P en gramos (g)) en ratones (n = 5) a lo largo del tiempo (t en semanas) para cada genotipo ensayado: ratones magros db/+ (cuadrado negro) y ratones magros shbg-db/+ (triángulo negro); ratones obesos shbg-db/db (triángulo blanco) y ratones obesos db/db (cuadrado blanco).

La FIG. 4 es un diagrama de barras con el Peso del TAV (TAV = Tejido Adiposo Visceral) en gramos (g) en el eje Y determinado en cada muestra (M en el eje X) o genotipo ensayado: ratones diabéticos obesos (db/db), ratones diabéticos obesos que expresan SHBG humana (shbg-db/db), ratones magros db/+ y ratones magros shbg-db/+.

5 La FIG. 5 muestra el área de los adipocitos (AA en μm^2) determinada para cada genotipo o tipo de muestra (M) como en la FIG. 4. El área de los adipocitos se mide usando el programa ImageJ (imagej.softonic.com), que es un software de dominio público para el procesamiento de imágenes digitales, programado en Java y desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH).

10 La FIG. 6 expone, en el eje Y, el peso del hígado (PH en gramos (g)) ($n = 3$) de cada genotipo o muestra (M) diferente (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db) sacrificados a las 6 semanas.

La FIG. 7 muestra imágenes de microscopio (Olympus-BX61) de una sección de parafina incubada además con anticuerpos de conejo contra F4/80 (marcador de macrófagos) de los cuatro genotipos estudiados (db/+, shbg-db/+, db/db, shbg-db/db).

En la FIG. 8, los paneles A y B muestran diagramas de barras que indican (eje Y) los niveles de ARNm de acetil-CoA carboxilasa (ACC α (unidades arbitrarias relativas a los niveles de ARNm 18S) (panel A) y ácido graso sintasa (FAS) (unidades arbitrarias relativas a los niveles de ARNm 18S) (panel B) para cada tipo de muestra (M; genotipo ensayado en el eje X).

La FIG. 9 representa el análisis de proteínas de muestras de hígados de ratón (M) de cada genotipo. El panel A muestra los niveles de proteína de ACC α y el panel B, los niveles de proteína de FAS. PPIA (control) es Peptidilprolisomerasa A. db/+, shbg-db/+, db/db y shbg-db/db tienen el mismo significado que se ha indicado anteriormente.

La FIG. 10 representa imágenes de microscopio (Olympus-BX61) de hígado (H) y tejido de adipocitos (A) de dos genotipos analizados (db/db y shbg-db/db). Las imágenes superiores muestran los resultados en ratones db/db. Las imágenes inferiores muestran los resultados en ratones shbg-db/db. Las imágenes muestran el marcaje inmunohistoquímico contra F4/80 (marcador de macrófagos).

La FIG. 11 muestra, en las barras del eje Y, los niveles de ARNm (ARNm) de TNF- α (panel A), de IL-1 β (panel B), de IL6 (panel C) y de Adiponectina (panel D), entre ratones transgénicos db/db y shbg-db/db (indicados en el eje X como tipos de muestra o M).

La FIG. 12 es un gráfico que muestra, en el eje Y, los niveles en plasma (niveles relativos con respecto a los niveles de SHBG en plasma de cada ratón a las 4 semanas de vida) de SHBG (pSHBG) medidos en ratones magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db hasta las 8 semanas de vida. El eje X muestra el tiempo (t) en semanas. Los datos de los ratones magros shbg-db/+ se indican en marcas de cuadrado negro. Los datos de los ratones obesos shbg-db/db se indican en marcas de cuadrados blancos.

La FIG. 13 muestra en barras (eje Y) los niveles de ARNm de SHBG (unidades arbitrarias relativas a los niveles de ARNm 18S) en el hígado de los ratones magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db a las 6 semanas de vida. Cada genotipo se indica en el eje X (Muestra, M) debajo de las barras de resultados correspondientes.

La FIG. 14 es otro diagrama de barras con los niveles de ARNm (unidades arbitrarias relativas a los niveles de ARNm 18S) de HNF-4 α (panel A) y PPAR γ (panel B) en el eje Y. Los genotipos ensayados (M) en el eje X bajo la barra correspondiente son los mismos que en la FIG. 13.

La FIG. 15 es una imagen de transferencia Western que muestra los niveles de proteínas HNF-4 α y PPAR γ en los ratones obesos shbg-db/db y magros shbg-db/+. PPIA (control) es Peptidilprolisomerasa A.

La FIG. 16 es un gel de acrilamida que muestra los productos de PCR de un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en el que se usan oligonucleótidos específicos para el promotor de SHBG humano. Como se muestra en la FIG. 16, se han usado anticuerpos contra HNF-4 α y PPAR γ . Se han usado IgG de cabra y conejo (g IgG y r IgG) como control. La entrada es la cantidad inicial de ADN usada al comienzo del ensayo. Esta FIG. 16 muestra la cantidad de proteína HNF-4 α Y PPAR γ unida al promotor de SHBG humano en el hígado de ratones shbg-db/+ y shbg-db/db.

La FIG. 17 muestra los niveles de ARNm de SHBG (en unidades arbitrarias, U.A.) aislados de biopsias de hígado humano, en relación con el índice de masa corporal (IMC) (panel A), el contenido total de triglicéridos (TG) por gramo de tejido (TG total/g de tejido) (panel B), los niveles de ARNm de HNF-4 α (en U.A.) (panel C), los niveles de ARNm de PPAR γ 2 (U.A.) (panel D) y los niveles de ARNm de ACC (en U.A.) (panel E).

La FIG. 18, en relación con el Ejemplo 5, muestra, en el Panel A, el examen histológico con H y E del hígado en

ratones de tipo silvestre (WT; ratones C57BL/6) y ratones transgénicos para SHBG humana (shbg). En el panel B, contenido total de triglicéridos hepáticos (TG) por gramo de tejido (nmol/g de tejido) en ratones de tipo silvestre y transgénicos para SHBG humana. El panel C muestra los niveles de ARNm de ACC y FAS (en U.A.), determinados en relación con el ARNm 18S en ratones de tipo silvestre (WT) y transgénicos para SHBG humana (shbg). El panel D es una imagen de transferencia Western que muestra los niveles de proteína ACC y FAS en ratones obesos transgénicos para SHBG humana (shbg) y ratones WT.

La FIG. 19, en relación con el Ejemplo 6, muestra el efecto de una dieta grasa en ratones de tipo silvestre (WT, ratones C57BL/6) y ratones transgénicos para SHBG humana (shbg). La FIG. 19 (A) muestra, en el eje Y, el peso creciente (Peso (P) en gramos (g)) a lo largo de las semanas en el eje X (Tiempo (t) en semanas). La FIG. 19 (B) representa el tejido adiposo visceral (TAV en gramos (g)) en ambos tipos de animales y después de 12 semanas de dieta grasa.

La FIG. 20, en relación con el Ejemplo 7, muestra varios datos recuperados de un ensayo en células HepG2, en el que SHBG se ha sobrexpresado (pCMV-SHGB), o se ha suprimido la expresión (shSHBG). Los controles de cada uno de los ensayos fueron, respectivamente, el vector sin el fragmento que codifica el SHBG (pCMV) y el shvector con oligo desordenado (shControl). Las FIG. 20 (a) a (c) muestran, respectivamente, en el eje Y, los niveles de ARNm de SHBG y la concentración de proteína, y los niveles de ARNm de ACC determinados en células HepG2 con vector de control (pCMV) y con un vector que expresa SHBG (pCMV-SHGB). Las FIG. 20 (d) a (f) muestran, respectivamente, en el eje Y, los niveles de ARNm de SHBG y la concentración de proteína, y los niveles de ARNm de ACC determinados en células HepG2 con oligo desordenado de shvector (shControl) y con una molécula pequeña de ARN en horquilla que bloquea/inactiva la expresión de SHBG (shSHBG).

Descripción detallada de la invención

Se incluyen las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la invención.

La expresión "para reducir el contenido de lípidos en células de mamífero" o, lo que es lo mismo, "para reducir la acumulación de lípidos en células de mamíferos" debe entenderse como el hecho de reducir el contenido total de lípidos en una célula de mamífero con respecto al contenido inicial antes de la administración de la SHBG. "Lípido total" incluye el contenido de triglicéridos dispuestos, en general, en vesículas o gránulos en el citoplasma de la célula, e incluye también los triglicéridos dispuestos en la cara interna de la membrana celular externa.

Por "globulina fijadora de hormonas sexuales" debe entenderse cualquier secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia completa de la globulina fijadora de hormonas sexuales de un mamífero, así como cualquier modificación posterior a la traducción (es decir, glicosilación, enlaces disulfuro, lipidaciones). En el caso particular de la globulina fijadora de hormonas sexuales humana también se incluye cualquiera de las isoformas completas 1 a 5 de la proteína, así como cualquier secuencia de aminoácidos con un porcentaje de homología de al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y lo más preferentemente el 95 %, con cualquiera de las isoformas humanas de tipo silvestre. También se contemple cualquier secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad de al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y lo más preferentemente el 95 % con cualquiera de las isoformas humanas de tipo silvestre.

El "porcentaje de homología" entre dos secuencias de aminoácidos debe entenderse como el porcentaje de posiciones en la secuencia que son idénticas o que están reemplazadas por otros aminoácidos con cadenas laterales de características similares (es decir, polares, no polares, con grupos amino, con grupos -SH), de acuerdo con las clasificaciones ampliamente aceptadas conocidas por un experto en el campo. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos debe entenderse como el porcentaje de posiciones de la secuencia con aminoácidos idénticos. El porcentaje de homología y de identidad entre secuencias se puede calcular mediante la "alineación de secuencias". La alineación de secuencias puede ser local o global. En el sentido de la presente invención, el porcentaje de homología y de identidad se calculará, preferentemente, sobre una alineación global, entre la secuencia completa o un fragmento activo completo de la secuencia. Las alineaciones globales son más útiles cuando las secuencias son similares y tienen aproximadamente el mismo tamaño (largo). Hay varios algoritmos disponibles en el estado de la técnica para realizar estas alineaciones globales. También hay herramientas bioinformáticas que usan dichos algoritmos para obtener el porcentaje de identidad y homología entre secuencias. Como ejemplo, la alineación global entre secuencias puede realizarse por medio del conocido software GGSEARCH o GLSEARCH.

Por "cualquier fragmento de la globulina fijadora de hormonas sexuales" se incluye una subunidad de la SHBG, así como una secuencia de aminoácidos que comprende de 10 a 200 aminoácidos aislados de la secuencia de aminoácidos completa de la globulina fijadora de hormonas sexuales de tipo silvestre, o aislados de una secuencia de aminoácidos con al menos un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y lo más preferentemente el 95 %, con cualquiera de las cinco isoformas humanas de tipo silvestre. El fragmento aislado de la proteína completa mantiene la función de reducir el contenido de lípidos en una célula animal, como la globulina fijadora de hormonas sexuales. Una forma de ensayar si el fragmento mantiene la función se puede

- realizar *in vitro*, mediante la adición del fragmento de SHBG a diferentes concentraciones finales de cultivo celular (2,5 nM, 10 nM y 50 nM) en un cultivo de células de hepatoblastoma HepG2 (catalogo n.º HB-8065; ATCC) mantenido en DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos. Para los experimentos, se cultivan células HepG2 hasta el 60 %-80 % de confluencia, se lavan y se incuban con un tampón de ensayo de lipólisis (Zenbio) que contiene vehículo (control - C), isoproterenol (control positivo - ISO, 3 µM). Tras 16 horas de incubación, se recoge el medio y se evalúa la concentración de glicerol usando, por ejemplo, un kit de detección de glicerol (Zenbio). Si se detecta glicerol a una concentración superior al control, se debe deducir que el fragmento de la SHBG mantiene la función como agente de reducción de lípidos en las células animales.
- 10 Un "agente lipolítico" es un compuesto que induce la lipólisis, que es la descomposición enzimática de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Los ejemplos de agentes lipolíticos conocidos incluyen epinefrina, norepinefrina, ghrelina, hormona del crecimiento y cortisol.
- Un "inhibidor de la lipogénesis" es un compuesto que evita la formación de triglicéridos a partir de la condensación enzimática de glicerol y ácidos grasos. Los ejemplos de inhibidores conocidos de la lipogénesis incluyen cerulenina.
- 15 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales, e incluyen, como ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.
- 20 La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un agente activo lo suficientemente alta como para brindar el beneficio deseado (ya sea el tratamiento o la prevención de la enfermedad), pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del criterio médico.
- 25 La expresión "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable", que, en el presente documento, se usa indistintamente, se refiere a los excipientes o vehículos adecuados para su uso en contacto con la piel humana sin provocar toxicidad indebida, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, entre otras.
- 30 La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma según lo definido anteriormente, puede reducir el contenido de lípidos en células de un mamífero con respecto al contenido de lípidos inicial o el contenido de lípidos (antes de la administración o adición de SHBG, o antes de poner las células en contacto con SHBG). Las células son aquellas que comprenden lípidos (principalmente triglicéridos) en gotitas, gránulos o vesículas usados como almacenamiento de lípidos por las células.
- 35 Por lo tanto, la SHBG de mamífero reduce el contenido de lípidos en células de un mamífero, comprendiendo dichas células gránulos, vesículas o gotitas del citoplasma que comprenden triglicéridos.
- 40 La reducción del contenido de lípidos en las células animales, es decir, de los triglicéridos en los gránulos, vesículas o gotitas del citoplasma de las células, así como de los triglicéridos ubicados en la cara interna de la membrana plasmática externa, conduce a una reducción de la masa (o cantidad) del tejido adiposo global entre la masa corporal de un animal, incluyendo un ser humano. El tejido adiposo es el tejido conjuntivo compuesto principalmente de adipocitos. Al mismo tiempo, la reducción de los triglicéridos tiene lugar en otros tejidos que participan en el metabolismo de los lípidos, tales como en el tejido del hígado (hepatocitos).
- 45 Como se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos, la SHBG, y/o un fragmento de la misma según lo definido anteriormente, es capaz de regular el metabolismo de los lípidos en las células de un mamífero (es decir, es un regulador del metabolismo de los lípidos) debido a su función de agente lipolítico y de inhibidor de la lipogénesis.
- 50 En una realización preferida del primer aspecto, las células de mamífero son hepatocitos.
- 55 Los adipocitos, también conocidos como lipocitos y células de grasa, son las células que componen principalmente el tejido adiposo, especializado en almacenar energía en forma de grasa. Hay dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM), que también se conocen como grasa blanca y grasa marrón, respectivamente, y comprenden dos tipos de células de grasa. Los glóbulos blancos o las células monovaculares contienen una gran gota lipídica rodeada por una capa de citoplasma. El núcleo es aplanado y se encuentra en la periferia. Una célula de grasa típica tiene un diámetro de 0,1 mm, algunas de ellas tienen el doble de ese tamaño y otras la mitad. La grasa almacenada se encuentra en estado semilíquido y está compuesta principalmente de triglicéridos y éster de colesterol. Si el exceso de peso se gana como adulto, las células de grasa aumentan su tamaño aproximadamente cuatro veces antes de dividirse y aumentar el número absoluto de células de grasa
- 60
- 65

presentes. Las células de grasa marrón o las células plurivacuolares tienen forma poligonal. A diferencia de las células de grasa blanca, estas células tienen un citoplasma considerable, con gotitas de lípidos dispersas por todas partes. El núcleo es redondo y, aunque está ubicado de manera excéntrica, no se encuentra en la periferia de la célula. El color marrón procede de la gran cantidad de mitocondrias. La grasa marrón, también conocida como "grasa infantil", se usa para generar calor. Tras una notable pérdida de peso, el número de células de grasa no disminuye (las células contienen menos grasa). Las células de grasa se hinchan o encogen, pero se mantienen constantes en número. Sin embargo, el número de células de grasa puede aumentar una vez que las células de grasa existentes estén lo suficientemente llenas. No obstante, en algunos informes y libros de texto, el número de células de grasa (adipocitos) aumentó en la niñez y la adolescencia. El número total es constante en los adultos obesos y magros. Las personas que se vuelven obesas cuando son adultas no tienen más células de grasa que antes.

Un hepatocito es una célula del tejido principal del hígado. Los hepatocitos constituyen el 70-85 % de la masa citoplasmática del hígado. Estas células participan en la síntesis de proteínas, el almacenamiento de proteínas, la transformación de los hidratos de carbono, la síntesis del colesterol, las sales biliares y los fosfolípidos, y en la desintoxicación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas. El hepatocito también inicia la formación y secreción de bilis. El hígado forma ácidos grasos a partir de los hidratos de carbono y sintetiza triglicéridos a partir de los ácidos grasos y del glicerol. Los hepatocitos también sintetizan apoproteínas con las que luego ensamblan y exportan lipoproteínas (VLDL, HDL). En el metabolismo de los lípidos, el hígado recibe muchos lípidos de la circulación sistémica y metaboliza restos quilomicrométricos. También sintetiza el colesterol a partir de acetato y sintetiza además las sales biliares.

Debido a su papel de agente lipolítico e inhibidor de la lipogénesis, la SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma según lo definido anteriormente, se puede usar para el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en un mamífero. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Este aspecto de la invención también puede formularse como el uso de la SHBG de mamífero como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en mamíferos, incluyendo seres humanos. La presente invención también se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de la esteatosis hepática en mamíferos, incluyendo seres humanos, método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de SHBG, junto con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Esta esteatosis hepática puede estar asociada a una ingesta excesiva de alcohol, a la obesidad (con o sin efectos de la resistencia a la insulina) o a la diabetes, la hipertensión y la dislipidemia (síndrome metabólico).

En una realización preferida, la SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma para su uso de acuerdo con lo desvelado anteriormente es preferentemente SHBG humana.

En otra realización, la SHBG es una isoforma de la globulina fijadora de hormonas sexuales humana que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y mezclas de las mismas que comprenden las dos, tres, cuatro o cinco isoformas. Estas isoformas pueden incluir fragmentos posteriores a la traducción, así como fragmentos peptídicos (de 10 a 200 aminoácidos) ubicados en los extremos N-terminal y/o C-terminal de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 5.

Entre las modificaciones posteriores a la traducción, se incluyen las O-glicosilaciones, N-glicosilaciones o la lipidación de la SHBG mediante la adición de un ácido graso (por ejemplo, palmítico o mirístico). Con respecto a las glicosilaciones, debe observarse que cada sujeto tiene al menos una O-glicosilación, y con frecuencia, dos sitios N-glicosilados. Incluso algunas personas tienen una SHBG con tres sitios N-glicosilados. Además, se sabe que tres sitios N-glicosilados reducen el aclaramiento de la SHBG. Todas estas modificaciones enumeradas anteriormente también están incluidas en la SHBG para su uso de acuerdo con la invención.

