

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 555**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2014 PCT/EP2014/062713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014 E 14730910 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3011341**

54 Título: **Tratamiento de la resistencia a insulina mediante inhibidores del factor de transcripción TSC22D4**

30 Prioridad:

17.06.2013 EP 13172362

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

29.11.2019

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERRIEL DIAZ, MAURICIO;
HERZIG, STEPHAN;
FRIEDRICH, KILIAN y
JONES, ALLAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 733 555 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

Tratamiento de la resistencia a insulina mediante inhibidores del factor de transcripción TSC22D4

La presente invención se refiere a moduladores, en particular inhibidores de la actividad o expresión de TSC22D4 y sus usos para la prevención, tratamiento y/o regulación de la resistencia a insulina, síndrome metabólico y/o diabetes y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina en mamíferos. La presente invención se refiere además a procedimientos de análisis para identificar estos moduladores, el uso de moduladores identificados en el diagnóstico de estas enfermedades, así como kits, que comprenden materiales para realizar los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

Antecedentes de la invención

En los seres humanos, una combinación de almacenamiento excesivo de lípidos y disminución de la eliminación conduce al sobrepeso y las comorbilidades asociadas, que incluyen la resistencia a la insulina, complicaciones cardiovasculares y dislipidemia Langin D. In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. *Cell Metab.* 2011 Nov 2; 14(5):569-70), que en la actualidad afecta a más de 1.500 millones de personas en todo el mundo (Finucane MM, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 91 million participants. *Lancet.* 2011 Feb 12; 377(9765):557-67). En efecto, la resistencia a la insulina representa el componente central del llamado síndrome metabólico, que finalmente lleva al desarrollo de una disfunción metabólica, tal como la intolerancia a la glucosa, falla de las células beta pancreáticas y, finalmente, diabetes tipo 2.

La alteración de la secreción de insulina (células beta), el aumento de la producción de glucosa hepática (hígado) y la disminución de la utilización de glucosa (muscular) periférica constituyen los defectos primarios tradicionales responsables del desarrollo y la progresión de la diabetes mellitus tipo 2. En la actualidad se sabe que la falla de las células beta, que finalmente lleva a una disminución de la secreción de insulina, ocurre mucho más temprano en la historia natural de la diabetes tipo 2 de lo que se creía originalmente. Además, una mejor comprensión de la fisiopatología de la diabetes tipo 2 revela otros mecanismos etiológicos más allá de la tríada clásica, ahora denominada como el octeto ominoso. Además de las células beta, el hígado y el músculo, otros mecanismos patógenos incluyen resistencia a la insulina de los adipocitos (lipólisis aumentada), reducción de la secreción/sensibilidad de incretina (gastrointestinal), aumento de la secreción de glucagón (células alfa), aumento de la reabsorción de glucosa (riñón), y la resistencia a la insulina del sistema nervioso central resultante de la disfunción del neurotransmisor (cerebro).

Actualmente, el manejo de la diabetes tipo 2 se centra en el control de la glucosa a través de la disminución de la glucemia (en ayunas y postprandial) y la hemoglobina A(1c). Sin embargo, el objetivo de la terapia debe ser retrasar la progresión de la enfermedad y el fracaso eventual del tratamiento. El tratamiento se debe dirigir a los trastornos patógenos conocidos de la enfermedad (es decir, reducir el deterioro de la función de las células beta y mejorar la sensibilidad a la insulina). En los últimos años, las estrategias de tratamiento se han centrado en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas que afectan a muchos de los defectos que contribuyen a la diabetes tipo 2 y que proporcionan un control de la glucosa duradero a través de una reducción de la progresión de la enfermedad. El manejo óptimo de la diabetes tipo 2 debe incluir el inicio temprano de la terapia con múltiples fármacos, con diferentes mecanismos de acción, en combinación (DeFronzo RA. (Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Overview of newer agents: where treatment is going. *Am J Med.* 2010 Mar;123(3 10 Suppl): S38-48).

Especialmente la insensibilidad de los principales órganos metabólicos frente a la acción de la insulina, que incluye el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, contribuye sustancialmente a la progresión de la enfermedad y a la última necesidad de intervención farmacológica para prevenir las complicaciones tardías del diabético. Por lo tanto, la sensibilización a la insulina eficiente y segura aún es un blanco atractivo y un objetivo en la terapia antidiabética.

Los complejos de cofactor transcripcional se han identificado como puntos de control importantes en la coordinación de programas metabólicos en diversos tejidos, que incluyen hígado y tejido adiposo blanco (WAT) (para una revisión, ver Sommerfeld A, Kroner-Herzig A, Herzig S. Transcriptional cofactors and hepatic energy metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Jan 30;332(1-2):21-31).

Kester HA, et al. (en: Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27439-47) describen que el TGF-beta-clon-22 estimulado (TSC-22) codifica una proteína que contiene un cierre de leucina que se conserva altamente durante la evolución.

Además, Jones et al. (en Jones, A., et al., Transforming growth factor-beta Stimulated Clone-22 D4 is a molecular output of hepatic wasting metabolism. *EMBO Mol Med.* 2013 Feb; 5(2):294-308) describen que, como vía de salida de la caquexia molecular, los niveles hepáticos del factor de transcripción del factor de crecimiento transformante beta 1-clon estimulado (TSC)22 D4 aumentaron en la caquexia por cáncer. La imitación de altos niveles caquécticos de TSC22D4 en hígados sanos llevó a la inhibición de la liberación de VLDL hepática y los genes lipogénicos, y disminuyó los niveles sistémicos de VLDL en condiciones dietas normales y altas en grasas. Por lo tanto, la actividad hepática de TSC22D4 puede representar una base molecular para la privación de energía periférica en sujetos con

enfermedades metabólicas, que incluyen la caquexia incluida la caquexia el cáncer. Jones et al. describen un oligonucleótido dirigido al TSC22D4 de ratón.