Además, estas isoformas de la SHBG humana pueden obtenerse sintéticamente o mediante tecnología recombinante (es decir, producción por tecnología de ADN recombinante en bacterias y levaduras). Otra fuente de isoformas de SHBG humana es por extracción de tejido hepático o de plasma humano.

En otra realización, la SHBG para su uso de acuerdo con la invención, consiste en una isoforma de la globulina fijadora de hormonas sexuales humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y mezclas de las mismas que comprenden las dos, tres, cuatro o cinco isoformas. Estas isoformas pueden incluir las modificaciones posteriores a la traducción desveladas anteriormente, así como cualquiera de los fragmentos peptídicos (de 10 a 200 aminoácidos) ubicados en los extremos N-terminal y/o C-terminal.

La SHBG y/o un fragmento de la misma según lo definido anteriormente, para su uso de acuerdo con la invención, pueden administrarse externamente (parenteral, oral, tópica). Además, puede administrarse como una terapia génica en forma de una construcción de ácido nucleico capaz de (vector) llegar a las células hepáticas y expresar la

proteína bajo inducción. Esta terapia génica puede realizarse mediante el uso de vectores víricos (por ejemplo, vectores de retrovirus, Los vectores de adenovirus, vectores asociados con adenovirus, vectores de virus de herpes simple, lentivirus, etc.) que expresan SHBG bajo el control de promotores específicos del hígado y/o promotores constitutivos fuertes (por ejemplo, CMV). La terapia génica también puede realizarse mediante el uso de métodos no

5 víricos de transferencia de ADN, tal como ADN desnudo, liposomas o conjugados moleculares. Cuando se emplea la terapia génica, y en el caso particular de la SHBG humana, se puede administrar una construcción génica que genere las cinco isoformas mediante el corte y empalme alternativo, o que solo genere una de ellas o algunas de ellas.

10 Por lo tanto, en una realización de la invención, la SHBG, y/o cualquier fragmento de la misma según lo definido anteriormente, pueden administrarse convenientemente a un paciente.

Con este fin, la SHBG y/o cualquier fragmento de la misma según lo definido anteriormente para su uso de acuerdo con la invención es, en una realización particular, un ingrediente de una composición farmacéutica que comprende

15 una cantidad eficaz de la SHBG y/o cualquier fragmento de la misma, en combinación con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, a SHBG y/o cualquier fragmento de la misma para el uso de la presente invención pueden estar en forma de una composición farmacéutica que comprenda una cantidad eficaz de SHBG y/o cualquier fragmento de la misma en combinación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Este aspecto también puede formularse en forma de una composición farmacéutica que comprenda una cantidad eficaz

20 de SHBG y/o cualquier fragmento de la misma, en combinación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en un mamífero, incluyendo un ser humano. Esto significa que la SHBG, y/o cualquier fragmento de la misma, se usa para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en un mamífero. Esto también puede formularse como un método de tratamiento y/o prevención de la esteatosis hepática en mamíferos,

25 incluyendo seres humanos, el método que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la SHBG, junto con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida, la SHBG y/o cualquier fragmento de la misma para su uso de acuerdo con la invención

30 es un ingrediente de (o forma parte de) una composición farmacéutica para la administración parenteral. Por lo tanto, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención es una composición parenteral.

En otra realización, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención y que comprende la SHBG y/o cualquier fragmento de la misma según lo definido anteriormente es una composición para la administración oral.

35

La invención también engloba el uso de una cantidad cosméticamente eficaz de globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, para mejorar el aspecto corporal de un mamífero con grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso por debajo de la piel, en la que el

40 fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera. Este aspecto también se puede formular como un método cosmético para mejorar el aspecto corporal de un mamífero con grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso de debajo de la piel que comprende administrar una cantidad cosméticamente eficaz de SHBG y/o cualquier fragmento de la

45 misma, junto con excipientes o vehículos cosméticos.

La grasa subcutánea se encuentra justo debajo de la piel, a diferencia de la grasa visceral, que se encuentra en la cavidad peritoneal. La grasa subcutánea se puede medir usando calibradores de grasa corporal que proporcionan una estimación aproximada de la adiposidad corporal total. Esta grasa ayuda en el proceso de la homeostasis,

50 formando una capa de aislamiento para reducir la pérdida de calor.

El tejido conjuntivo fibroso es la fracción que contiene células fibroblásticas y componentes de la matriz extracelular de la hipodermis (o tejido conjuntivo). Todo el tejido conjuntivo también comprende células adiposas y macrófagos.

55 La hipodermis se usa principalmente para el almacenamiento de grasa.

Por lo tanto, en una realización particular, el uso cosmético es para un mamífero con celulitis.

En otra realización, la cantidad cosméticamente eficaz de SHBG y/o cualquier fragmento de la misma, según lo

60 definido anteriormente, es un ingrediente de una composición tópica cosmética en combinación con excipientes y/o vehículos cosméticamente aceptables. Por lo tanto, la SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma para mejorar el aspecto corporal de un mamífero con grasa subcutánea puede estar en forma de una composición cosmética tópica que comprenda una cantidad cosméticamente eficaz de SHBG y/o cualquier fragmento de la misma, en combinación con excipientes y/o vehículos cosméticamente aceptables.

65

Este aspecto también puede formularse como el uso de una composición cosmética tópica que comprende una cantidad eficaz de SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, en combinación con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables para mejorar el aspecto corporal de un mamífero con grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso por debajo de la piel.

- 5 En particular, el efecto cosmético de la SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma deriva de un agente lipolítico, así como un inhibidor de la lipogénesis en células de animales (mamífero). Por lo tanto, la administración tópica de la SHBG de mamífero y/o un fragmento de la misma conduce a la reducción de la grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso, o lo que es lo mismo, reduce la celulitis manifestada topográficamente como hoyuelos y nodularidad cutáneos, a menudo en la región pélvica (específicamente en las 10 nalgas), extremidades inferiores y abdomen en las mujeres. En varones, que también comprenden grasa subcutánea atrapada dentro del tejido conjuntivo fibroso, la SHBG de mamífero y/o un fragmento de la misma actúa como el denominado agente cosméticamente reductor.
- 15 En una realización preferida, la composición cosmética se administra por vía tópica en las zonas deseadas del cuerpo. Las composiciones tópicas de la invención se pueden formular en varias formas que incluyen, pero sin limitación, soluciones, aerosoles y pulverizados sin aerosol, cremas de afeitar, polvos, mousses, lociones, geles, barras, pomadas, pastas, cremas, champús, gel de ducha, geles de baño o geles faciales.
- 20 En otra realización más, la SHBG de mamífero usada en una cantidad cosméticamente eficaz es preferentemente una SHBG de mamífero. En una realización preferida, la SHBG de mamífero es una isoforma de la SHBG humana que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y mezclas de las mismas que comprenden las dos, tres, cuatro o cinco isoformas. Estas isoformas pueden incluir las modificaciones posteriores a la traducción desveladas anteriormente, 25 así como cualquiera de los fragmentos peptídicos (de 10 a 200 aminoácidos) ubicados en los extremos N-terminal y/o C-terminal.

El uso cosmético de la SHBG de mamífero y/o un fragmento de la misma de acuerdo con la invención es para la aplicación en mamíferos, en particular, en seres humanos, que son sujetos sanos que no tienen necesariamente una 30 enfermedad. Es decir, pueden ser sujetos sin obesidad, con sobrepeso o que no padezcan hígado graso. El uso cosmético es solo para fines estéticos con el objetivo de mejorar el aspecto corporal y no para tratar una enfermedad. En términos generales, las cantidades cosméticamente eficaces son diferentes a las cantidades terapéuticamente eficaces, ya que, en un uso cosmético, la SHBG de mamífero y/o el fragmento de la misma solo tiene que alcanzar la grasa acumulada o conservada a nivel subcutáneo.

35 De hecho, debido a su papel de agente lipolítico (e inhibidor de la lipogénesis), la SHBG de mamífero y/o un fragmento de la misma también se pueden usar para reducir los lípidos (masa de tejido adiposo) que se acumulan en muchas partes del cuerpo del animal. En el caso particular del cuerpo humano, la acumulación de lípidos (tejido adiposo con altas cantidades de triglicéridos) tiende a acumularse en las caderas, la cintura, el abdomen y los 40 muslos. Como se ilustrará en los ejemplos que se presentan a continuación, la SHBG o un fragmento de la misma reduce el contenido de triglicéridos en los adipocitos (así como el tamaño de los adipocitos), lo que conduce a una reducción del lípido acumulado por el cuerpo.

Las composiciones de acuerdo con la invención, que son composiciones farmacéuticas o cosméticas, comprenden 45 excipientes y/o vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un disolvente o vehículo, un agente de viscosidad, un agente hidratante, un agente gelificante, un emoliente, un agente regulador del pH, un antioxidante, un agente conservante y una mezcla de los mismos.

Por último, cuando la SHBG de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, según lo definido anteriormente, es 50 para su uso como agente reductor de lípidos en una muestra aislada que comprende células de mamífero, las células preferidas se seleccionan del grupo que consiste en adipocitos y hepatocitos.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, el término "comprende" y las variaciones del término, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, el término "comprende" 55 abarca el caso de "que consiste en". Objetos adicionales, ventajas y características de la invención resultarán obvias para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo, y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

60 Ejemplos

Los niveles bajos de SHBG en plasma están asociados con la obesidad, pero no hay estudios que aborden la cuestión de si la SHBG podría desempeñar un papel activo en el desarrollo de la obesidad. Para aclarar este 65 problema, los inventores crearon un ratón transgénico doble que expresa la SHBG humana y desarrolla obesidad.

Los siguientes ejemplos ilustran el efecto lipolítico de la SHBG, así como su papel como inhibidor de la lipogénesis en células animales. Los experimentos *in vitro* han demostrado que la SHBG produce lipólisis en los adipocitos maduros humanos y en los hepatocitos humanos. Además, los experimentos *in vivo* han demostrado que la SHBG reduce el peso corporal total, la acumulación de grasa, la acumulación de lípidos en los hepatocitos (esteatosis hepática) y la inflamación. Por lo tanto, la SHBG puede ser para su uso, en particular, para tratar la esteatosis hepática. El medicamento es para reducir las acumulaciones o los contenidos lipídicos con respecto al contenido inicial en células de mamíferos.

Ejemplo 1. La SHBG causa lipólisis en los hepatocitos humanos

10

Experimentos de cultivo celular. Los reactivos de cultivo celular eran de Life Technologies Inc (Invitrogen SA). Se mantuvieron células de hepatoblastoma HepG2 (catálogo n.º HB-8065; ATCC) en DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y antibióticos. Para los experimentos, se cultivaron células HepG2 hasta el 60 %-80 % de confluencia, las células se lavaron y se incubaron con un tampón de ensayo de lipólisis que contenía vehículo (control -C), isoproterenol (control positivo - ISO, 3 µM) o SHBG a diferentes concentraciones finales de cultivo celular (2,5 nM, 10 nM y 50 nM). La SHBG era de proteína humana nativa purificada de sueros humanos sanos (incluía la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1). Tras 16 h de incubación, se recogieron los medios y se evaluó la concentración de glicerol usando un kit de detección de glicerol (Zenbio).

15

20 Los datos se representan en la FIG. 1, en la que las barras indican los niveles de glicerol (Gli) para cada muestra ensayada. El glicerol es una medida directa del nivel de lipólisis, ya que es el producto obtenido cuando los triglicéridos se descomponen química o enzimáticamente en glicerol y ácidos grasos.

Como se puede ver en esta FIG. 1, los niveles crecientes de SHBG aumentaron la lipólisis en las células HepG2 (de una manera dependiente de la dosis). El isoproterenol (Iso) se usa comúnmente en este tipo de experimentos como control positivo, porque se sabe que induce la lipólisis.

25

Ejemplo 2. La SHBG produce la lipólisis en los adipocitos humanos

30 Se realizó un experimento *in vitro* similar al del Ejemplo 1, pero usando adipocitos maduros humanos de sujetos obesos en lugar de las células HepG2.

Las células se mantuvieron en DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y antibióticos, se cultivaron hasta la confluencia, se lavaron y se incubaron con un tampón de ensayo de lipólisis que contenía vehículo (control -C), isoproterenol (control positivo - ISO, 3 µM) o SHBG a diferentes concentraciones finales de cultivo celular (10 nM y 30 nM). La SHBG era de proteína humana nativa purificada de sueros humanos sanos (incluía la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1). Tras 16 h de incubación, se recogieron los medios y se evaluó la concentración de glicerol usando un kit de detección de glicerol (Zenbio).

35

40 Los resultados en la FIG. 2 también muestran que las barras correspondientes a las muestras en las que se añadió SHBG (10 nM y 30 nM, respectivamente, de la misma fuente que en el Ejemplo 1) eran superiores a las del control (C, tampón). Por lo tanto, en las muestras con adipocitos maduros estimulados con SHBG, la concentración final de glicerol fue mayor que la observada en los adipocitos maduros no tratados.

40

45 En conclusión, y como se puede derivar de los Ejemplos 1 y 2, el tratamiento de las células humanas con SHBG pudo reducir el contenido de lípidos de los adipocitos y hepatocitos maduros al aumentar la lipólisis y aumentar la acumulación de glicerol en el medio de cultivo celular con respecto a los adipocitos maduros no tratados o a las células HepG2.

45

50 Ejemplo 3. Experimentos *in vivo* en ratones transgénicos que sobreexpresan el gen *shbg* humano.

3.1. Generación de ratones diabéticos obesos transgénicos que sobreexpresan el gen *shbg* humano.

Dado que los roedores no expresan SHBG en el hígado, no se pueden usar todos los modelos de roedores propensos a la obesidad disponibles para estudiar si la SHBG tiene un papel en el desarrollo y la progresión de la obesidad.

55

Para aclarar este problema, los inventores desarrollaron un modelo único de ratón que expresa el gen de SHBG humano y desarrolla obesidad, al cruzar los ratones transgénicos con SHBG humana con los ratones db/db.

60

Los ratones transgénicos con SHBG humana son los desvelados por Jänne *et al.*, "Human Sex-Hormone-Binding Globulin Gen Expression in Transgenic Mice", *Molecular Endocrinology* - 1998, Vol. n.º. 12 (1), pág.: 123-136.

En resumen, estos ratones se obtuvieron mediante microinyección en los pronúcleos de un embrión de ratón monocelular, una parte de 4,3 kb de un *shbg* humano que comprende los 8 exones de la SHBG más 0,9 kb 5 del

65

codón de inicio de la traducción en el exón 1 y 0,5 kb 3' de la secuencia de poliadenilación en el exón 8. Los embriones unicelulares se obtuvieron superovulando hembras híbridas CBA x C57BL6 con suero de yegua preñada y hCG (Sigma Chemical Co. Mississauga, Canadá) y apareándolas con machos CBA x C57BL6. Se usaron ratones hembra CD-1 para producir receptoras pseudopreñadas al aparearse con machos CD-1 vasectomizados. Se implantaron los embriones inyectados en los ratones receptoras pseudopreñadas mediante un protocolo convencional. Este ratón transgénico humano sobreexpresa el gen *shbg* humano *in vivo*. de acuerdo con el análisis de transferencia Northern, las transcripciones de *shbg* humano son más abundantes en el hígado y el riñón. A nivel celular, los transgenes *shbg* humanos se expresan en grupos de hepatocitos ubicados principalmente en la región periportal de los lóbulos hepáticos y en las células epiteliales que revisten los túbulos contorneados proximales del riñón. Esto da lugar a altos niveles de SHBG humana en el suero y la orina de ratones *shbg* machos maduros.

Los ratones db/db corresponden a la cepa de ratones JAX™: ratones diabéticos db/db (de Charles River; <http://www.criver.com/en-US/Pages/home.aspx>). Estos ratones se caracterizan por tener una mutación puntual en el receptor de la leptina. En la homocigosis, la falta de señalización de leptina en el hipotálamo conducirá a hiperfagia persistente, obesidad, diabetes de tipo 2, dislipemia e hígado graso. En estos ratones, la diabetes (db), que se produjo en una cepa de ratón consanguínea, se hereda como una unidad autosómica recesiva, y se caracteriza por una alteración metabólica similar a la diabetes mellitus en el ser humano. A la deposición anómala de grasa a las 3 a 4 semanas de vida, le sigue poco después la hiperglucemia, poliuria y glucosuria. Los cambios morfológicos que acompañan a los islotes de Langerhans sugieren neogénesis para compensar el agotamiento de la insulina.

Estas manifestaciones son evidentes a las 4-6 semanas de vida, y la muerte se produce aproximadamente a los 5-8 meses de vida.

La caracterización de los ratones SHBG-db/db (también denominados *shbg*-db/db) permitió descubrir nuevas acciones de la SHBG, ya que la presencia de SHBG protege parcialmente contra el aumento de peso, y reduce el hígado graso, la acumulación de grasa y la inflamación, así como los mecanismos moleculares mediante los que la SHBG se regula a la baja durante el desarrollo de la obesidad.

Para realizar los ensayos, los ratones se mantuvieron en condiciones convencionales con comida (Global Diet 2018, Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, España) y agua suministrada a voluntad, y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por los Subcomités Institucionales de Uso de Animales del Instituto de Investigación del Hospital Vail d'Hebron y la Universitat Autònoma Barcelona.

Los ratones para experimentos en los siguientes ensayos ilustrados fueron de los cuatro siguientes genotipos:

db/+, que significa ratones magros heterocigotos para la mutación puntual en el receptor de leptina.
 db/db, que significa que los ratones eran homocigotos para la mutación puntual en el receptor de leptina y que se comportan como un fenotipo de hiperfagia persistente, obesidad, diabetes de tipo 2, dislipemia e hígado graso,
 ratones *shbg*-db/+ magros heterocigotos para la mutación puntual en el receptor de leptina y que expresan el gen *shbg*,
shbg-db/db, lo que significa que sobreexpresaban el gen *shbg* de la manera desvelada anteriormente y que, al mismo tiempo, tenían el fenotipo de los ratones homocigotos db/db en relación con la hiperfagia, obesidad, diabetes de tipo 2, dislipemia y hígado graso.

Materiales y métodos para los experimentos *in vivo*.

Histología e inmunohistoquímica: para los estudios morfológicos, se usaron 3 animales de cada genotipo (db/+, db/db, *shbg*-db/+ y *shbg*-db/db). Se fijaron los hígados y el tejido adiposo en paraformaldehído al 4 % durante 24 h, y se embebieron en parafina. Se usaron secciones de serie de 5 µm de espesor para el examen histológico y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H y E).