Los documentos WO 2013/076501, WO 2005/059564 y WO 2012/158123 están relacionados con la identificación de blancos farmacológicos para el tratamiento de la resistencia a insulina, síndrome metabólico diabetes

5 Kulozik Ph., et al. (Hepatic deficiency in transcriptional co-factor TBL1 promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia. 2011 Cell Metab. 13: 389-400) describen que la expresión hepática alterada del cofactor transcripcional transducina tipo beta (TBL) 1 representa una característica común de los modelos de ratón de hígado graso mono y multigénico. La ablación específica del hígado de la expresión del gen TBL1 en ratones sanos promovió la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática en condiciones dietarias normales y altas en grasa. Debido a que se halló que los niveles de expresión de TBL1 también se correlacionan inversamente con el contenido de grasa hepática en pacientes humanos, la falta de actividad del cofactor hepático TBL1/TBLR1 puede representar una base molecular para la esteatosis hepática en sujetos con obesidad y síndrome metabólico.

15 Berriel Diaz, M., et al. (Nuclear receptor co-factor RIP140 controls lipid metabolism during wasting in mice. 2008. Hepatology 48: 782-791) describen que mediante el impedimento de la movilización de las reservas de TG hepáticas, la inducción de RIP140 en el hígado proporciona una base molecular para la esteatosis hepática en la inanición, sepsis o caquexia del cáncer. La inhibición de la actividad transcripcional del RIP140 hepático, por lo tanto, podría proporcionar un esquema adyuvante atractivo en el tratamiento de estas afecciones.

20 Farese et al. (en: The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. Cell Metab. 2012 May 2;15(5):570-3) describen que la deposición excesiva de grasa en el hígado (esteatosis hepática) con frecuencia se acompaña de resistencia a la insulina hepática.

Las clases principales de fármacos antidiabéticos y/o sensibilizadores a la insulina incluyen sulfonilureas, metformina, tiazolidina dionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, miméticos de incretina e inhibidores de la dipeptidilpeptidasa 4, todos los cuales están asociados con limitaciones severas (para revisión ver Moller, Metabolic disease drug discovery- "hitting the target" is easier said than done. Cell Metab. 2012 Jan 4;15(1):19-24).

25 A pesar del papel clave de la resistencia a la insulina en la patogénesis de la diabetes tipo 2, todavía faltan sensibilizadores a la insulina eficaces y seguros. En efecto, los fármacos actuales de la familia de las tiazolidinodionas muestran un perfil de eficacia moderado y se acompañan de efectos secundarios sustanciales, que incluyen aumento de peso, aumento de riesgo de insuficiencia cardíaca, posible aumento del riesgo de cáncer de vejiga y mayor riesgo de infarto de miocardio, por ejemplo, lo que lleva a la reciente retirada del mercado de la rosiglitazona.

30 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos objetivos y estrategias para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina.

35 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, el objeto anterior se resuelve mediante la identificación de un modulador para la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tales como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral en un mamífero, que comprende las etapas de: a) proporcionar una muestra biológica, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, b) poner en contacto dicha muestra con al menos un modulador putativo de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, y c) detectar un enlace entre dicho al menos un modulador putativo y dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, d) identificar dicho modulador de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, y e) evaluar al menos una de la actividad o expresión de TSC22D4 en presencia o ausencia de dicho modulador, en que una disminución entre la actividad o expresión de TSC22D4 medida en presencia de dicho modulador en comparación con la actividad o expresión de TSC22D4 medida en ausencia de dicho modulador indica que dicho modulador se utiliza en la prevención y/o el tratamiento de la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.

50 Los presentes inventores han demostrado que el regulador transcripcional del factor de crecimiento transformante beta 1-clon 22 D4 estimulado (TSC22D4) controla la sensibilidad a la insulina hepática y sistémica. Por lo tanto, TSC22D4 representa un objetivo molecular y específico del órgano definido, que regula varios nodos clave en la cascada de señalización de la insulina, de este modo mejora la sensibilidad a la insulina hepática y sistémica y normaliza la hiperglucemia diabética. El complejo de transcripción TSC22D4 sirve como un nuevo blanco molecular para estrategias basadas en interferencias que se pueden manipular para mejorar la sensibilidad a la insulina y restaurar la homeostasis normal de la glucosa en condiciones diabéticas. Además, en los experimentos que se realizaron en el contexto de la presente invención, una pérdida específica de hígado de TSC22D4 aumentó significativamente la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, y contrarrestó la hiperinsulinemia. El complejo TSC22D4 se identificó como un nuevo punto de control molecular en la sensibilización a insulina y se han desarrollado estrategias de inactivación (mediadas por ARNsh, ARNsi y ARNm). La manipulación de TSC22D4 en el hígado con enfoques de direccionamiento específicos del hígado (por ejemplo, estrategias de inactivación basadas en ARNsi)

debe evitar efectos secundarios importantes en otros tejidos.