Para los estudios de inmunohistoquímica, se retiró la cera de las secciones de parafina y se incubaron a alta potencia en un horno de microondas durante 10 min en tampón de citrato, pH 6,6. Luego, se enfriaron las secciones a temperatura ambiente durante 20 min y se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,03 % durante 7 min, antes de la incubación (durante una noche a 4 °C) con anticuerpos de conejo contra F4/80. El inmunorreactivo F4/80 se detectó usando el sistema EnVision™ +, HRP (DAB) de DAKO (Carpintería, CA).

3.2. La SHBG reduce el aumento de peso, pero no los niveles de glucosa en sangre durante el desarrollo de la obesidad en ratones transgénicos para *shbg* humano-db/db.

Se realizó un seguimiento de un grupo de ratones macho de los cuatro genotipos (db/+, db/db, *shbg*-db/+ y *shbg*-db/db) n = 5 hasta 12 semanas evaluando el peso y la glucosa en sangre cada dos semanas. Se tomaron muestras de sangre por la vena safena para medir los niveles de SHBG en plasma cada dos semanas. Se sacrificó otro grupo de ratones macho de cada genotipo (n = 5) a las 6 semanas de edad, y se recogieron sangre y tejidos (hígado, riñón, testículo, bolsa de grasa) y se pesaron para el aislamiento de ARN y proteínas.

Se evaluaron el peso corporal y la glucosa en sangre en ratones ($n = 5$) de cada genotipo diferente (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db) cada dos semanas a partir de las cuatro semanas de vida hasta 12 semanas. Los resultados se muestran en la FIG. 3, en la que se indica el peso de los ratones (P en gramos (g)) a lo largo del tiempo de medición (t en semanas). Estos resultados mostraron que los ratones obesos db/db y shbg-db/db tenían un peso cada vez mayor que sus compañeros de camada magros db/+ (cuadrado negro) y shbg-db/+ (triángulo negro) desde las 6 semanas de vida hasta la semana 12. Sin embargo, los ratones shbg-db/db (triángulo blanco) mostraron una reducción significativa en el peso corporal en comparación con los ratones db/db (cuadrado blanco).

10 3.3. La SHBG reduce el peso del tejido adiposo y el tamaño de los adipocitos en ratones transgénicos shbg humano-db/db. Análisis de la acumulación de grasa (TAV).

Se extrajo tejido adiposo visceral de los ratones y se pesó en una balanza de precisión.

15 También se determinó el peso del tejido adiposo y la histología en ratones ($n = 3$) de cada genotipo diferente (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db) sacrificados a las 6 semanas.

Como se puede deducir de la FIG. 4, que es un diagrama de barras que muestra el tejido adiposo visceral (TAV) en gramos, determinado en cada genotipo, se observó un aumento significativo en el peso del tejido adiposo de ratones obesos db/db y shbg-db/db en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+. Sin embargo, de nuevo, los ratones shbg-db/db habían reducido significativamente el peso del tejido adiposo en comparación con los ratones db/db.

El examen histológico y la cuantificación del tejido adiposo de estos ratones revelaron que los ratones obesos db/db y shbg-db/db tenían un tamaño de los adipocitos mayor en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+. Sin embargo, los ratones shbg-db/db tenían un tamaño de los adipocitos más pequeño que los ratones db/db. Este último examen histológico se resume en la FIG. 5. Esta figura muestra el área de los adipocitos (μm^2) determinada para cada genotipo o tipo de muestra. El área de los adipocitos se mide usando el programa ImageJ (imagej.softonic.com).

30 3.4. SHBG reduce el peso del hígado y la esteatosis hepática al reducir la lipogénesis hepática en ratones transgénicos shbg-db/db.

Se analizó además el peso del hígado y la histología en ratones ($n = 3$) de cada genotipo diferente (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db) sacrificados a las 6 semanas, y como se indica anteriormente. Los resultados, representados en la FIG. 6, mostraron un aumento significativo en el peso del hígado de ratones obesos db/db y shbg-db/db en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+. De manera importante, los ratones shbg-db/db habían reducido significativamente el peso del hígado en comparación con los ratones db/db. En la Fig. 6, PH (g) significa peso del hígado en gramos. El gráfico es un diagrama de barras que muestra, para cada tipo de muestras ensayadas, el peso total del hígado (PH) medido una vez sacrificados a las 6 semanas de vida.

El análisis histológico de los hígados de estos ratones, ilustrados en la FIG. 7, reveló que los ratones magros db/+ y shbg-db/+ mostraron una histología normal, mientras que los obesos db/db y shbg-db/db tuvieron una importante acumulación de lípidos en sus hepatocitos. Esto se puede derivar de la FIG. 7, en la que se ilustra una imagen de microscopio (Olympus-BX61) de una sección de parafina incubada además con anticuerpos de conejo contra F4/80 (marcador de macrófagos) de los cuatro genotipos. La acumulación de lípidos en las células de ratones obesos (db/db y shbg-db/db) se puede ver con las zonas claras (blancas) en las células (Olympus-BX61). Sin embargo, y también de forma derivable de la FIG. 7, los ratones shbg-db/db tenían menos esteatosis hepática que los ratones db/db (menos zonas blancas - grasa acumulada). De forma interesante, esta mejora en la acumulación de lípidos en el hepatocito observada en ratones shbg-db/db se ubicaba predominantemente en las zonas de alrededor de la vena central de los lóbulos hepáticos.

Se ha descrito previamente que los ratones obesos db/db habían aumentado la lipogénesis en comparación con los ratones magros db/+ después del destete. Por lo tanto, se determinó si los ratones shbg-db/db tenían lipogénesis hepática más baja que los ratones db/db. Para ello, se determinaron los niveles de ARNm y proteína de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS), dos enzimas importantes que regulan la lipogénesis hepática en los ratones ($n = 3$) de cada genotipo diferente (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db). Los datos de este análisis se ilustran en las FIG. 8 y 9.

60 La FIG. 8, paneles A y B, muestran diagramas de barras que indican (eje Y) los niveles de ARNm de ACC (panel A) y FAS (panel B) para cada tipo de muestra (genotipo ensayado). Para el análisis del ARNm, se extrajo el ARN total del hígado de los ratones y muestras de tejido adiposo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen SA). Se realizó la transcripción inversa (RT) a 42 °C, durante 50 min usando 3 μg de ARN total y 200 U de Superscript II junto con un cebador oligo-dT y reactivos proporcionados por Invitrogen. Se amplificó una parte alícuota del producto de RT en
65 una reacción de 25 μl usando SYBR Green (Invitrogen SA) con pares de cebadores de oligonucleótidos apropiados

correspondientes a ACC α de ratón y FAS de ratón. Los resultados se analizaron usando el programa 7000 SDS. Cebadores para ACC (en dirección 5'-3'): Directo, GCCATTGGTATTGGGGCTTAC (SEQ ID NO: 7); Inverso, CCCGACCAAGGACTTTGTTG (SEQ ID NO: 8)

Cebadores para FAS (en dirección 5'-3'): Directo, GGCATCATTGGGCACTCCTT (SEQ ID NO: 9); Inverso, 5 GCTGCAAGCACAGCCTCTCT (SEQ ID NO: 10).

Los resultados mostraron que los ratones obesos db/db y shbg-db/db tenían niveles de ARNm de ACC y FAS significativamente más altos que en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+. Sin embargo, los ratones shbg-db/db tenían niveles de ARNm de ACC y FAS significativamente más bajos en comparación con los ratones db/db.

El análisis de proteínas se representa en la FIG. 9 (paneles A y B). Para este fin, se homogeneizaron muestras de hígado de ratón en un tampón RIPA (tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación) con un cóctel inhibidor de proteasa Complete™ (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Los extractos de proteínas se usaron para la transferencia Western con anticuerpos contra FAS (catálogo 22759, Abcam, Cambridge, RU), ACC α (catálogo 63531, Abcam) y PPIA (Peptidilprolisomerasa A) (SA-296; BIOMOL Int., Madrid, España). Los complejos de anticuerpo-antígeno específicos se identificaron usando la IgG anti-cabra de conejo marcada con HRP, IgG anti-ratón de conejo o IgG anti-conejo de cabra y sustratos quimioluminiscentes (Millipore) mediante la exposición a una película de rayos X.

Como se puede deducir de la FIG. 9 (panel A), los niveles de proteína ACC aumentaron significativo en ratones db/db obesos en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+, mientras que los shbg-db/db resultaron tener niveles reducidos de proteína ACC. Además, de la FIG. 9 (panel B), se desprende que los niveles de proteína FAS aumentaron significativamente en ratones obesos db/db y shbg-db/db en comparación con los ratones magros db/+ y shbg-db/+. Sin embargo, los ratones shbg-db/db resultaron tener niveles de proteína FAS significativamente más bajos en comparación con los ratones db/db.

En conjunto, estos resultados mostraron que los ratones SHBG-db/db tuvieron una reducción en estas dos enzimas clave de la lipogénesis hepática, lo que sugiere que la presencia de SHBG reduce la acumulación de grasa en el hígado al reducir la lipogénesis

Además, también se determinó el contenido total de triglicéridos de los hígados de cada genotipo (magros: db/+ y shbg-db/+; obesos: db/db y shbg-db/db), y se encontró que los ratones magros db/+ y shbg-db/+ tenían menos contenido de triglicéridos que sus compañeros de camada obesos db/db y shbg-db/db. Sin embargo, los ratones shbg-db/db tenían menos acumulación de triglicéridos que los ratones db/db.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Cantidades de triglicéridos (en nanomoles de triglicérido (TG) por gramos (g) de tejido)

Genotipo	Nmol de TG/g de tejido	Significancia estadística
db/+	74,99 \pm 4,17	[db/+] frente a [db/db] $p < 0,0001$
shbg-db/+	88,88 \pm 12,84	[db/+] frente a [shbg-db/+] $p < 0,0655$
db/db	421,92 \pm 58,6	[db/+] frente a [shbg-db/db] $p < 0,0001$
shbg-db/db	314,64 \pm 41,37	[db/db] frente a [shbg-db/db] $p < 0,0002$ [db/db] frente a [shbg-db/db] $p < 0,0215$ [shbg-db/+] frente a [shbg-db/db] $p < 0,0002$

3.5 La SHBG reduce la inflamación en ratones transgénicos shbg-db/db

Dado que la obesidad se caracteriza, entre otras características, por un estado de inflamación de bajo grado, se determinó si existían diferencias en la inflamación entre los ratones db/db y shbg-db/db. Primero se investigó la infiltración de macrófagos en el hígado y el tejido adiposo mediante la realización de una inmunohistoquímica usando anticuerpos contra F4/80, un marcador de macrófagos bien conocido.

Para este análisis, se aplicó el método inmunológico descrito anteriormente en cortes de hígado y cortes de tejido adiposo en parafina. Los datos se muestran en la FIG. 10, que muestra imágenes de microscopio (Olympus-BX61) de ambos tejidos, hígado (H) y tejido de adipocitos (A) para los dos genotipos ensayados (db/db y shbg-db/db). Las imágenes superiores muestran, respectivamente, los resultados en ratones db/db en el hígado (H, a la izquierda de la Figura 10) y en el tejido de adipocitos (A, a la derecha de la Figura 10). Las imágenes inferiores muestran, respectivamente, los resultados en ratones shbg-db/db en el hígado (H, a la izquierda de la Figura 10) y en el tejido de adipocitos (A, a la derecha de la Figura 10).

El análisis mostró que los ratones shbg-db/db tenían menos infiltración de macrófagos tanto en el hígado como en el tejido adiposo que los ratones db/db, como se puede deducir de la menor tinción oscura observable en las imágenes inferiores de la FIG. 10.

5 Para estos dos genotipos, también se determinó la expresión de varias citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) y adiponectina en el tejido adiposo. Los resultados, en la FIG. 11, mostraron que los niveles de ARNm (unidades arbitrarias en relación con los niveles de ARNm 18S) del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β) se redujeron significativamente en shbg-db/db en comparación con los ratones db/db (Figura 11, paneles A y B, respectivamente). Los niveles de ARNm de la interleucina 6 (IL6) (representados en la Figura 11, panel C) se
10 redujeron en ratones shbg-db/db en comparación con los ratones db/db, pero no fue estadísticamente significativo. Los niveles de ARNm de adiponectina (Figura 11, panel D) aumentaron significativamente en los ratones shbg-db/db en comparación con ratones db/db.

Todos los niveles de ARNm se determinaron en el tejido adiposo como se indica en el Ejemplo 3.4 para el tejido
15 adiposo.

Cebadores para TNF- α (en dirección 5'-3'): Directo, CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA (SEQ ID NO: 11); Inverso, TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC (SEQ ID NO: 12).

Cebadores para IL-1 β (en dirección 5'-3'): Directo, CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG (SEQ ID NO: 13); Inverso, GATCCACACTCTCCAGCTGCA (SEQ ID NO: 14).

20 Cebadores para IL-6 (en dirección 5'-3'): Directo, CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT (SEQ ID NO: 15); Inverso, GAAGTAGGGAAGGCCGTGG (SEQ ID NO: 16).

Cebadores para 18S (en dirección 5'-3'): Directo, AGGGTTCGATTCCGGAGAGG (SEQ ID NO: 17); Inverso, CAACTTAATATACGCTATTGG (SEQ ID NO: 18).

Cebadores para adiponectina (en dirección 5'-3'): Directo, AGCCGCTTATATGTATCGCTCA (SEQ ID NO: 25);

25 Inverso, TGCCGTCATAATGATTCTGTTGG (SEQ ID NO: 26)

La FIG. 11, panel A, muestra, en barras, los niveles de ARNm (ARNm) de TNF- α , entre los ratones db/db y shbg-db/db; la FIG. 11, panel B, muestra, en barras, los niveles de ARNm (ARNm) de IL-1 β , entre los ratones db/db y shbg-db/db; la FIG. 11, panel C, muestra, en barras, los niveles de ARNm (ARNm) de IL6, entre los ratones db/db y shbg-db/db; y la FIG. 11, panel D, muestra, en barras, los niveles de ARNm (ARNm) de adiponectina, entre ratones db/db y shbg-db/db.
30

3.6. La producción de SHBG se reduce por la alteración de los niveles de proteínas HNF-4 α y PPAR γ en ratones transgénicos shbg humano-db/db.

35

Los inventores también estudiaron la regulación de SHBG en los ratones transgénicos shbg-db/db. Se midieron los niveles de SHBG en plasma de ratones magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db hasta las 8 semanas de vida. Los ratones magros shbg-db/+ mostraron un aumento en los niveles de SHBG en plasma desde las 4 hasta las 6 semanas de vida, y los niveles se mantuvieron constantes hasta las 8 semanas (FIG. 12, marcas de cuadrado negro). Sin embargo, los niveles de SHBG en plasma en los ratones obesos shbg-db/db no aumentaron de la semana 4 a la semana 6, y permanecieron más bajos a las 8 semanas de vida (Figura 12, marcas de cuadrado blanco).
40

El análisis de SHBG en plasma se realizó usando un ELISA de DEMEDITEC Diagnostics GmbH (REF DE2996).

45

También se determinó la expresión de SHBG hepática en ratones magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db a las 6 semanas de vida. Los resultados mostraron que los ratones obesos shbg-db/db tuvieron una disminución significativa en los niveles de ARNm de SHBG en comparación con los ratones magros shbg-db/+ (Figura 13). La FIG. 13 muestra los niveles de ARNm de SHBG (unidades arbitrarias en relación con los niveles de ARNm 18S) para
50 cada genotipo ensayado.

Para el análisis del ARNm, se extrajo el ARN total de muestras de hígado de ratón usando el reactivo TRIzol (Invitrogen SA). Se realizó la transcripción inversa (RT) a 42 °C, durante 50 min usando 3 μ g de ARN total y 200 U de Superscript II junto con un cebador oligo-dT y reactivos proporcionados por Invitrogen. Se amplificó una parte
55 alícuota del producto de RT en una reacción de 25 μ l usando SYBR Green (Invitrogen SA) con los pares de cebadores de oligonucleótidos apropiados (véase a continuación) correspondientes a SHBG humana. Los resultados se analizaron usando el programa 7000 SDS.

Cebadores para hSHBG (en dirección 5'-3'): Directo, GCTGATTATGGAGAGCAGAGG (SEQ ID NO: 19); Inverso, GGTCATGACAGCGATAGGCT (SEQ ID NO: 20).

60

Dado que HNF-4 α y los factores de transcripción del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR γ) desempeñan un papel en la actividad de transcripción del gen de SHBG humana, se analizaron los niveles hepáticos de HNF-4 α y PPAR γ en ratones transgénicos magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db. Los resultados mostraron que los ratones obesos shbg-db/db tenían niveles significativamente reducidos de ARNm de HNF-4 α y
65 aumentados de ARNm de PPAR γ en comparación con los ratones magros shbg-db/+. Estos datos se derivan de la

FIG. 14, paneles A y B, respectivamente, en la que un diagrama de barras indica (eje Y) los niveles de ARNm de HNF-4 α (panel A) y PPAR γ (panel B). Por otra parte, los ratones obesos shbg-db/db tenían niveles significativamente reducidos de proteína HNF-4 α y aumentados de proteína PPAR γ en comparación con los ratones magros shbg-db/+. Los resultados de los datos de proteínas se representan en la FIG. 15 (paneles A y B), en la que

5 los análisis de transferencia Western muestran niveles de proteínas más bajos de HNF-4 α (panel A) en ratones shbg-db/db en relación con los ratones shbg-db/+. Por otro lado, el ensayo de transferencia Western para los niveles de proteína PPAR γ (panel B) muestra niveles más altos en los ratones shbg-db/db que en los ratones magros shbg-db/+.

10 Para el análisis de los niveles de ARNm, y de acuerdo con lo indicado para los niveles de SHBG, se extrajo el ARN total del hígado de los ratones usando el reactivo TRIzol (Invitrogen SA). Se realizó la transcripción inversa (RT) a 42 °C, durante 50 min usando 3 μ g de ARN total y 200 U de Superscript II junto con un cebador oligo-dT y reactivos proporcionados por Invitrogen. Se amplificó una parte alícuota del producto de RT en una reacción de 25 μ l usando SYBR Green (Invitrogen SA) con pares de cebadores de oligonucleótidos (véase más adelante) correspondientes a

15 HNF-4 α de ratón y a PPAR γ de ratón. Los resultados se analizaron usando el programa 7000 SDS.
Cebadores para HNF-4 α (en dirección 5'-3'): Directo, GTGGCGAGTCCTTATGACACG (SEQ ID NO: 21); Inverso, CACATTGTCTGGCTAAACCTGC (SEQ ID NO: 22).

Cebadores para PPAR γ (en dirección 5'-3'): Directo, TCTTAAGTCCGGATCCACAA (SEQ ID NO: 23); Inverso, GCCCAAACCTGATGGCATT (SEQ ID NO: 24).

20 De la misma manera que en el Ejemplo 3.4, se realizó el análisis de proteínas homogeneizando el hígado de ratón en tampón RIPA (tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación) con cóctel inhibidor de la proteasa Complete™ (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Se usaron extractos de proteínas para la transferencia Western con anticuerpos contra HNF-4 α (C-19; catálogo sc-6556; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.),

25 PPAR γ (H-100; catálogo sc-7196; Santa Cruz Biotechnology Inc.). Los complejos de anticuerpo-antígeno específicos se identificaron usando la IgG anti-cabra de conejo marcada con HRP, IgG anti-ratón de conejo o IgG anti-conejo de cabra y sustratos quimioluminiscentes (Millipore) mediante la exposición a una película de rayos X.

En conjunto, estos resultados mostraron que los ratones SHBG-db/db son un buen modelo para dilucidar el

30 mecanismo molecular mediante el que la SHBG ejerce sus acciones.

Por último, para demostrar que la reducción a la baja de SHBG en ratones obesos shbg-db/db fue causada por la disminución en los niveles de proteína HNF-4 α y el aumento en los niveles de proteína PPAR γ , se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando complejos de ADN/proteína extraídos de hígados de ratones

35 transgénicos magros shbg-db/+ y obesos shbg-db/db.

Para los ensayos de ChIP, se usaron hígados de ratones con un kit ChIP-IT (Active Motif Inc.) con anticuerpos contra HNF-4 α , PPAR γ , IgG de conejo o IgG de cabra. El ADN purificado se sometió a amplificación por PCR (35 ciclos) usando los siguientes cebadores específicos, diseñados para amplificar una región de 262 pb del promotor de SHBG

40 humano.

Cebadores de SHBG humana (en dirección 5'-3'): Directo, CTAGACCTCAGGCCTGTGAATGC (SEQ ID NO: 27); Inverso, GGCAGGCAGCCTTGCGTGTG (SEQ ID NO: 28)

Los resultados de la inmunoprecipitación de cromatina se muestran en la FIG. 16, en la que, para cada uno de los

45 genotipos de ratones obesos shbg-db/db y magros shbg-db/+, se indica la cantidad de proteína HNF-4 α Y PPAR γ unida al promotor de SHBG humano en el hígado de ratones shbg-db/+ y shbg-db/db. Las bandas de promotores de SHBG de ratones obesos shbg-db/db tenían menos unión a HNF-4 α y más unión a PPAR γ que los ratones magros shbg-db/+.

50 Ejemplo 4. La expresión del ARNm de SHBG está asociada inversamente con el contenido total de triglicéridos hepáticos en las biopsias de hígado humano, y los niveles de ARNm de SHBG están asociados con la expresión de ARNm de HNF-4 α y PPAR γ 2.

También se analizaron los niveles de expresión del gen de SHBG en biopsias de hígado humano en 15 individuos

55 que cubrían un intervalo de Índice de Masa Corporal (IMC) de entre 32 y 52. Los resultados, en la FIG. 17 (A), indicaron que los niveles de ARNm de SHBG eran inversamente proporcionales al IMC ($r = -0,629$, $p < 0,05$). A continuación, se evaluó si los niveles de ARNm de SHBG también eran inversamente proporcionales al contenido total de triglicéridos de las 15 biopsias de hígado. Los resultados, en la FIG. 17 (B) mostraron que los niveles de ARNm de SHBG también eran inversamente proporcionales al contenido total de triglicéridos en el hígado ($r = -$

60 $0,643$, $p < 0,01$).

Por lo tanto, los niveles bajos de SHBG se asocian con el hígado graso.

Esto también se puede deducir de la correlación de los niveles de ARNm de ACC, una importante enzima que regula

65 la lipogénesis hepática, con los niveles de ARNm de SHBG en estas 15 biopsias de hígado. Como se deriva de la

FIG. 17 (E), los niveles de ARNm de SHBG fueron inversamente proporcionales a los niveles de ARNm de ACC ($r = 0,2868$, $p < 0,012$). Se realizó el análisis de los niveles de ARNm de ACC en las biopsias humanas con los cebadores y protocolos desvelados en el Ejemplo 3.4 para biopsias de hígado de ratón.

- 5 Además, dado que la expresión de SHBG hepática en seres humanos está regulada por HNF-4 α y PPAR γ 2 (véase, por ejemplo, Selva *et al.*, "Peroxisome-Proliferator Receptor y Represses Sex Hormone Binding Globulin Expression", *Endocrinology*-2009, Vol. n $^{\circ}$:150(5), pág.:2183-9), se analizó si los niveles de ARNm de SHBG se correlacionaban con los niveles de ARNm de ambos factores de transcripción en las 15 biopsias de hígado humano. Los resultados mostrados en la FIG. 17 (C y D), demuestran que los niveles de ARNm de SHBG son directamente
10 proporcionales a los niveles de ARNm de HNF-4 α ($r = 0,621$, $p < 0,05$) e inversamente proporcionales a los niveles de ARNm de PPAR γ 2 ($r = -0,643$, $p < 0,05$).

Para estos ensayos (los niveles de expresión del gen de SHBG en biopsias de hígado humano y los niveles de ARNm de HNF-4 α y PPAR γ 2), se homogeneizaron muestras de hígado humano usando el reactivo TRIzol
15 (Invitrogen SA). Se realizó la transcripción inversa (RT) a 42 °C, durante 50 min usando 3 μ g de ARN total y 200 U de Superscript II junto con un cebador oligo-dT y reactivos proporcionados por Invitrogen. Se amplificó una parte alícuota del producto de RT en una reacción de 25 μ l usando SYBR Green (Invitrogen SA) con los pares de cebadores de oligonucleótidos apropiados (véase a continuación) correspondientes a HNF-4 α humana, PPAR γ 2 humana y SHBG humana. Los resultados se analizaron usando el programa 7000 SDS.

- 20 Cebadores para HNF-4 α humana (en dirección 5'-3'): Directo, GCTCCTCCTTCTGCTGCTGC (SEQ ID NO: 29); Inverso, GGAAGAGCTTGAGACAGGCC (SEQ ID NO: 30).
Cebadores para PPAR γ 2 humana (en dirección 5'-3'): Directo, CTGGGAGATTCTCTATTGACC (SEQ ID NO: 31); Inverso, CACTTTGATTGCACTTTGGTACTC (SEQ ID NO: 32).
Cebadores para 18S humana (en dirección 5'-3'): Directo, TAACGAACGAGACTCTGGCAT (SEQ ID NO: 33);
25 Inverso, CGGACATCTAAGGGCATCACAG (SEQ ID NO: 34).

Los cebadores para SHBG humana son los mismos que en el Ejemplo 3.6. Los niveles de ARNm de la FIG. 17 están en unidades arbitrarias en relación con los niveles de ARNm de 18S.

- 30 Ejemplo 5. SHBG protege contra la enfermedad del hígado graso inducida por una dieta alta en fructosa.

Para este experimento, se usaron ratones C57BL/6 (WT, controles) y ratones transgénicos con SHBG humana (shbg), pero no obesos.

- 35 Los ratones transgénicos SHBG se obtuvieron como se desvela anteriormente y de acuerdo con Janne *et al.*, "Human Sex-HormoneBinding Globulin Gen Expression in Transgenic Mice", *Molecular Endocrinology* - 1998, Vol. n $^{\circ}$. 12 (1), pág.: 123-136 (*supra*).

Se alimentaron ratones de tipo silvestre (WT) y ratones shbg con una dieta alta en fructosa. (76 % de fructosa)
40 durante 8 semanas. A continuación, se sacrificaron y se analizaron las biopsias de hígado para ver la acumulación total de triglicéridos (TG) en ambos tipos de animales.

Como se puede observar en la FIG. 18, paneles (A) y (B), la cantidad de triglicéridos en el hígado fue mayor en los ratones WT que en los transgénicos (shbg). En el panel A, que es una muestra de imágenes de microscopio
45 (Olympus-BX61) de una sección de parafina del hígado, se observa cómo las gotitas de lípidos en los ratones transgénicos son más pequeñas que en los WT. El panel B demuestra las diferencias significativas entre ambos animales como los TG en nmol por gramo de tejido. La detección total de triglicéridos se midió usando un kit de ensayo de triglicéridos (n. $^{\circ}$ de cat. K622-100 BioVision) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 50 Al igual que en el Ejemplo 3.4 y siguiendo el mismo protocolo, se estudió la lipogénesis mediante la determinación de los niveles de ARNm y de proteínas de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS). Los datos de este análisis se ilustran en la FIG. 18, paneles (C) y (D).

De todos estos ensayos en ratones alimentados con una dieta alta en fructosa, se puede concluir que la SHBG actúa
55 como un agente profiláctico que evita la evolución a la esteatosis hepática.

Ejemplo 6. La SHBG protege contra la obesidad en ratones alimentados con una dieta alta en lípidos.

- Se alimentaron ratones de tipo silvestre (WT) y ratones shbg como en el Ejemplo 5 con una dieta alta en lípidos
60 (50 % de lípidos, de los cuales el 46 % era de manteca de cerdo y el 4 % era de grasa de soja) durante 8 semanas.

Se siguió el aumento de peso a lo largo de las semanas y se representó en la FIG. 19 (A), en la que se representa gráficamente el peso en gramos de ratones por semana tras el consumo de la dieta grasa. Aunque el peso aumentaba semanalmente, los ratones shbg tenían siempre un peso inferior al de los ratones de tipo silvestre.

Una vez que se sacrificaron los ratones, se analizó el tejido adiposo visceral (TAV en gramos) en ambos tipos de animales. Como se puede observar en la FIG. 19 (B), los ratones de tipo silvestre tenían un tejido adiposo visceral mayor que los animales transgénicos, demostrando así que la SHBG es un protector o agente profiláctico contra la esteatosis hepática, así como contra la obesidad y la acumulación de lípidos. El TAV se determinó de la siguiente manera: se extrajo toda la grasa visceral de los animales y se pesó en una balanza de precisión.

Ejemplo 7. La inhibición de la expresión de SHBG (inhibición de la horquilla pequeña) potencia la acumulación de lípidos (TG) en las células HepG2

10 Para dilucidar un posible mecanismo de acción de la SHBG, se transfectaron de forma estable células HepG2 (n.º de catálogo HB-8065; ATCC) mantenidas en DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos) con un vector que expresaba SHBG (pCMV-SHBG). El vector pCMV-SHBG y el control (pCMV-vacío) fueron los usados y mencionados en varias publicaciones, estando el primero en Bocchinfuso W. P. *et al.* "Expression and differential glycosylation of human sex hormone-binding globulin by mammalian cell lines", *Mol Endocrinol*-1991, Vol. n.º 5(11),
15 1723-1729.

En un ensayo paralelo, se transfectaron las células HepG2 de manera estable con un ARN de horquilla pequeña comercial (Sigma Aldrich) para inactivar el ARNm de SHBG (pIKO.1-SHBG) o el oligo desordenado pIKO.1 como control.

20 De todos los paneles de la FIG. 20, se puede deducir que la SHBG regula el contenido de lípidos en el hepatocito mediante la modulación de los niveles de ACC en las células HepG2. (a) Se determinaron los niveles de ARNm de la SHBG en relación con el ARN 18S en las células HepG2 transfectadas de forma estable con pCMV y pCMV-SHBG (FIG. 20a). Se midió la acumulación de proteína SHBG en el medio usando un ELISA en células HepG2
25 transfectadas de forma estable con pCMV y pCMV-SHBG (FIG. 20b). Se determinaron los niveles de ARNm de ACC en relación con el ARNm 18S en células HepG2 transfectadas de manera estable con pCMV y pCMV-SHBG (FIG. 20c). Se determinaron los niveles de ARNm de SHBG en relación con el ARN 18S en células HepG2 transfectadas de forma estable con shControl y shSHBG (FIG. 20d). Se midió la acumulación de proteína SHBG en el medio usando un ELISA en células HepG2 transfectadas de forma estable con shControl y shSHBG (FIG. 20e). Se
30 determinaron los niveles de ARNm de ACC en relación con el ARN 18S en células HepG2 transfectadas de forma estable con shControl y shSHBG (FIG. 20f). Se midieron los niveles de proteína ACC mediante transferencia Western usando PPIA como proteína de referencia constitutiva en células HepG2 transfectadas de forma estable con pCMV y pCMV-SHBG (FIG. 20g). Se midieron los niveles de proteína ACC mediante transferencia Western usando PPIA como proteína de referencia constitutiva en células HepG2 transfectadas de forma estable con
35 shControl y shSHBG (FIG. 20h). El contenido total de triglicéridos (TG en nmol/mg de proteína) medido en células HepG2 transfectadas de forma estable con pCMV y pCMV-SHBG se puede ver en la FIG. 20(i). El contenido total de triglicéridos (TG en nmol/mg de proteína) medido en células HepG2 transfectadas de forma estable con shControl y shSHBG se puede ver en la FIG. 20j. Los puntos de datos son la media \pm desviación típica de las mediciones por triplicado. $**p < 0,01$ y $*p < 0,05$.

40 En ambos ensayos celulares, la detección de los niveles de ARNm de SHBG y la concentración de proteína de SHBG se realizó como se ilustra en el Ejemplo 3.6. Los niveles de ARNm de ACC se determinaron como se desvela en el Ejemplo 3.4. Para la transferencia Western, se siguieron los protocolos ilustrados en el Ejemplo 3.4 con los anticuerpos contra ACC α y PPIA. Por último, los TG se midieron usando un kit de ensayo de triglicéridos (n.º de cat.
45 K622-100 BioVision) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los datos de la FIG. 20 permiten concluir que si se sobreexpresa SHBG en las células HepG2, se reduce el contenido total de TG (FIG. 20i), a diferencia de las células HepG2, en las que se inhibe la expresión de SHBG (FIG. 20j). Además, esto parece estar relacionado con la expresión de ACC (FIG. 20g y h), de manera que, cuando se
50 sobreexpresa SHBG, se reduce la expresión de ACC (FIG. 20g); y cuando se inhibe la expresión de SHBG, se aumenta la expresión de ACC (FIG. 20h) en relación con los controles.

Todos estos ejemplos permiten concluir que la SHBG redujo significativamente el aumento de peso corporal, la esteatosis hepática, la acumulación de grasa visceral y la inflamación en ratones. Por otra parte, se determinó que
55 los niveles bajos de SHBG encontrados en los ratones obesos se redujeron por una disminución en el nivel de HNF-4 α y un aumento en el nivel de PPAR γ hepáticas. Por último, usando biopsias de hígado humano, se ha encontrado que los niveles de ARNm de SHBG son inversamente proporcionales al contenido total de triglicéridos en el hígado.

Por lo tanto, es posible usar la SHBG y/o un fragmento de la misma en el tratamiento de la obesidad, el sobrepeso y
60 la esteatosis hepática.

Además, debido a su papel lipolítico, es posible usar la SHBG y/o un fragmento de la misma cosméticamente para reducir las reservas de grasa localizadas por vía subcutánea con el fin de mejorar el aspecto corporal de un mamífero, en particular, de un ser humano.

65

Referencias citadas en la solicitud

- Documento EP1541127B1
- 5 - Sutton-Tyrrell *et al.*, "Sex-hormone-binding Globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the Study of Women Across the Nation (SWAN)", *Circulation* - 2005, Vol. n.º 111, pág.:1242-1249.
- Kalme *et al.*, "Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men", *J. Clin. Endocrinol. Metab*-2004, Vol. n.º 90, pág.:1550-1556.
- 10 - Stefan *et al.* "Sex-Hormone-Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes", *The New England Journal of Medicine* - 2009, 361, pág. 2675-2678.
- Selva *et al.*, "Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene", *The Journal of Clinical Investigation* - 2007, Vol. n.º. 117 (12), pág: 3979-3987.
- Selva *et al.*, "Peroxisome-Proliferator Receptor γ Represses Sex Hormone Binding Globulin Expression",
15 *Endocrinology* - 2009, Vol. n.º:150(5), pág.:2183-9.
- Bocchinfuso W. P. *et al.* "Expression and differential glycosylation of human sex hormone-binding globulin by mammalian cell lines", *Mol Endocrinol*-1991, Vol. n.º 5(11), pág. 1723-1729.