Más detalladamente, el análisis de la secuencia ChIP del cistroma TSC22D4 (NM_030935) en combinación con el transcriptoma blanco TSC22D4 de alto rendimiento en animales sanos reveló que los principales nodos de la vía de señalización de insulina fueron dirigidos directa o indirectamente por TSC22D4, más notablemente lipocalina 13, Grb14 y SOCS 2/3. La regulación por disminución o la sobreexpresión de TSC22D4 en hepatocitos primarios de ratón, así como en ratones de tipo salvaje llevaron a regulación por aumento o disminución de la vía de señalización de la insulina intracelular, respectivamente, según lo determinado por la fosforilación de la quinasa Akt/PKB en Ser473 y de GSK3beta en Ser9, en respuesta a la exposición aguda a la insulina, respectivamente.

La inactivación hepática de TSC22D4 en ratones diabéticos db/db mejoró la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en estos animales y normalizó la glucosa en sangre a niveles casi saludables. En congruencia con una mejora general del estado metabólico en los animales diabéticos, los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y la resistencia fueron significativamente menores en ratones con deficiencia de TSC22D4 específica del hígado. Es de destacar que la inactivación de TSC22D4 en células de hepatoma no aumentó el crecimiento celular, sino que disminuyó la proliferación, lo que sugiere que la función de sensibilización a la insulina de TSC22D4 no produce aumento de susceptibilidad al cáncer en las células/órganos afectados.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicha actividad o expresión de TSC22D4 sea actividad o expresión hepática, es decir, actividad y/o expresión en células o tejido hepático.

De más preferencia es un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicha actividad o expresión de TSC22D4 es actividad o expresión hepática. Por lo tanto, la actividad y/o expresión se analiza en células o tejido hepático.

En una realización, la muestra biológica del procedimiento de acuerdo con la presente invención se pone en contacto con el compuesto candidato in vitro o in vivo.

En otro aspecto más del procedimiento de acuerdo con la presente invención, dicho procedimiento comprende además la etapa de analizar el efecto de dicho modulador en la prevención y/o el tratamiento de la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2. y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral. Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, que comprende además la etapa de analizar la glucosa en sangre, los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y/o la resistencia en una muestra biológica derivada de dicho mamífero. Dicha prueba puede implicar, por lo tanto, el análisis de marcadores en una muestra biológica del sujeto que se va a analizar, tal como, por ejemplo, concentración de insulina, concentración de péptido c, concentración de interleuquina 6, concentración de leptina, concentración de resistina, concentración de TNF alfa, concentración de glucagon y/o concentración de PYY, preferiblemente en presencia o ausencia de dicho modulador. Los ensayos respectivos son conocidos por los expertos.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho modulador es un compuesto candidato seleccionado de una molécula de biblioteca de péptidos, un aptámero, una molécula de biblioteca combinatoria, una molécula derivada de extracto celular, un fármaco de molécula pequeña, un metabolito bacteriano, una molécula de despliegue en fagos, un anticuerpo o un fragmento del mismo, una proteína, un fragmento de proteína, un polinucleótido, un oligonucleótido, en particular un ARNm, ARNs o ARNs y combinaciones de los mismos, que preferiblemente dirige y modula la expresión de TSC22D4, y por lo tanto también puede alterar la actividad correspondiente del producto génico. Para mayor claridad, el "direccionamiento" incluye la unión directa o indirecta a un producto génico, o sitio funcional, de tal producto (por ejemplo, la unión al anticuerpo y la neutralización de TSC22D4, que de este modo modula su actividad).

En un aspecto, el agente bioactivo utiliza "ARN de interferencia (ARNi)". ARNi es un proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia iniciado por ARN de cadena doble (ARNds) o ARNs. El ARNi se observa en varios organismos tales como Drosophila, nematodos, hongos y plantas, y se cree que está involucrado en la defensa antiviral, modulación de la actividad del transposón y regulación de la expresión génica. Durante la ARNi, el ARNds o ARNs induce la degradación del ARNm blanco con la consiguiente inhibición específica de la secuencia de la expresión génica. Como se usa en la presente, un "ARN de interferencia pequeño" (ARNs) es un dúplex de ARN de nucleótidos que se dirige al gen de TSC22D4. Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. ARNs "se dirige" a un gen porque la secuencia de nucleótidos de la porción dúplex del ARNs es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen dirigido. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex de los ARNs es menor de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex es de 19-25 nucleótidos de longitud. La porción de dúplex de ARN del ARNs puede ser parte de una estructura de horquilla. Además de la porción dúplex, la estructura de horquilla puede contener una porción de bucle ubicada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas realizaciones, el bucle es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura de la horquilla también puede contener porciones de las proyecciones 3' y/o 5'. En algunas formas de realización, la proyección es una proyección de 3' y/o 5', 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. El ARNs se puede codificar mediante una secuencia de ácidos nucleicos, y la secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir un

promotor. La secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación mínima sintética.

En una realización adicional del procedimiento como se describe anteriormente, la evaluación de la actividad del TSC22D4 comprende un ensayo de la actividad enzimática, inmunoensayo o transferencia Western, con preferencia al menos un procedimiento para el análisis funcional del factor de transcripción, tal como, por ejemplo, ensayos de indicador. En una realización, la evaluación de la expresión de TSC22D4 comprende transferencia Northern, análisis de micromatrices, hibridación de ARN, análisis de metilación y/o RT-PCR. La evaluación de la actividad de una enzima o la evaluación de la expresión de un gen comprende todos los procedimientos para evaluar la actividad de una enzima (aquí factor de transcripción) conocidos por los expertos.