Listado de secuencias

- 20 <110> Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron - Institut de Recerca
- <120> Globulina fijadora de hormonas sexuales para su uso como un medicamento
- 25 <130> P2659PC00
- <150> EP13382202
- <151> 30-05-2013
- 30 <160> 34
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 402
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 40

ES 2 711 822 T3

Met Glu Ser Arg Gly Pro Leu Ala Thr Ser Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Arg His Thr Arg Gln Gly Trp Ala Leu Arg Pro
 20 25 30

Val Leu Pro Thr Gln Ser Ala His Asp Pro Pro Ala Val His Leu Ser
 35 40 45

Asn Gly Pro Gly Gln Glu Pro Ile Ala Val Met Thr Phe Asp Leu Thr
 50 55 60

Lys Ile Thr Lys Thr Ser Ser Ser Phe Glu Val Arg Thr Trp Asp Pro
 65 70 75 80

Glu Gly Val Ile Phe Tyr Gly Asp Thr Asn Pro Lys Asp Asp Trp Phe
 85 90 95

Met Leu Gly Leu Arg Asp Gly Arg Pro Glu Ile Gln Leu His Asn His
 100 105 110

Trp Ala Gln Leu Thr Val Gly Ala Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly Arg
 115 120 125

Trp His Gln Val Glu Val Lys Met Glu Gly Asp Ser Val Leu Leu Glu
 130 135 140

Val Asp Gly Glu Glu Val Leu Arg Leu Arg Gln Val Ser Gly Pro Leu
 145 150 155 160

ES 2 711 822 T3

Thr Ser Lys Arg His Pro Ile Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu
 165 170 175

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Arg Leu Pro Leu Val Pro Ala Leu Asp Gly
 180 185 190

Cys Leu Arg Arg Asp Ser Trp Leu Asp Lys Gln Ala Glu Ile Ser Ala
 195 200 205

Ser Ala Pro Thr Ser Leu Arg Ser Cys Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 210 215 220

Ile Phe Leu Pro Pro Gly Thr Gln Ala Glu Phe Asn Leu Arg Asp Ile
 225 230 235 240

Pro Gln Pro His Ala Glu Pro Trp Ala Phe Ser Leu Asp Leu Gly Leu
 245 250 255

Lys Gln Ala Ala Gly Ser Gly His Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Glu
 260 265 270

Asn Pro Ser Trp Leu Ser Leu His Leu Gln Asp Gln Lys Val Val Leu
 275 280 285

Ser Ser Gly Ser Gly Pro Gly Leu Asp Leu Pro Leu Val Leu Gly Leu
 290 295 300

Pro Leu Gln Leu Lys Leu Ser Met Ser Arg Val Val Leu Ser Gln Gly
 305 310 315 320

Ser Lys Met Lys Ala Leu Ala Leu Pro Pro Leu Gly Leu Ala Pro Leu
 325 330 335

Leu Asn Leu Trp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Leu Phe Leu Gly Ala Leu
 340 345 350

Pro Gly Glu Asp Ser Ser Thr Ser Phe Cys Leu Asn Gly Leu Trp Ala
 355 360 365

Gln Gly Gln Arg Leu Asp Val Asp Gln Ala Leu Asn Arg Ser His Glu
 370 375 380

Ile Trp Thr His Ser Cys Pro Gln Ser Pro Gly Asn Gly Thr Asp Ala
 385 390 395 400

Ser His

ES 2 711 822 T3

<210> 2
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Pro Arg Phe Lys Gly Ser Pro Ala Val Leu Phe Lys Leu Thr Tyr Ala
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Cys Phe Ser Leu Arg Leu Thr His Pro Pro Arg Pro Trp
 20 25 30
 Ser Ala His Asp Pro Pro Ala Val His Leu Ser Asn Gly Pro Gly Gln
 35 40 45
 Glu Pro Ile Ala Val Met Thr Phe Asp Leu Thr Lys Ile Thr Lys Thr
 50 55 60
 Ser Ser Ser Phe Glu Val Arg Thr Trp Asp Pro Glu Gly Val Ile Phe
 65 70 75 80
 Tyr Gly Asp Thr Asn Pro Lys Asp Asp Trp Phe Met Leu Gly Leu Arg
 85 90 95
 Asp Gly Arg Pro Glu Ile Gln Leu His Asn His Trp Ala Gln Leu Thr
 100 105 110
 Val Gly Ala Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly Arg Trp His Gln Val Glu
 115 120 125
 Val Lys Met Glu Gly Asp Ser Val Leu Leu Glu Val Asp Gly Glu Glu
 130 135 140
 Val Leu Arg Leu Arg Gln Val Ser Gly Pro Leu Thr Ser Lys Arg His
 145 150 155 160
 Pro Ile Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Phe Pro Ala Ser Asn
 165 170 175
 Leu Arg Leu Pro Leu Val Pro Ala Leu Asp Gly Cys Leu Arg Arg Asp
 180 185 190
 Ser Trp Leu Asp Lys Gln Ala Glu Ile Ser Ala Ser Ala Pro Thr Ser
 195 200 205
 Leu Arg Ser Cys Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Ile Phe Leu Pro Pro
 210 215 220

ES 2 711 822 T3

Gly Thr Gln Ala Glu Phe Asn Leu Arg Asp Ile Pro Gln Pro His Ala
225 230 235 240

Glu Pro Trp Ala Phe Ser Leu Asp Leu Gly Leu Lys Gln Ala Ala Gly
245 250 255

Ser Gly His Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Glu Asn Pro Ser Trp Leu
260 265 270

Ser Leu His Leu Gln Asp Gln Glu Lys Thr Leu Pro Pro Leu Phe Ala
275 280 285

<210> 3
<211> 293
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Glu Ser Arg Gly Pro Leu Ala Thr Ser Arg Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Arg His Thr Arg Gln Gly Trp Ala Leu Arg Pro
20 25 30

Val Leu Pro Thr Gln Ser Ala His Asp Pro Pro Ala Val His Leu Ser
35 40 45

Asn Gly Pro Gly Gln Glu Pro Ile Ala Val Met Thr Phe Asp Leu Thr
50 55 60

Lys Ile Thr Lys Thr Ser Ser Ser Phe Glu Val Arg Thr Trp Asp Pro
65 70 75 80

Glu Gly Val Ile Phe Tyr Gly Asp Thr Asn Pro Lys Asp Asp Trp Phe
85 90 95

Met Leu Gly Leu Arg Asp Gly Arg Pro Glu Ile Gln Leu His Asn His
100 105 110

Trp Ala Gln Leu Thr Val Gly Ala Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly Arg
115 120 125

Trp His Gln Val Glu Val Lys Met Glu Gly Asp Ser Val Leu Leu Glu
130 135 140

Val Asp Gly Glu Glu Val Leu Arg Leu Arg Gln Val Ser Gly Pro Leu
145 150 155 160

10

ES 2 711 822 T3

Thr Ser Lys Arg His Pro Ile Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu
 165 170 175

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Arg Leu Pro Leu Val Pro Ala Leu Asp Gly
 180 185 190

Cys Leu Arg Arg Asp Ser Trp Leu Asp Lys Gln Ala Glu Ile Ser Ala
 195 200 205

Ser Ala Pro Thr Ser Leu Arg Ser Cys Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 210 215 220

Ile Phe Leu Pro Pro Gly Thr Gln Ala Glu Phe Asn Leu Arg Asp Ile
 225 230 235 240

Pro Gln Pro His Ala Glu Pro Trp Ala Phe Ser Leu Asp Leu Gly Leu
 245 250 255

Lys Gln Ala Ala Gly Ser Gly His Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Glu
 260 265 270

Asn Pro Ser Trp Leu Ser Leu His Leu Gln Asp Gln Glu Lys Thr Leu
 275 280 285

Pro Pro Leu Phe Ala
 290

<210> 4
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Met Glu Ser Arg Gly Pro Leu Ala Thr Ser Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Arg His Thr Arg Gln Gly Trp Ala Leu Arg Pro
 20 25 30

Val Leu Pro Thr Gln Ser Ala His Asp Pro Pro Ala Val His Leu Ser
 35 40 45

Asn Gly Pro Gly Gln Glu Pro Ile Ala Val Met Thr Phe Asp Leu Thr
 50 55 60

Lys Ile Thr Lys Thr Ser Ser Ser Phe Glu Val Arg Thr Trp Asp Pro
 65 70 75 80

10

ES 2 711 822 T3

Glu Gly Val Ile Phe Tyr Gly Asp Thr Asn Pro Lys Asp Asp Trp Phe
85 90 95

Met Leu Gly Leu Arg Asp Gly Arg Pro Glu Ile Gln Leu His Asn His
100 105 110

Trp Ala Gln Leu Thr Val Gly Ala Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly Arg
115 120 125

Trp His Gln Val Glu Val Lys Met Glu Gly Asp Ser Val Leu Leu Glu
130 135 140

Val Asp Gly Glu Glu Val Leu Arg Leu Arg Gln Val Ser Gly Pro Leu
145 150 155 160

Thr Ser Lys Arg His Pro Ile Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu
165 170 175

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Arg Leu Pro Leu Val Pro Ala Leu Asp Gly
180 185 190

Cys Leu Arg Arg Asp Ser Trp Leu Asp Lys Gln Ala Glu Ile Ser Ala
195 200 205

Ser Ala Pro Thr Ser Leu Arg Ser Cys Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
210 215 220

Ile Phe Leu Pro Pro Gly Thr Gln Ala Glu Phe Asn Leu Arg Gly Glu
225 230 235 240

Asp Ser Ser Thr Ser Phe Cys Leu Asn Gly Leu Trp Ala Gln Gly Gln
245 250 255

Arg Leu Asp Val Asp Gln Ala Leu Asn Arg Ser His Glu Ile Trp Thr
260 265 270

His Ser Cys Pro Gln Ser Pro Gly Asn Gly Thr Asp Ala Ser His
275 280 285

<210> 5
<211> 384
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Glu Ser Arg Gly Pro Leu Ala Thr Ser Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

10

ES 2 711 822 T3

Leu Leu Leu Leu Leu Arg His Thr Arg Gln Gly Trp Ala Leu Arg Pro
 20 25 30

Val Leu Pro Thr Gln Ser Ala His Asp Pro Pro Ala Val His Leu Ser
 35 40 45

Asn Gly Pro Gly Gln Glu Pro Ile Ala Val Met Thr Phe Asp Leu Thr
 50 55 60

Lys Ile Thr Lys Thr Ser Ser Ser Phe Glu Val Arg Thr Trp Asp Pro
 65 70 75 80

Glu Gly Val Ile Phe Tyr Gly Asp Thr Asn Pro Lys Asp Asp Trp Phe
 85 90 95

Met Leu Gly Leu Arg Asp Gly Arg Pro Glu Ile Gln Leu His Asn His
 100 105 110

Trp Ala Gln Leu Thr Val Gly Ala Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly Arg
 115 120 125

Trp His Gln Val Glu Val Lys Met Glu Gly Asp Ser Val Leu Leu Glu
 130 135 140

Val Asp Gly Glu Glu Val Leu Arg Leu Arg Gln Val Ser Gly Pro Leu
 145 150 155 160

Thr Ser Lys Arg His Pro Ile Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu
 165 170 175

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Arg Leu Pro Ala Glu Ile Ser Ala Ser Ala
 180 185 190

Pro Thr Ser Leu Arg Ser Cys Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Ile Phe
 195 200 205

Leu Pro Pro Gly Thr Gln Ala Glu Phe Asn Leu Arg Asp Ile Pro Gln
 210 215 220

Pro His Ala Glu Pro Trp Ala Phe Ser Leu Asp Leu Gly Leu Lys Gln
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Ser Gly His Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Glu Asn Pro
 245 250 255

Ser Trp Leu Ser Leu His Leu Gln Asp Gln Lys Val Val Leu Ser Ser
 260 265 270

ES 2 711 822 T3

Gly Ser Gly Pro Gly Leu Asp Leu Pro Leu Val Leu Gly Leu Pro Leu
 275 280 285

Gln Leu Lys Leu Ser Met Ser Arg Val Val Leu Ser Gln Gly Ser Lys
 290 295 300

Met Lys Ala Leu Ala Leu Pro Pro Leu Gly Leu Ala Pro Leu Leu Asn
 305 310 315 320

Leu Trp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Leu Phe Leu Gly Ala Leu Pro Gly
 325 330 335

Glu Asp Ser Ser Thr Ser Phe Cys Leu Asn Gly Leu Trp Ala Gln Gly
 340 345 350

Gln Arg Leu Asp Val Asp Gln Ala Leu Asn Arg Ser His Glu Ile Trp
 355 360 365

Thr His Ser Cys Pro Gln Ser Pro Gly Asn Gly Thr Asp Ala Ser His
 370 375 380

<210> 6
 <211> 403
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 6

Met Glu Lys Arg Asp Ser Val Ala Leu His Trp Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Met Pro Pro Pro Thr His Gln Gly Arg Ala Leu Arg
 20 25 30

His Ile Asp Pro Ile Gln Ser Ala Gln Asp Pro Pro Ala Lys Tyr Leu
 35 40 45

Ser Asn Gly Pro Gly Gln Glu Pro Val Met Val Met Thr Ile Asp Leu
 50 55 60

Thr Lys Ile Ser Lys Pro His Ser Ser Phe Glu Phe Arg Thr Trp Asp
 65 70 75 80

Pro Glu Gly Val Ile Phe Tyr Gly Asp Thr Asn Thr Glu Asp Asp Trp
 85 90 95

Phe Leu Leu Gly Leu Arg Ala Gly Gln Leu Glu Ile Gln Leu His Asn
 100 105 110

10

ES 2 711 822 T3

Ala Trp Ala Arg Leu Thr Val Gly Phe Gly Pro Arg Leu Asp Asp Gly
 115 120 125

Arg Trp His Pro Val Glu Leu Lys Met Asn Gly Asp Ser Leu Leu Leu
 130 135 140

Trp Val Asp Gly Lys Glu Met Leu Cys Leu Arg Gln Ile Ser Ala Ser
 145 150 155 160

Leu Ala Asp His Ser Gln Arg Ser Met Arg Ile Ala Leu Gly Gly Leu
 165 170 175

Leu Leu Pro Thr Ser Lys Leu Arg Phe Pro Leu Val Pro Ala Leu Asp
 180 185 190

Gly Cys Ile Arg Arg Asp Ile Trp Leu Gly His Gln Ala Gln Leu Ser
 195 200 205

Ala Ser Pro Arg Thr Ser Leu Gly Asn Cys Asp Val Asp Leu Gln Pro
 210 215 220

Gly Leu Phe Phe Pro Pro Gly Thr His Ala Glu Phe Ser Leu Gln Asp
 225 230 235 240

Ile Pro Gln Pro His Ala Asp Pro Trp Thr Phe Ser Leu Glu Leu Gly
 245 250 255

Phe Lys Leu Val Asp Gly Ser Gly Gln Leu Leu Ala Leu Gly Thr Gly
 260 265 270

Thr Asn Ser Ser Trp Leu Asn Ile His Leu Gln Asn Gln Ser Val Val
 275 280 285

Leu Ser Ser Glu Ala Glu Pro Lys Val Val Leu Pro Leu Asp Val Gly
 290 295 300

Leu Pro Leu Gln Leu Thr Leu Asp Arg Val Lys Val Val Leu Ser Gln
 305 310 315 320

Gly Pro Lys Met Glu Val Leu Ser Met Ser Leu Leu Arg Pro Ala Ser
 325 330 335

Leu Trp Arg Leu Trp Ser His Pro Gln Gly His Leu Ser Leu Gly Ala
 340 345 350

Leu Pro Gly Glu Ser Ser Ser Ala Ser Phe Cys Leu Ser Asp Phe Trp

ES 2 711 822 T3

355

360

365

Val Gln Gly Gln Arg Leu Asp Ile Asp Gln Ala Leu Ser Arg Ser Gln
 370 375 380

Asp Ile Trp Thr His Ser Cys Pro Gln Arg Pro Ser Asn Asp Thr Arg
 385 390 395 400

Thr Ser His

5 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 7
 gccattgga ttgggcta c 21

15 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 8
 cccgaccaag gacttgtg 20

25 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 9
 ggcatcattg ggcactcct 20

35 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 10
 gctgcaagca cagcctctct 20

45 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

ES 2 711 822 T3

<220>
 <223> Cebador directo

 <400> 11
 5 catcttctca aaattcgagt gacaa 25

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso

 <400> 12
 15 tgggagtaga caaggtacaa ccc 23

 <210> 13
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo
 25
 <400> 13
 caaccaacaa gtgatattct ccatg 25

 <210> 14
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso
 35
 <400> 14
 gatccacact ctccagctgc a 21

 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo

 <400> 15
 45 ctgcaagaga ctccatcca gtt 23
 50
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador inverso

 <400> 16
 60 gaagtaggga aggccgtgg 19

 <210> 17
 <211> 20

ES 2 711 822 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador directo

 <400> 17
 agggttcgat tccggagagg 20

 10 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador inverso

 <400> 18
 caactttaat atacgctatt gg 22
 20
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo

 <400> 19
 30 gctgattatg gagagcagag g 21

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso

 <400> 20
 40 ggtcatgaca gcgataggct 20

 <210> 21
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo
 50
 <400> 21
 gtggcgagtc cttatgacac g 21

 <210> 22
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador inverso

 <400> 22
 cacatfgtcg gctaaacctg c 21

ES 2 711 822 T3

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 23
 10 tcttaactgc cggatccaca a 21
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso
 20 <400> 24
 gcccaaacct gatggcatt 19
 <210> 25
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 30 <400> 25
 agccgccttat atgtatcgct ca 22
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso
 40 <400> 26
 tgccgtcata atgattctgt tgg 23
 45 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 27
 55 ctagacctca ggcctgtgaa tgc 23
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador inverso
 <400> 28

ES 2 711 822 T3

ggcaggcagc ctgctgtg 20
 <210> 29
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 10
 <400> 29
 gctcctcctt ctgctgctg 20
 <210> 30
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador inverso
 <400> 30
 ggaagagctt gagacaggcc 20
 25 <210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 31
 ctgggagatt ctctattga cc 22
 35
 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador inverso
 <400> 32
 45 cactttgatt gcacttggg actc 24
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 55 <400> 33
 taacgaacga gactctggca t 21
 <210> 34
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 711 822 T3

<220>

<223> Cebador inverso

<400> 34

5 cggacatcta agggcatcac ag 22

REIVINDICACIONES

1. Globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática en mamíferos, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 5 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera.
2. La globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que 10 las células animales son hepatocitos de mamífero.
3. La globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que es una isoforma de la globulina fijadora de hormonas sexuales humana que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, 15 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y mezclas de las mismas.
4. La globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, que consiste en una isoforma de la globulina fijadora de hormonas sexuales humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y mezclas de las mismas. 20
5. La globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, como un ingrediente de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, en combinación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. 25
6. La globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, como un ingrediente de una composición farmacéutica para la administración parenteral.
- 30 7. Uso de una cantidad cosméticamente eficaz de globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma, para reducir la grasa subcutánea herniada o acumulada dentro del tejido conjuntivo fibroso de debajo de la piel, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la 35 función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el mamífero tiene celulitis.
- 40 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 7-8, en el que la cantidad cosméticamente eficaz de la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma es un ingrediente de una composición tópica cosmética en combinación con excipientes y/o vehículos cosméticamente aceptables.
10. Uso de globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero y/o cualquier fragmento de la misma como agente 45 reductor de lípidos en una muestra aislada que comprende células de mamífero, en la que el fragmento: (a) comprende de 10 a 200 aminoácidos de una secuencia que tiene un porcentaje de homología o identidad de al menos el 80 % con respecto a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 5; y (b) mantiene la función de reducción del contenido de lípidos en una célula animal como la globulina fijadora de hormonas sexuales de mamífero entera. 50