Por consiguiente, como alternativa, la actividad enzimática o expresión de TSC22D4 se puede evaluar indirectamente mediante la evaluación de la actividad enzimática o de expresión de enzimas que están reguladas por TSC22D4. Tales pruebas en consecuencia pueden implicar el análisis de marcadores en una muestra biológica tomada del sujeto para analizar, tal como, por ejemplo, concentración de insulina, concentración de péptido c, concentración de interleuquina-6, concentración de leptina, concentración de resistina, concentración de TNF alfa, concentración de glucagon y/o concentración de PYY, preferiblemente en presencia o ausencia de dicho modulador. Los respectivos ensayos son conocidos por los expertos. Otros procedimientos de acuerdo con la invención son los ensayos de micromatrices, así como cualquier procedimiento adecuado para la detección de la expresión génica, o actividad enzimática, conocido por el experto.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona entonces con un inhibidor de la expresión de TSC22D4 que es específico para TSC22D4, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo de un ARNmi, ARNsi y ARNsh y sus combinaciones para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades, en el que dicha enfermedad se selecciona de resistencia a insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.

El objeto se resuelve adicionalmente mediante un procedimiento para detectar la resistencia a la insulina relacionada con la diabetes y, opcionalmente, diagnosticar la presencia o el riesgo de resistencia a la insulina relacionada con la diabetes, que comprende la etapa de medir la expresión y/o la actividad biológica de TSC22D4 en una muestra biológica obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene dicha enfermedad; en el que una disminución de la actividad o expresión medida de TSC22D4 en dicha muestra en comparación con la actividad o expresión medida de TSC22D4 en una muestra de un sujeto sano indica la presencia o el riesgo de resistencia a la insulina relacionada con la diabetes, tal como, por ejemplo, síndrome metabólico de resistencia a la insulina diabetes tipo 2 y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral. Preferiblemente, dicha detección comprende detectar la unión de un inhibidor de acuerdo con la presente invención. Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicha muestra es una muestra biológica, preferiblemente seleccionada de una muestra de sangre, plasma, orina, celular y tejido, tal como, por ejemplo, una biopsia que comprende tejido de hígado, mama, próstata, hueso, cartílago, pulmón o cerebro. Una "muestra biológica" es un espécimen de cualquier fuente biológica. La fuente biológica puede ser cualquier organismo natural o genéticamente modificado. La muestra biológica puede derivar de, sin limitación, tejidos, cultivos celulares, extractos crudos, fluidos corporales, así como de soluciones de productos de expresión génica, ácidos nucleotídicos, proteínas o péptidos, o ácidos nucleotídicos, proteínas o péptidos como materia sólida.

Se divulga un procedimiento para tratar y/o prevenir una enfermedad seleccionada de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes en un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de un modulador como se describe. o una composición farmacéutica como se describe a dicho paciente que lo necesita. Preferiblemente, dicho modulador se selecciona del grupo de una molécula de biblioteca de péptidos, un aptámero, una molécula de biblioteca combinatoria, una molécula derivada de extracto celular, un fármaco molecular pequeño, un metabolito bacteriano, una molécula de despliegue en fagos, un anticuerpo o fragmento del mismo, una proteína, un fragmento de proteína, un polinucleótido, un oligonucleótido, en particular un ARNmi, ARNsi o ARNsh y sus combinaciones. En una realización, el inhibidor de TSC22D4 se selecciona de oleoligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, 2'-O-metil oligorribonucleótidos antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, ARN de interferencia pequeño, ARNsi, ARNmi, oligonucleótidos antisentido que contiene bases de ácido nucleico bloqueado LNA®, oligos de morfolino antisentido, agonistas de PPAR-gamma, antagomir y mezclas de los mismos, y en particular un antagomir de TSC22D4.

Se divulga un kit de diagnóstico o terapéutico, que comprende materiales para realizar un procedimiento de acuerdo con la presente invención, tales como enzimas y tampones adecuados para el diagnóstico, opcionalmente junto con instrucciones para el uso de dicho kit. Un kit para detectar el polipéptido TSC22D4 contiene preferiblemente un anticuerpo y/o ARNmi que se une específicamente al polipéptido TSC22D4. Un kit para detectar ARNm de TSC22D4 contiene preferiblemente uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, uno o más cebadores o sondas de oligonucleótidos, sondas de ADN, sondas de ARN o moldes para generar sondas de ARN) que hibridan específicamente con el ARNm de TSC22D4.

Esencialmente, lo mismo es válido para los kits terapéuticos, que contienen preferiblemente moduladores farmacéuticamente aceptables para el polipéptido TSC22D4 y/o ARNm.

Un "modulador" de la función y/o expresión de TSC22D4 es una sustancia que regula o cambia la función y/o la expresión de TSC22D4. Dicho modulador puede influir directa o indirectamente en la función y/o expresión de TSC22D4. La función y/o expresión de TSC22D4 se puede cambiar o regular, por ejemplo, y sin limitación, mediante la unión a un dominio de la proteína TSC22D4, o el aumento o la supresión de la expresión génica de TSC22D4. Un modulador como se describe también puede regular o cambiar indirectamente la función y/o expresión de TSC22D4 mediante la regulación o el cambio de la función y/o expresión de un gen que regula, o está regulado, por TSC22D4.

Los "productos de expresión génica" de acuerdo con la invención comprenden, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos purificadas, recombinantes, naturales, artificiales o sintéticas, como ADN, ADNc, ARN o ARNm; o proteínas, o péptidos. Los "productos de expresión génica" de acuerdo con la invención comprenden, pero no se limitan a, productos de expresión génica purificados, recombinantes, naturales, artificiales o sintéticos, o modificaciones de los mismos. Una secuencia de ácidos nucleicos como se describe es cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 conocida en la técnica anterior, o secuencias complementarias, o secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas, así como sus modificaciones.

Un "inhibidor" es una sustancia que puede reducir la efectividad de un catalizador en una reacción catalizada (ya sea un catalizador no biológico o una enzima). Un inhibidor al que se hace referencia en la presente puede reducir la efectividad de la actividad de una enzima; asimismo, un inhibidor al que se hace referencia en la presente puede reducir la efectividad de la expresión de una enzima. Un inhibidor puede ser, sin limitación, secuencias de nucleótidos recombinantes, naturales, artificiales o sintéticas, como ADN, ADNc, ARN, ARNm o ARNm; o proteínas (tales como, por ejemplo, anticuerpos), o péptidos, o modificaciones de los mismos. Un inhibidor puede ser, sin limitación, cualquier secuencia de ácido nucleico, o secuencias complementarias, o secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos que codifica TSC22D4 conocida en la técnica anterior, así como a modificaciones del mismo.

Una "célula" de acuerdo con la invención puede ser una célula procariota o eucariota. Una "célula" de acuerdo con la invención es preferiblemente, y sin limitación, seleccionada de células hepáticas. Las células de mamífero se pueden seleccionar preferiblemente de un ser humano, conejo, ratón o rata. Preferiblemente, la célula es una célula humana. El término "célula" también incluye células de un modelo animal. Además, una célula puede ser parte de un cultivo de tejidos.

El término "prevención" en el contexto de la presente invención se debe entender como una intervención médica que pretende evitar la aparición de un evento negativo que más probablemente conduzca al empeoramiento de la condición de un paciente que tiene una enfermedad, o a la lesión o la muerte de un sujeto sano y/o enfermo.

Un "sujeto que lo necesita" puede ser, sin limitación, cualquier animal o sufrimiento humano de dolor, especialmente dolor neuropático. Preferiblemente, el sujeto que lo necesita es un ser humano.

La inactivación específica de hepatocitos de TSC22D4 mejoró la señalización de la insulina en el hígado y el músculo esquelético, mientras que la sobreexpresión de TSC22D4 hepática redujo las respuestas del tejido insulínico. En consecuencia, la inhibición de la TSC22D4 hepática previno y revirtió la hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en varios modelos de ratones con diabetes, respectivamente. Se descubrió que TSC22D4 ejerce sus efectos sobre la homeostasis sistémica de la glucosa, en parte, a través de la regulación transcripcional de la pequeña proteína secretora lipocalina (LCN) 13, como se demuestra mediante el reclutamiento de cromatina y los experimentos de rescate genético in vivo. Como se encontró que los niveles hepáticos de TSC22D4 estaban elevados en pacientes diabéticos humanos, en correlación con la disminución de la sensibilidad a la insulina y la hiperglucemia, la presente invención establece la inhibición de la TSC22D4 como una opción atractiva de sensibilización a la insulina en la terapia de la diabetes tipo 1 o 2, así como en la terapia de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.

Las siguientes figuras, secuencias y ejemplos simplemente sirven para ilustrar la invención y no se debe interpretar que restringen el alcance de la invención a las realizaciones particulares de la invención descritas en los ejemplos.

La Figura 1 muestra que la inactivación de TSC22D4 en los hepatocitos primarios de ratón mejora la señalización de la insulina. Transferencia Western de hepatocitos primarios (1°) de ratón tratados con el control o adenovirus ARNsh TSC2 usando anticuerpos de Akt total y Fosfo-Akt (Ser473) (señalización celular). Los hepatocitos primarios de ratón se incubaron con PBS o insulina durante 10 minutos. La inactivación de TSC22D4 mediada por ARNsh dio como resultado un aumento de la fosforilación de Akt.

La Figura 2 muestra que la inactivación de TSC22D4 hepática mejora la señalización de la insulina en ratones de tipo salvaje. Transferencia Western de extractos de hígado de ratones C57B1/6 hembras inyectados con control o adenovirus de ARNsh TSC22D47 días después de la inyección utilizando anticuerpos totales de Akt y Fosfo-Akt (Ser473) (señalización celular). 20 minutos antes de la recolección del órgano, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con PBS o insulina. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes de la inyección. La inactivación de TSC22D4 mediada por ARNsh dio como resultado un aumento de la fosforilación de la ATP después de la estimulación con insulina.

La Figura 3 muestra que la pérdida de TSC22D4 hepático controla distintos componentes de la vía de señalización de la insulina en ratones de tipo salvaje. Análisis cuantitativo de PCR de A) factor de transcripción del factor de crecimiento transformante beta 1-clon 22D4 estimulado (TSC22D4), B) Lipocalina 13 (Lcn13), C) supresor de la proteína unida al receptor del factor de crecimiento 14 (Grb14), D) supresor de la señalización de citoquina 3 (SOCS3), E) adenilato ciclasa 1 (ADCY1) en hígados de ratones C57B1/6 hembras tipo salvaje inyectados con control o adenovirus de ARNsh TSC22D4 control e estado en ayunas y realimentado como en la Fig. 4 (medias \pm SEM, n = 7). Prueba estadística **A-E**: prueba t de Student.