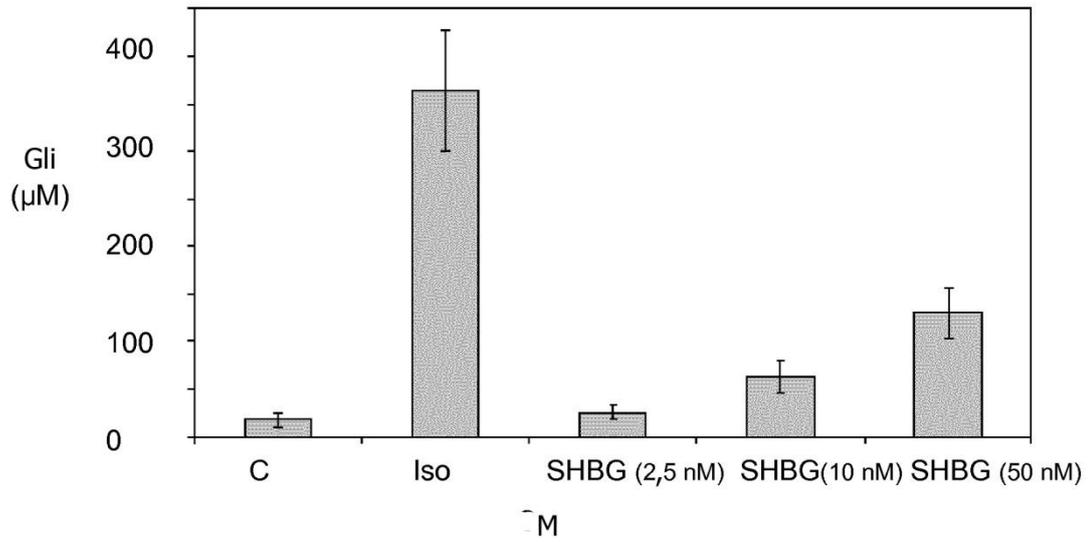


FIG. 1

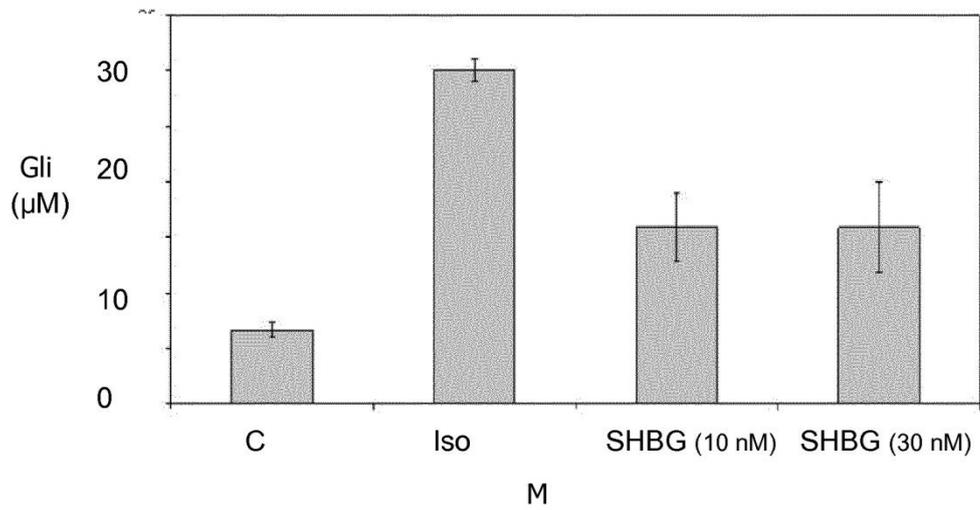


FIG. 2

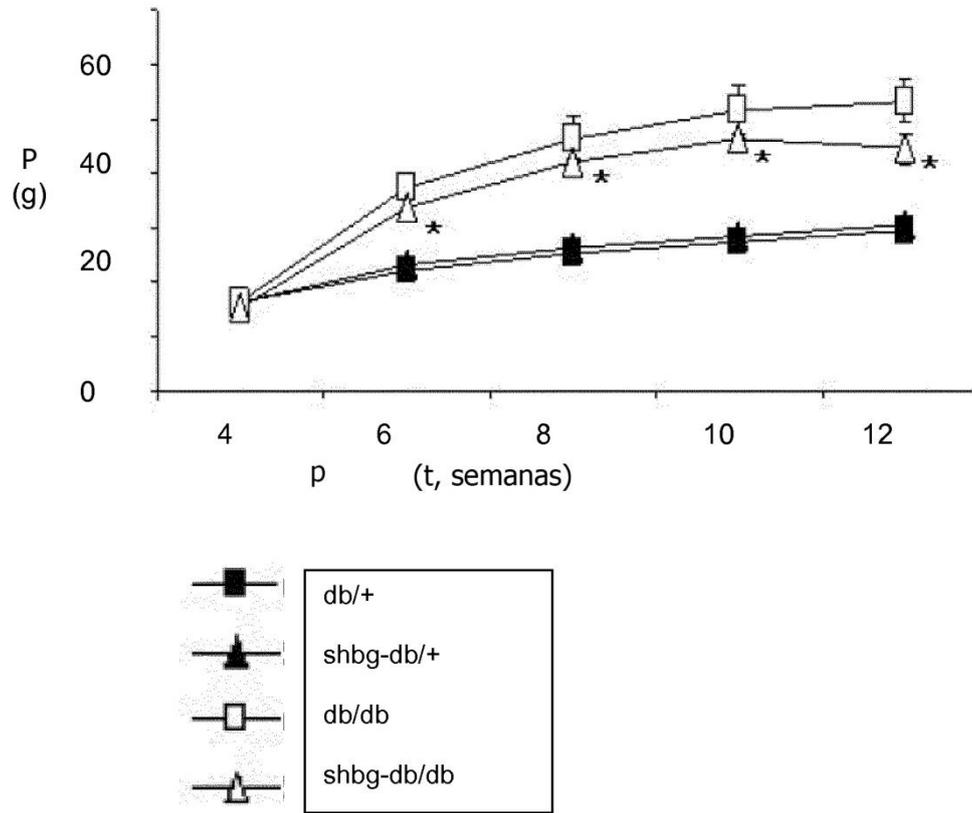


FIG. 3

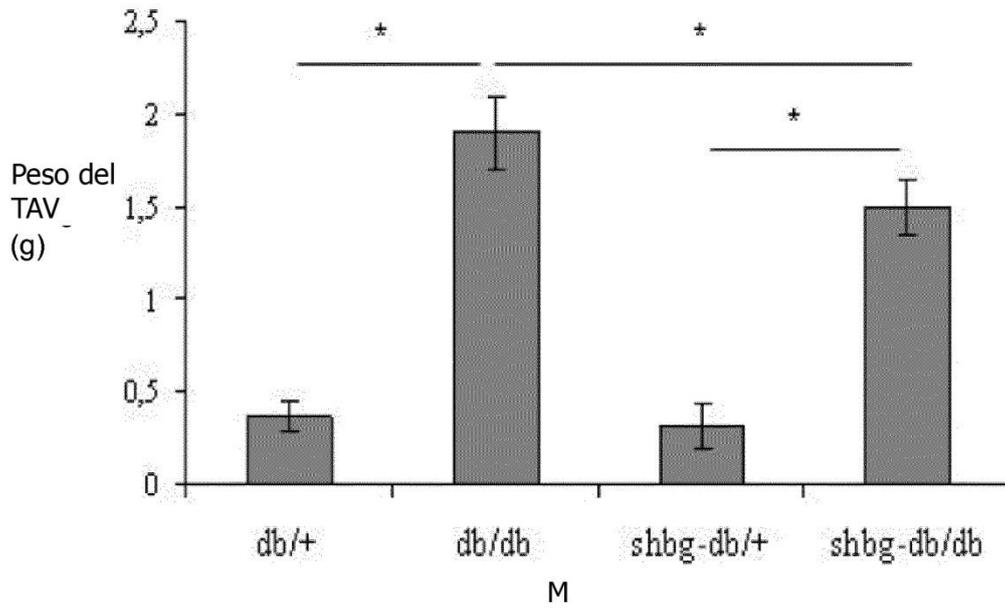


FIG. 4

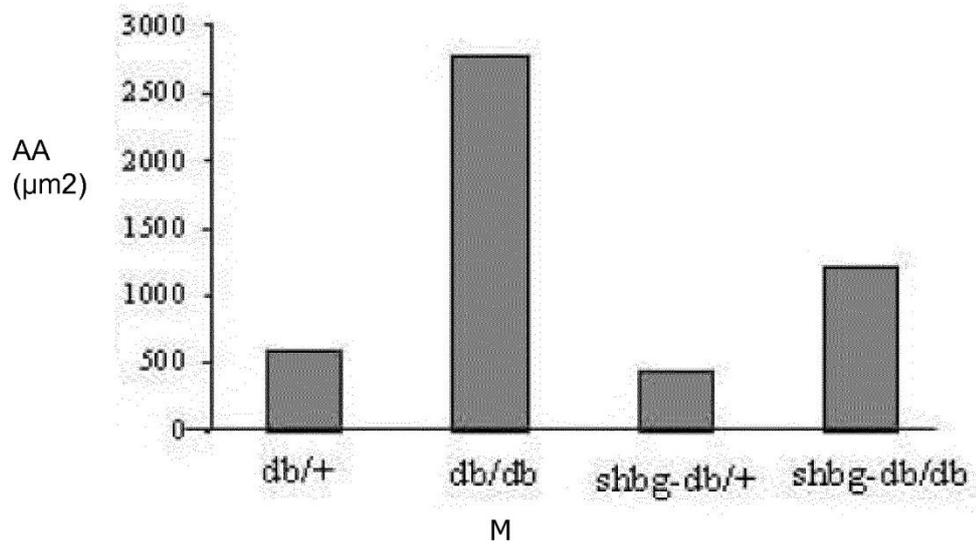


FIG. 5

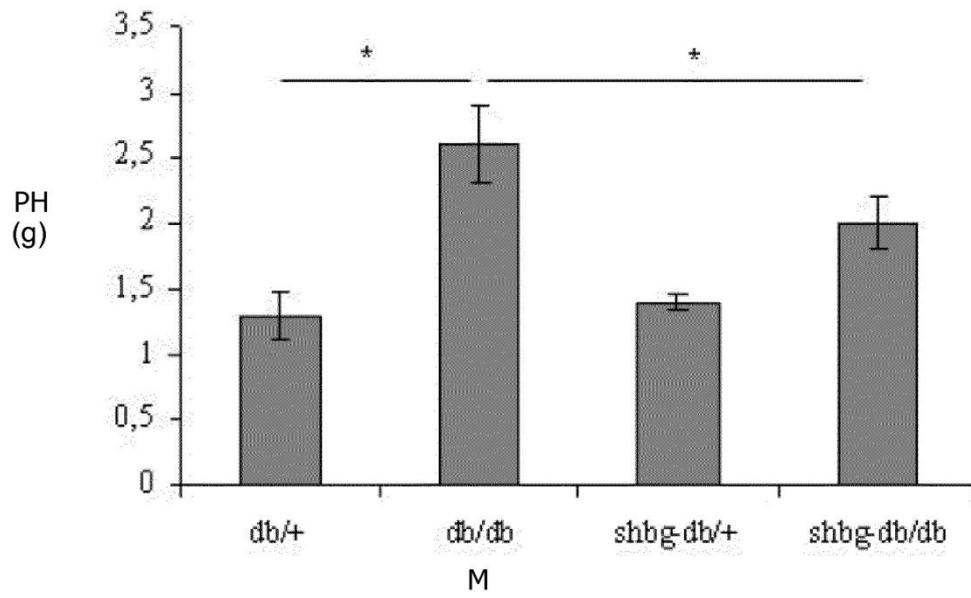


FIG. 6

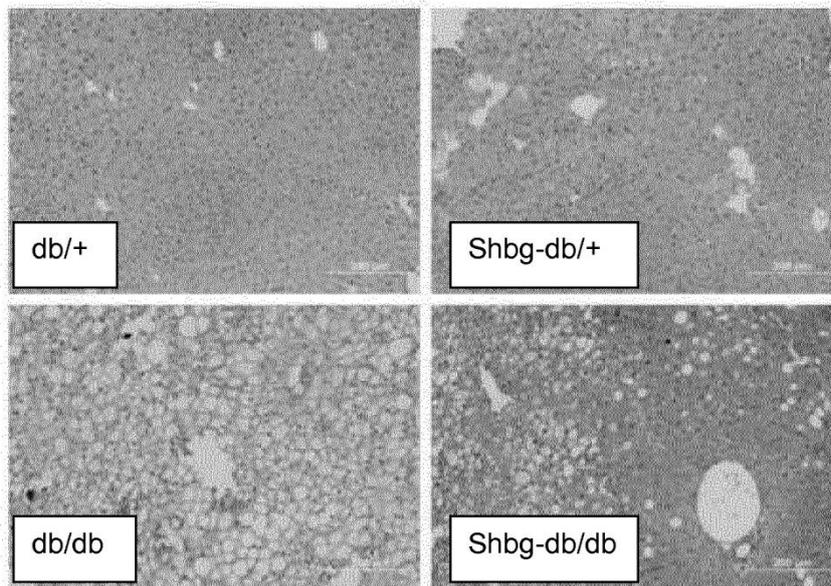


FIG. 7

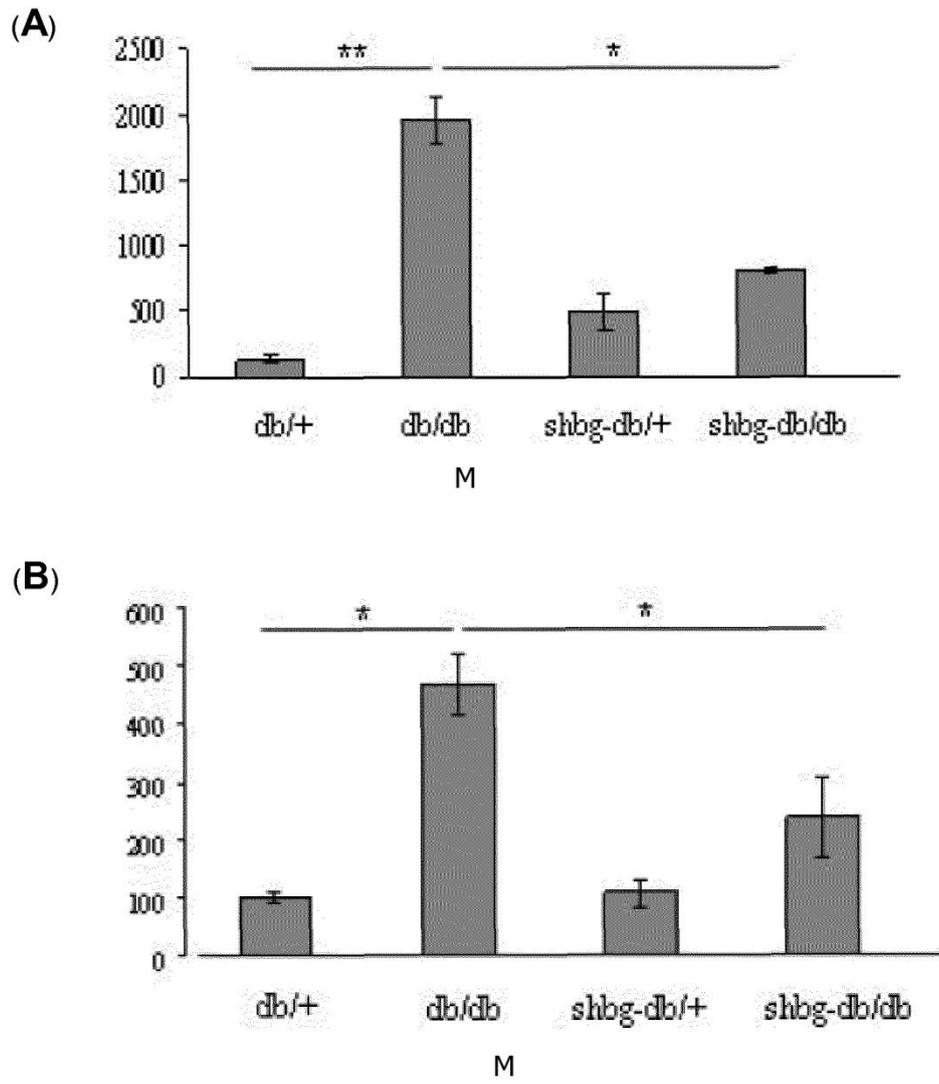
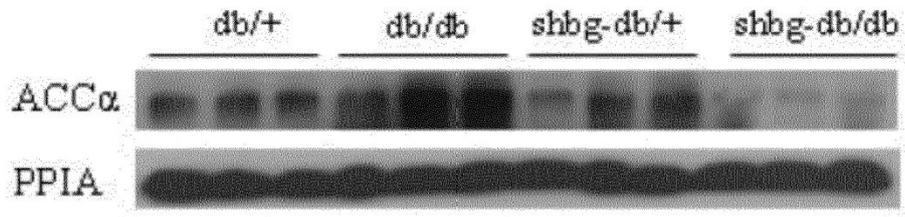


FIG. 8

(A)



(B)