La Figura 4 muestra que la inactivación específica de hepatocitos de TSC22D4 mejora la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y disminuye los niveles de insulina en animales de tipo salvaje. A los ratones C57B 16 alimentados con dieta baja en grasa se les inyectó un control o un virus adenoasociado de ARNmi TSC22D4 para la inactivación a largo plazo y específica de hepatocitos de TSC 22D4. A) Ocho semanas después de la inyección del virus, los ratones se mantuvieron en ayunas durante cuatro horas antes de realizar una prueba de tolerancia a la glucosa mediante la inyección intraperitoneal de 1 g de glucosa por kg de peso corporal. B) 9 semanas después de la inyección del virus, los ratones se mantuvieron en ayunas durante cuatro horas antes de realizar una prueba de tolerancia a la insulina mediante la inyección intraperitoneal de 1 U de insulina por kg de peso corporal. La inactivación del TSC22D4 dio como resultado una pronunciada caída de los niveles de azúcar en la sangre después de inyección de insulina i.p. en comparación con los animales de control (p <0,001 ANOVA RM DE DOS VÍAS; Holm-Sidak post hoc) que indica una mejor sensibilidad a la insulina. Prueba estadística **A-B, D**: RM ANOVA DE DOS VÍAS; Holm-Sidak post hoc. Prueba estadística **C**: prueba t de Student.

La Figura 5 muestra que la sensibilidad a la insulina ha mejorado en la inactivación de TSC22D4 a largo plazo en condiciones dietarias bajas y altas en grasas. Índice de resistencia a la insulina (HOMA) en los mismos animales que en la Fig. 6 y en una cohorte correspondiente alimentada con dieta alta en grasas. (Medias \pm SEM, n = 7).

La Figura 6 muestra que la inactivación hepática de TSC22D4 mejora la sensibilidad a la insulina y se normaliza en ratones genéticamente diabéticos. A ratones db/db de 11 semanas de edad (un modelo genético de ratón para la obesidad) se les inyectó control o adenovirus ARNsh TSC22D4. A) 7 días después de la inyección del virus, los ratones se mantuvieron en ayunas durante cuatro horas antes de realizar una prueba de tolerancia a la insulina mediante la inyección intraperitoneal de insulina 2U por kg de peso corporal. La inactivación del TSC22D4 dio como resultado una caída pronunciada de los niveles de azúcar en la sangre después de la inyección i.p. de insulina en comparación con animales control (p = 0,004 ANOVA RM DE DOS VÍAS; Holm-Sidak post hoc) lo que indica una mejor sensibilidad a la insulina. B) 13 días después de la inyección del virus, los ratones se mantuvieron en ayunas durante cuatro horas antes de realizar una prueba de tolerancia a la glucosa mediante la inyección intraperitoneal de 1 g de glucosa por kg de peso corporal. La inactivación del TSC22D4 dio como resultado una mejor respuesta metabólica a la inyección i.p. de glucosa en comparación con los animales de control (p <0,001; ANOVA RM DE DOS VÍAS; Holm-Sidak post hoc) lo que indica una sensibilidad a la insulina mejorada. C) Los ratones se sacrificaron en ayunas (durante 18 horas), se realimentaron (en ayunas durante 18 horas después de 6 horas de realimentación) o en estado de alimentación aleatoria. Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en condiciones de ayuno, realimentación o alimentación aleatoria (medias \pm SEM, n = 4). D) Ingesta diaria de agua (gramo) de ratones db/db (medias \pm SEM, n = 12). Prueba estadística A-B: ANOVA RM DE DOS VÍAS; Holm-Sidak post hoc. Prueba estadística C-D: prueba t de Student.

La Figura 7 muestra los marcadores de composición corporal en ratones db/db tras la inactivación de TSC22D4. A los ratones db/db de 11 semanas de edad (los mismos animales que en la Fig. 8) se les inyectó control o adenovirus ARNsh TSC22D4. Los ratones se sacrificaron en ayunas (durante 18 horas), se realimentaron (en ayunas durante 18 horas después de 6 horas de realimentación) o se alimentaron en forma aleatoria. A) peso corporal en gramos (medias \pm SEM, n = 4). B) peso del hígado en gramos (medias \pm SEM, n = 4). C) Niveles séricos de alanina-aminotransferasa (ALT; significa \pm SEM, n = 4). D) Niveles de glucógeno hepático (mg de glucógeno por g de tejido hepático; medias \pm SEM, n = 4). E) Niveles de triglicéridos en el hígado (mg de triglicéridos por g de tejido hepático; medias \pm SEM, n = 4). E) Niveles de glucógeno en el hígado (mg de glucógeno por g de tejido hepático; medias \pm SEM, n = 4). E) Niveles de triglicéridos en suero (mg de triglicéridos por ml de suero; medias \pm SEM, n = 4). Prueba estadística **A-E**: prueba t de Student.

La Figura 8 muestra que la deficiencia hepática de TSC22D4 mejora la expresión del marcador inflamatorio en ratones diabéticos db/db. A los ratones db/db de 11 semanas de edad (los mismos animales que en la Fig. 8) se les inyectó control o adenovirus ARNsh TSC22D4. Los ratones se sacrificaron en ayunas (durante 18 horas), se realimentaron (en ayunas durante 18 horas después de 6 horas de realimentación) o se alimentaron en forma aleatoria. A) Niveles de insulina en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). B) Niveles de péptido C en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). C) Niveles de interleucina-6 en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). D) Niveles de leptina en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). E) Niveles de resistina en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). F) Niveles de TNF alfa en suero en pg/ml (medias \pm SEM, n = 4). Prueba estadística **A-H**: prueba t de Student.