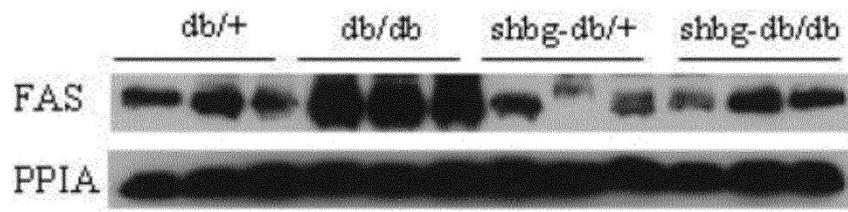


FIG. 9

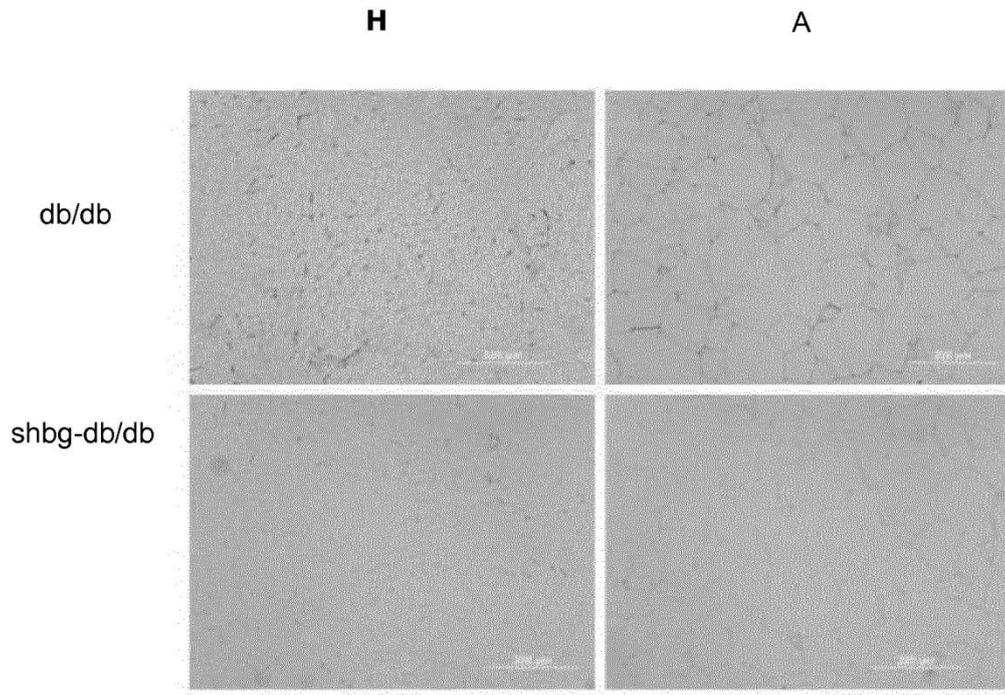


FIG. 10

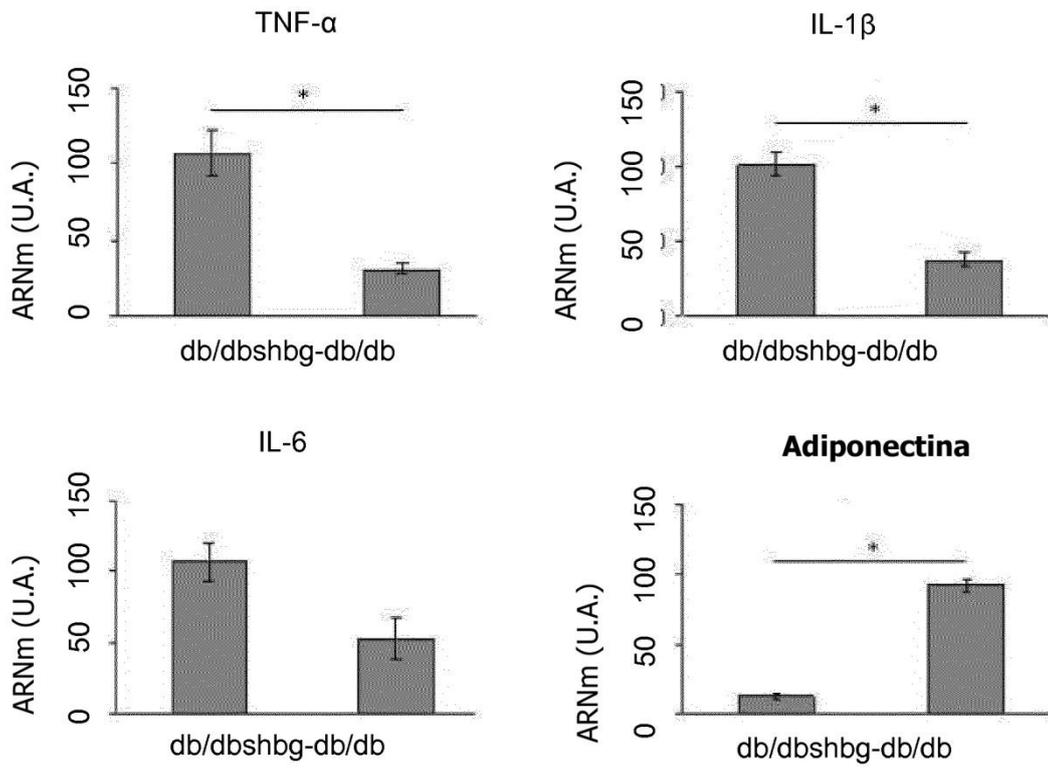


FIG. 11

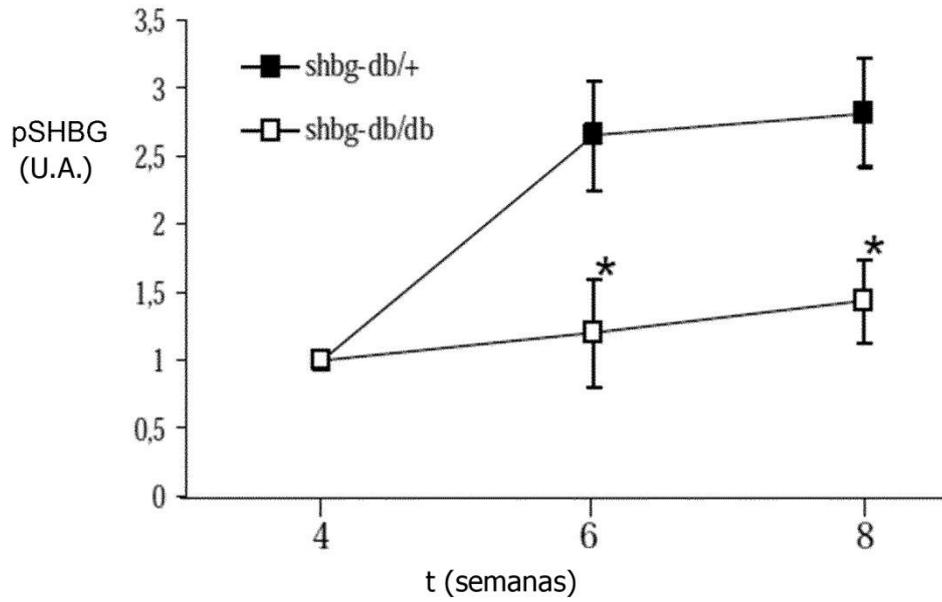
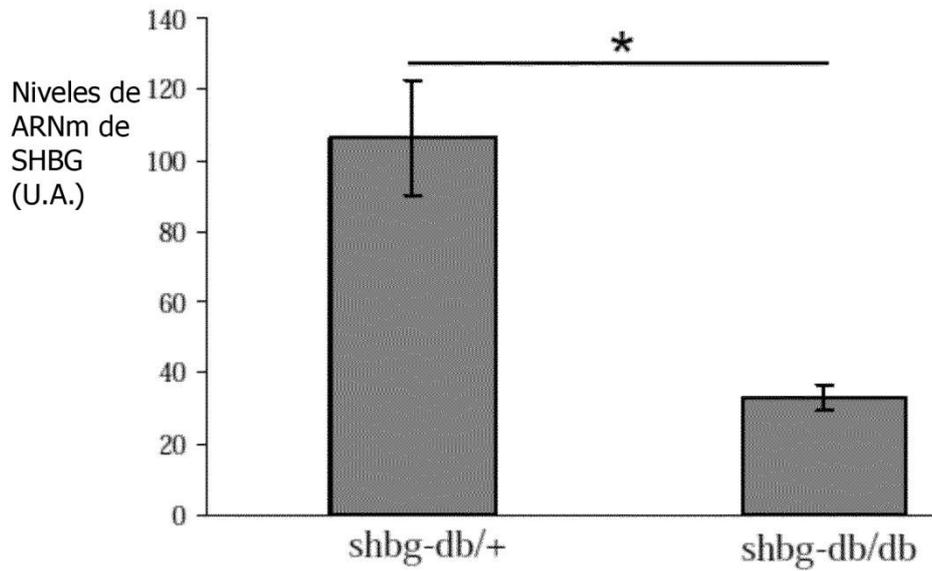
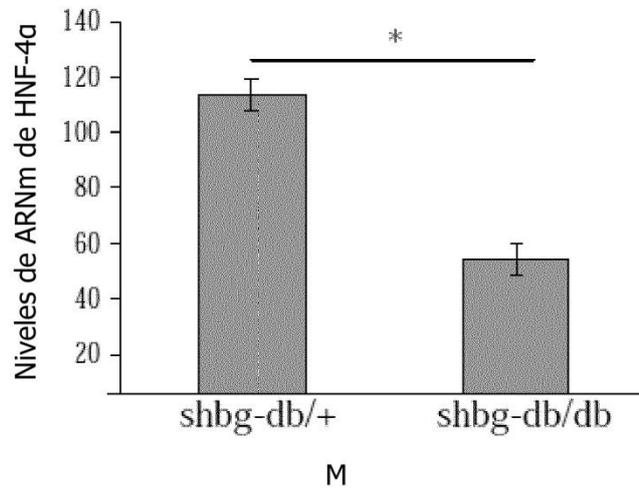


FIG. 12



M
FIG. 13

(A)



(B)

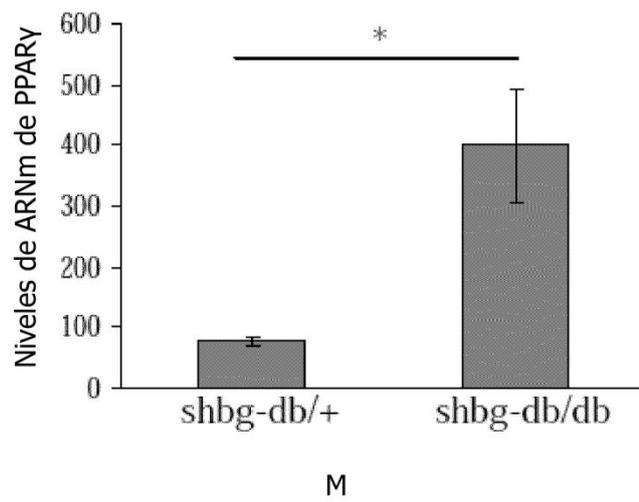


FIG. 14

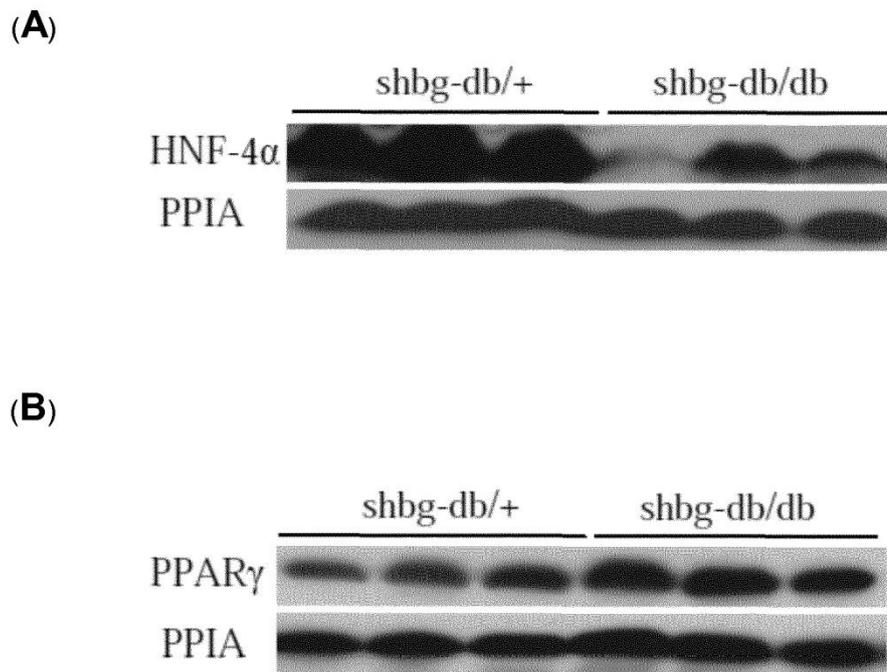


FIG. 15

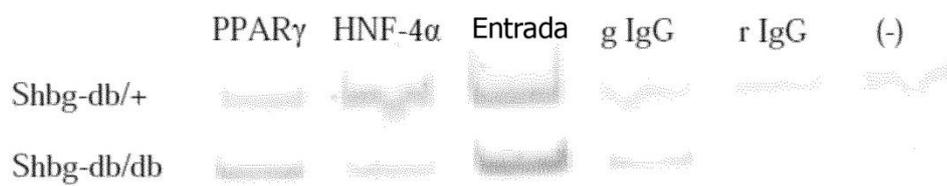


FIG. 16

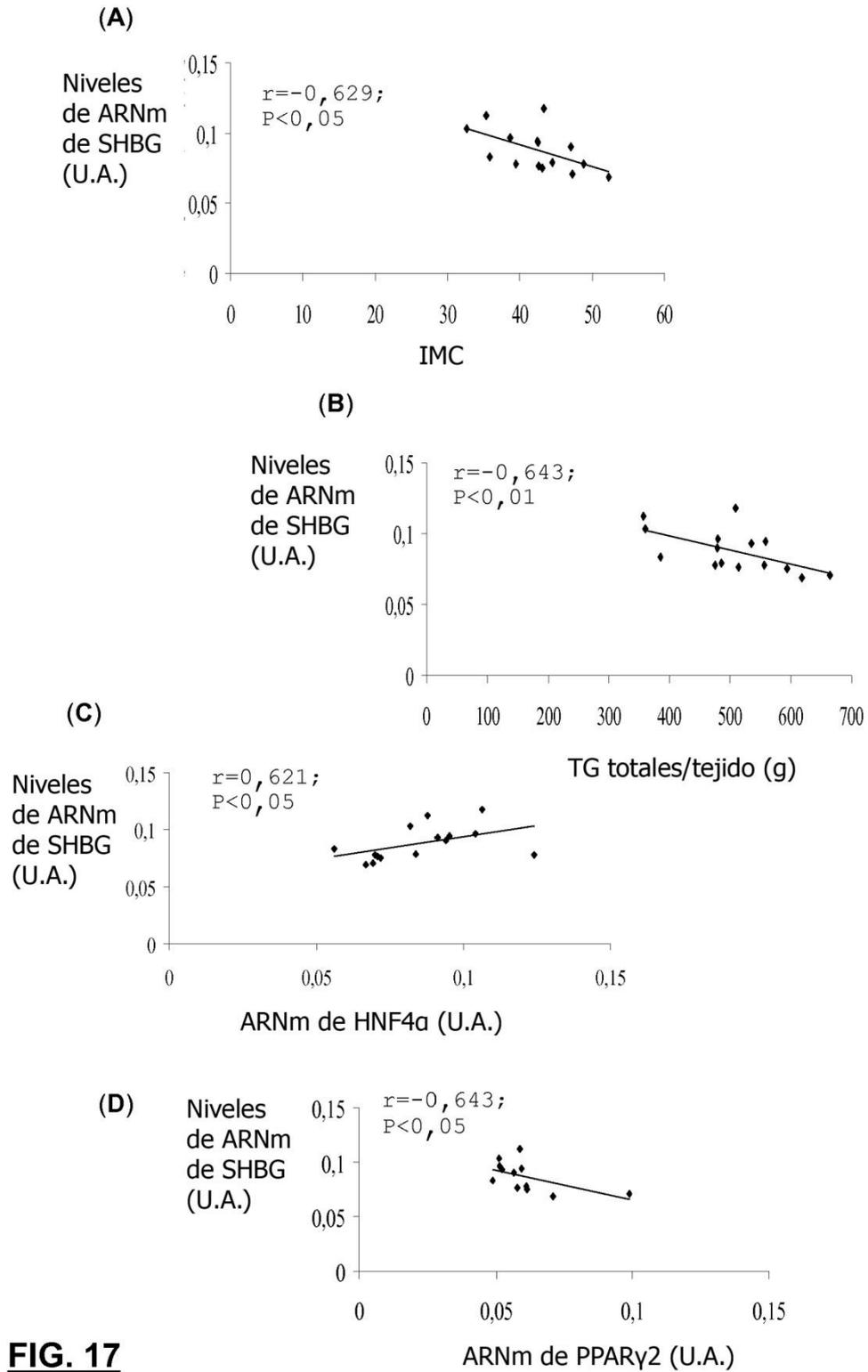
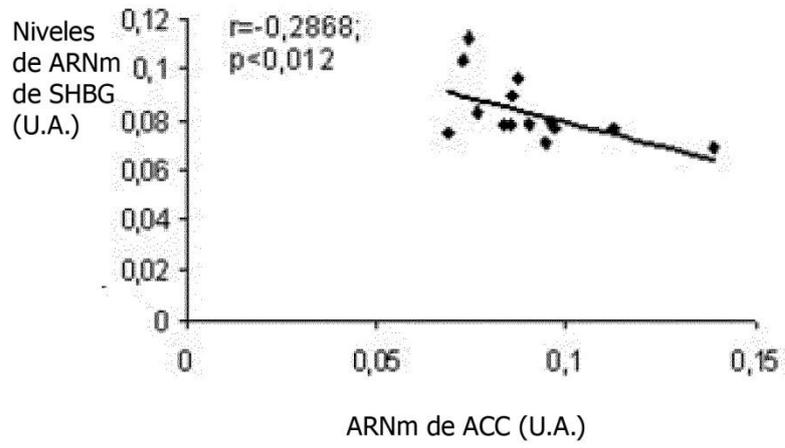


FIG. 17

(E)



Cont. FIG. 17

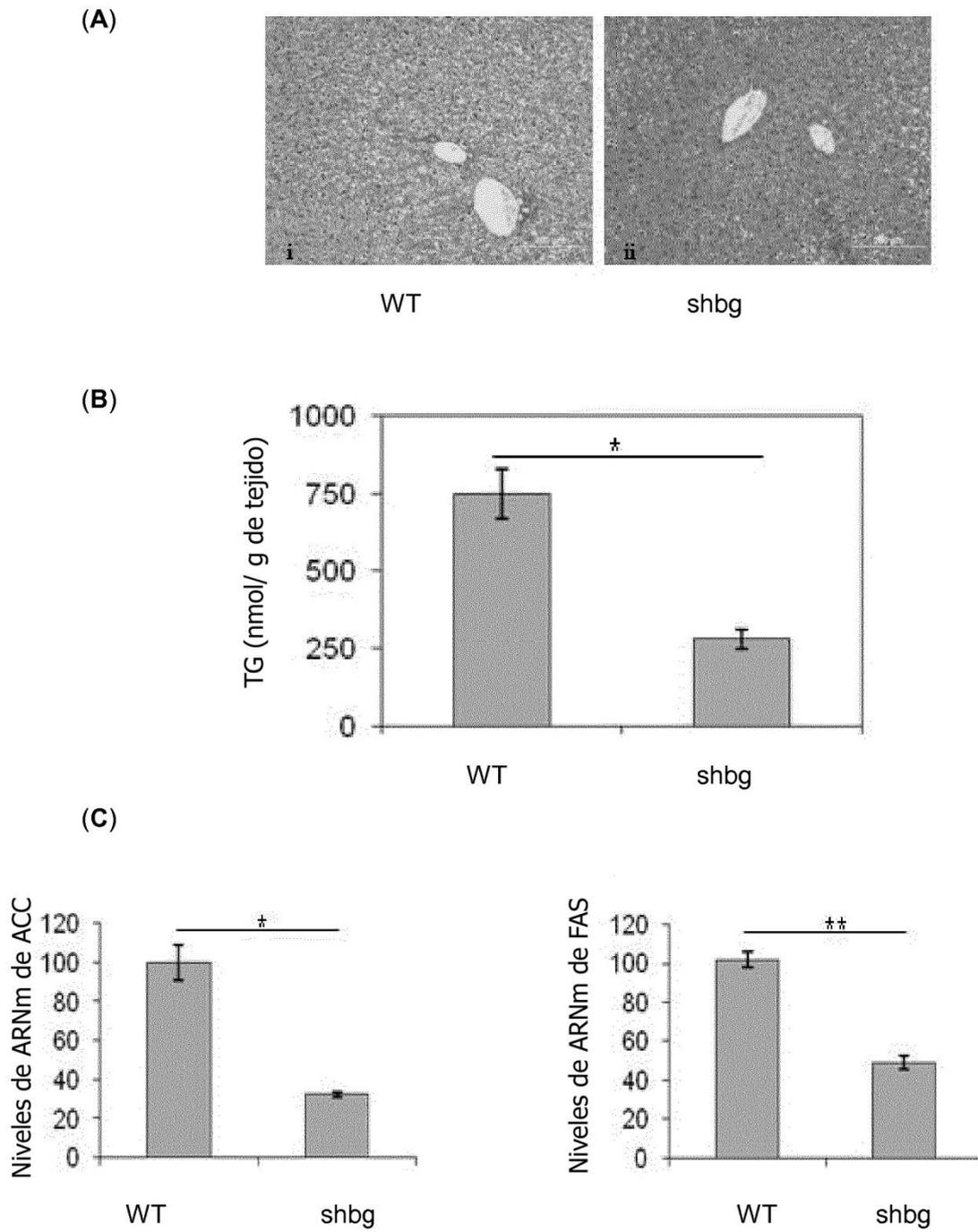
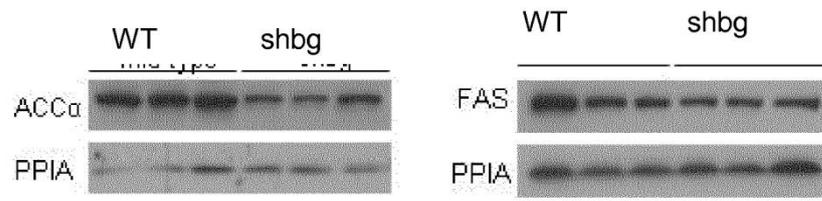