La Figura 9 muestra que la inactivación hepática de TSC22D4 en animales diabéticos regula por aumento los genes sensibilizadores a la insulina. Análisis cuantitativo por PCR de A) factor de transcripción del factor de crecimiento transformante beta 1, clon 22D4 estimulado (TSC22D4), B) Lipocalina 13 (Lcn13), C) supresor de la proteína 14 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb14), D) supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), E) adenilato ciclasa 1 (ADCY1) en hígados de ratones diabéticos db/db inyectados con control o adenovirus ARNsh TSD22D4 (los mismos animales que en la Fig. 8) en el estado aleatorio, en ayunas (18 h) y realimentado (ayuno durante 18 h y realimentación durante las siguientes 6 h) (medias \pm SEM, n = 7). Prueba estadística **A-D**: prueba t de Student.

La Figura 10 muestra que la pérdida de TSC22D4 mejora la señalización de la insulina en los hígados diabéticos. Transferencia Western de extractos de hígado de ratones db/db de 11 semanas de edad (mismos animales que en la Fig. 8) inyectados con control o adenovirus ARNsh TSC22D4. 7 días después de la inyección, los lisados de hígado se transfirieron frente a los anticuerpos Akt total y Fosfo-Akt (Ser473) (señalización celular). Los ratones se sacrificaron en un estado de ayuno (durante 18 horas) o se realimentaron (en ayunas durante 18 horas después de 6 horas de realimentación). La inactivación de TSC22D4 mediada por ARNsh dio como resultado un aumento de la fosforilación de Akt en condiciones de ayuno y realimentación.

La Figura 11 muestra que la inactivación específica de hepatocitos de TSC22D4 previene la hiperglucemia en ratones propensos a la diabetes. A los ratones db/db se les inyectó un ARNmi TSC22D4 que expresa AAV a la edad de 5 a 35 semanas (que representa la semana 0 en el gráfico) antes del inicio de la hiperglucemia manifiesta. La glucosa (mg/dl) se midió en la inyección del virus y en las 2 y 4 semanas posteriores a la inyección del virus. Antes de la medición de la glucosa, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas. (Medias \pm SEM, n = 7).

La Figura 12 muestra que TSC22D4 actúa a través de los sistemas endocrinos LCN 13 y se correlaciona con la sensibilidad a la insulina en seres humanos, (a) Inmunoprecipitación de cromatina de regiones promotoras de LCN 13 (1-3) por anticuerpos contra TSC22D4 en hígados de ratones de tipo salvaje. El nivel de enriquecimiento en relación con el control negativo IgG se determinó por qPCR. La región 4 representa un control de PCR negativo (n = 2-3). Se obtuvieron resultados similares utilizando un anticuerpo TSC22D4 diferente, (b) Análisis cuantitativo mediante PCR de LCN13 en hígados de ratones C57B1/6 de tipo salvaje inyectados con control o adenovirus ARNsh TSC22D4 (izquierda), db/db (centro) y NZO (derecha) (medias \pm SEM, n \geq 6 para cada experimento). (c) Los sueros de ratones C57B1/6 inyectados con control o adenovirus ARNsh(NC ARNsh) o TSC22D4 (D4 ARNsh) 7 días después de la inyección se inmunoprecipitaron con anticuerpo LCN 13 e inmunotransfirieron con anticuerpo LCN 13. Se usó anticuerpo de albúmina como control de carga. (d) Transferencia Western representativos de los extractos de miocitos C2C12 tratados con control (PBS) o LCN13 (200 nM) tratados con LCN13 utilizando anticuerpos de Akt total, fosfo-Akt (Ser473) y VCP. LCN13 (3 h) y tratamiento con insulina durante 15 min (30 nM) indicados, respectivamente. Se muestra el análisis densimétrico. **, indica efecto de la insulina; ##, indica el efecto de LCN 13. (e) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones db/db inyectados con adenovirus ARNsh control (control ARNsh), LCN 13 (LCN 13 ARNsh), TSC22D4 (TSC22D4 ARNsh), TSC22D4 más LCN13 (TSC22D4 + LCN13 ARNsh) 1 semana después de la inyección. La glucosa se inyectó i.p. a una concentración de 1 g de glucosa por kg de peso corporal. * indica la significancia entre el grupo de NC y TSC22D4; # indica la significancia entre el grupo TSC22D4 y TSC22D4 + LCN13; \$ indica la significancia entre NC y TSC22D4 + LCN 13 grupo. (f) Índice HOMA I R en los mismos ratones que en (e). (g) Niveles de glucosa en suero en los mismos ratones que en (e). (h) Análisis de PCR cuantitativo de la expresión del ARNm de TSC22D4 en hígados de pacientes con diabetes tipo 2 (T2D, n = 26) o tolerancia a la glucosa normal (NGT, n = 40). (i) Correlación de la expresión hepática del ARNm de TSC22D4 y la glucosa plasmática en ayunas en los mismos pacientes que en (h). (j) Correlación de la expresión en el hígado humano del ARNm de TSC22D4 y la tasa de infusión de glucosa (GIR) durante el estudio de pinzamiento hiperinsulémico-euglucémico en los mismos pacientes que en (h). Análisis estadístico para a, c-f: prueba t de student, g-i: coeficiente de correlación de Pearson, *: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01; ***: p \leq 0,001.