FIG. 18

(D)



Cont. FIG. 18

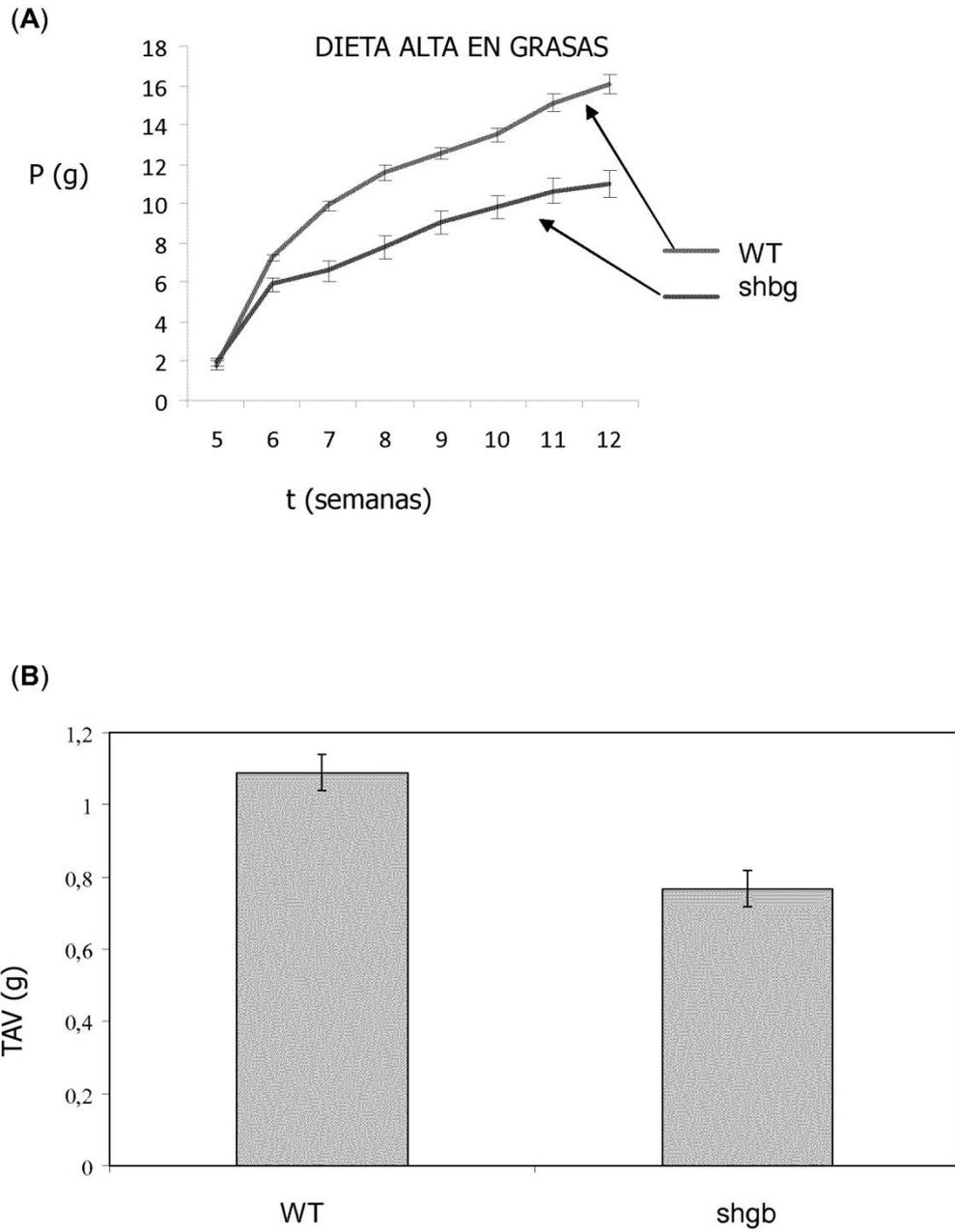
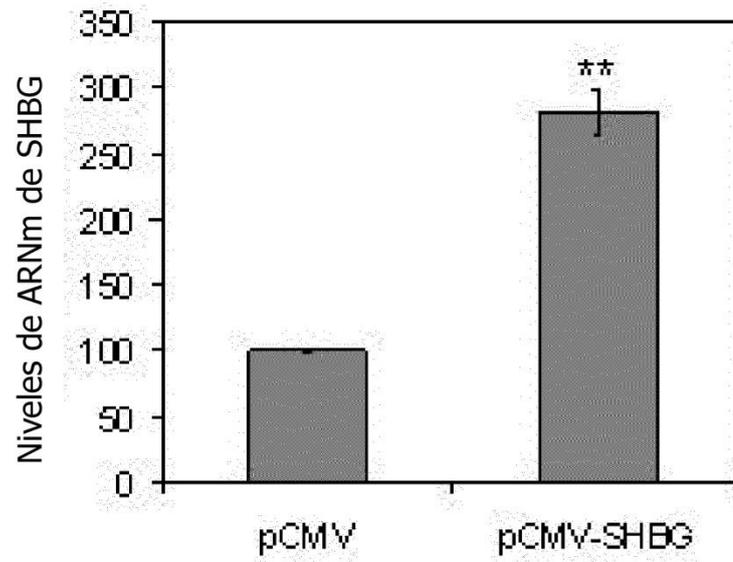


FIG. 19

(a)



(b)

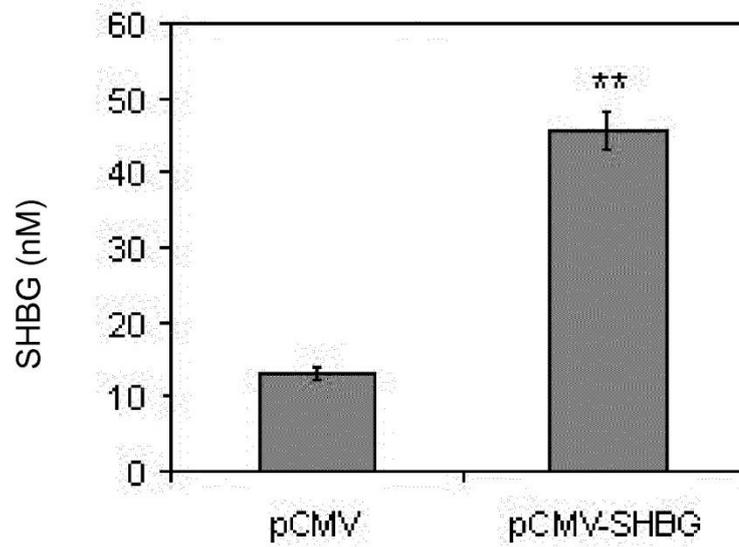
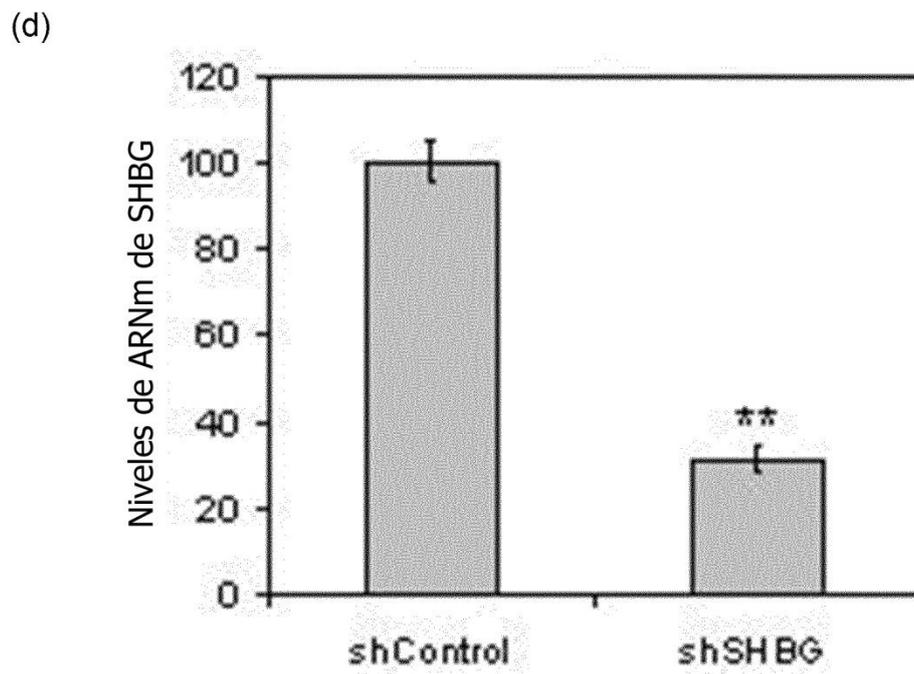
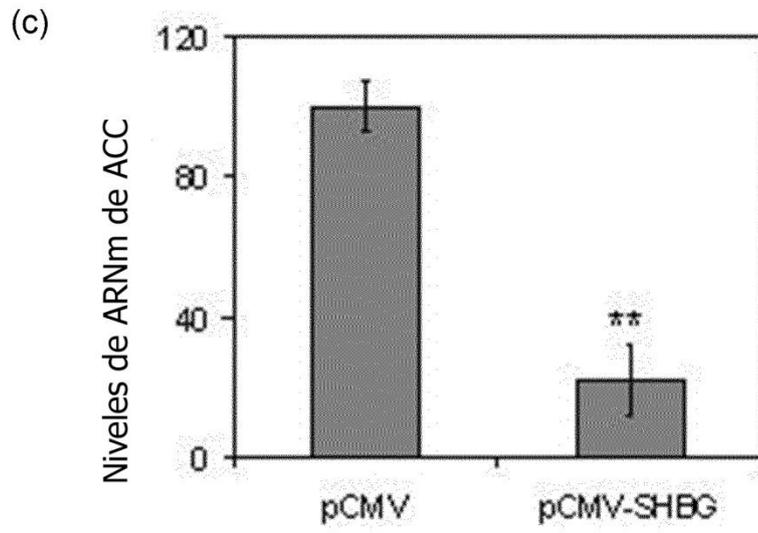
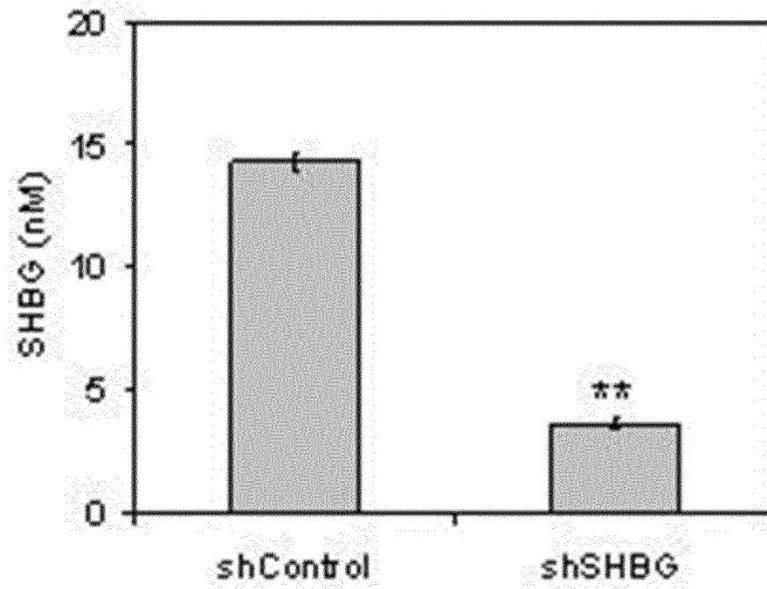


FIG. 20

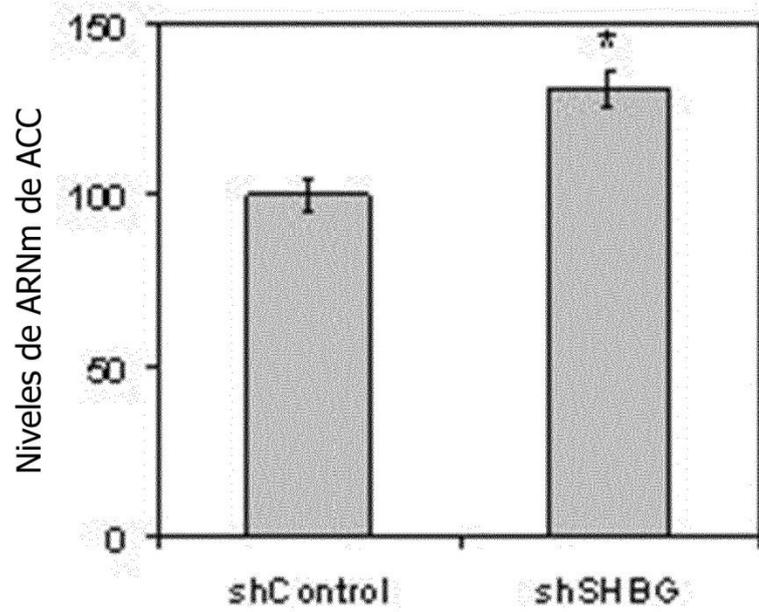


Cont. FIG. 20

(e)

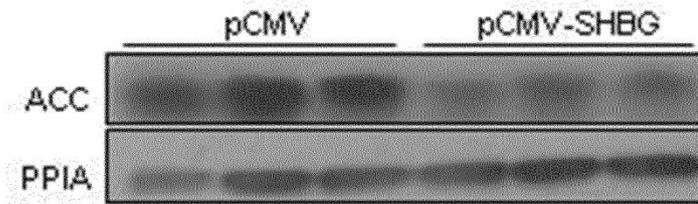


(f)

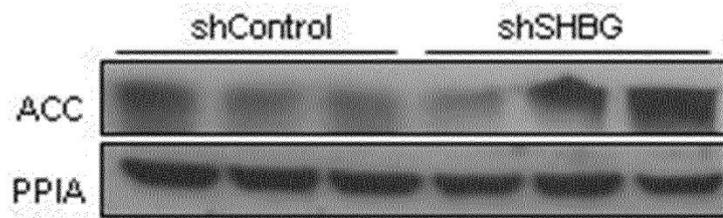


Cont. FIG. 20

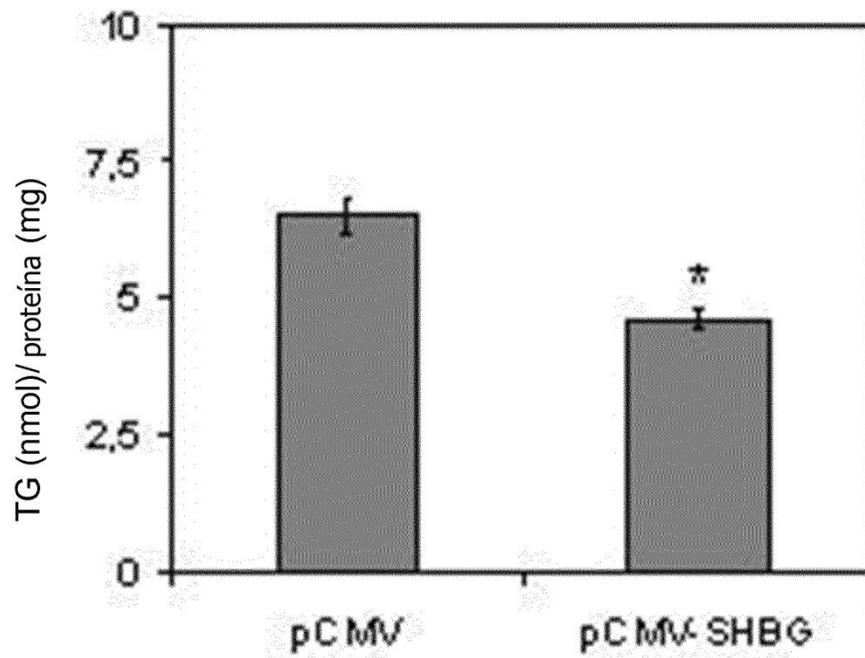
(g)



(h)

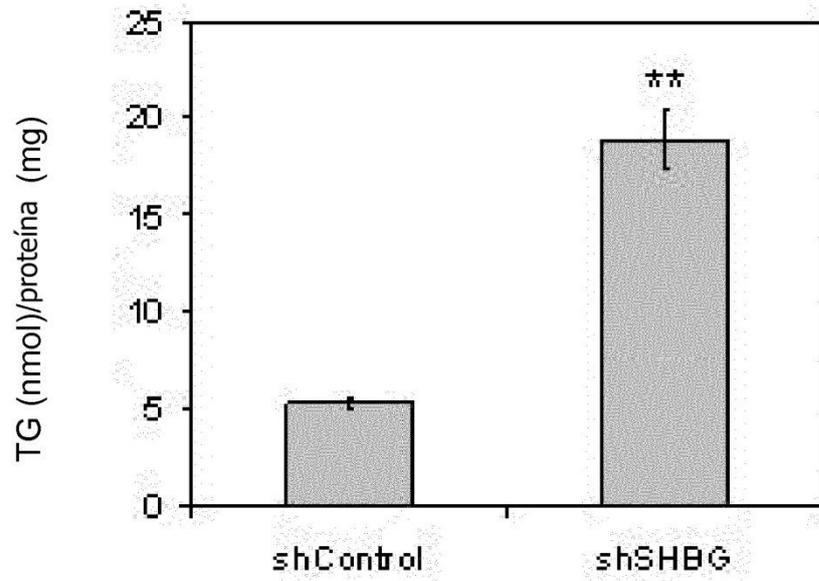


(i)



Cont. FIG. 20

(i)



Cont. FIG. 20