La Figura 13 muestra (a) la correlación de la expresión hepática humana de los niveles de ARNm de LCN 13 (Obp2a) y TSC22D4 en pacientes con diabetes tipo 2 (n = 26) o tolerancia a la glucosa normal (n = 40). (b) Análisis de PCR cuantitativo de expresión de ARNm LCN 13 (Obp2a) en hígados de pacientes con diabetes tipo 2 (T2D, n = 26) o tolerancia a la glucosa normal (NGT, n = 40). (c) Correlación de la expresión hepática humana del ARNm LCN13 (Obp2a) y la tasa de infusión de glucosa (GIR) durante el estudio con pinzamiento hiperinsulémico-euglucémico en los mismos pacientes que en (a). (d) Correlación de la expresión hepática del ARNm de LCN13 (Obp2a) y la glucosa plasmática de ayunas en los mismos pacientes que en (a). Análisis estadístico para a, c, d: coeficiente de correlación de Pearson, b: prueba t de Student, *: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01; ***: p \leq 0,001.

La secuencia ID NOs. 1 a 4 muestran oligonucleótidos como se usan en los experimentos de la presente invención.

Ejemplos

Virus recombinantes

Los adenovirus que expresan un TSC22D4 o un ARNsh no específico bajo el control del promotor U6, o el cDNA de TSC22D4 bajo el control del promotor CMV se clonaron usando el sistema de expresión de ARNi adenoviral BLOCK-iT (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Los virus se purificaron mediante el procedimiento del cloruro de cesio y se dializaron frente a tampón salino tamponado con fosfato que contiene 10% de glicerol antes de la inyección en animales, como se describió anteriormente ((Herzig S, Hedrick S, Morantte I, Koo SH, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPARgamma. *Nature*. 2003; 426: 190-193. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC1. *Nature*. 2001; 413: 179-183). Los AAV que codificaban los ARNm control o específicos de TSC22D4 bajo el control de un promotor específico de hepatocitos se establecieron como se describió previamente Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II expression and signaling in skeletal muscle of humans. *J Physiol*. 2007; 583: 785-795)

Experimentos en animales

Se obtuvieron ratones C57B1/6 de 8 a 12 semanas de edad y db/db de 10semanas de Charles River Laboratories (Bruselas, Bélgica) y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h con una dieta regular sin restricciones. Antes de las pruebas de tolerancia a la insulina y la glucosa, los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 h. De lo contrario, los animales se alimentaron ad libitum y tenían acceso libre al agua. Para las inyecciones de adenovirus, se administraron 1-2 x 10⁹ unidades formadoras de placa (pfu) por cada virus recombinante a través de una inyección en la vena de la cola. Para los experimentos con AAV, se inyectaron 5 x 10¹¹ virus a través de la vena de la cola. En cada experimento, 6-12 animales recibieron tratamientos idénticos y se analizaron en condiciones de ayuno (18 horas en ayunas), alimentación aleatoria o alimentación (18 horas en ayunas seguidas de 6 horas de realimentación) como se indica. Los órganos, que incluyen hígado, las almohadillas de grasa epididímic y abdominales, y los músculos gastrocnemios se recolectaron después de períodos de tiempo específicos, se pesaron, se congelaron instantáneamente y se utilizaron para un análisis adicional. El contenido total de grasa corporal se determinó mediante un analizador de composición corporal Echo MRI (Echo Medical Systems, Houston, USA). El manejo y la experimentación de los animales se realizó de acuerdo con los lineamientos de NIH y fue aprobado por las autoridades locales.

Para las pruebas de tolerancia a la insulina, se preparó una solución madre de 1 U de insulina/ml usando cloruro de sodio 0,9%. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes del experimento. Se determinó el peso corporal de todos los animales y se midieron los niveles de glucosa en sangre mediante el corte de la cola con una hoja de cuchilla. La gota de sangre se colocó en una tira de glucómetro y se midió. Se inyectó 1 U de insulina/kg de peso corporal a ratones C57B1/6 y 1,5 U de insulina/kg de peso corporal a ratones db/db por vía intraperitoneal. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron después de 20, 40, 60, 80 y 120 min.

Para las pruebas de tolerancia a la glucosa, se preparó una solución madre de glucosa 20% utilizando cloruro de sodio 0,9%. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes del experimento. Se determinó el peso corporal de todos los animales y se midieron los niveles de glucosa en sangre mediante el corte de la cola con una cuchilla. La gota de sangre se colocó en una tira de glucómetro y se midió. Se inyectaron 5 µl por gramo de solución de glucosa 20% a ratones C57B1/6 y db/db por vía intraperitoneal. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron después de 20, 40, 60, 80 y 120 min.

Sujetos humanos

Los inventores investigaron la expresión del ARNm de TSC22D4 en muestras de tejido hepático obtenidas de 66 hombres y mujeres obesos y delgados de raza caucásica caracterizados exhaustivamente que se sometieron a cirugía abdominal abierta para derivación en Y de Roux, gastrectomía en manga, colecistectomía electiva o laparotomía exploratoria. Con las pruebas de tolerancia oral a la glucosa, los inventores identificaron individuos con diabetes tipo 2 (n = 26) o tolerancia a la glucosa normal (n = 40). La sensibilidad a la insulina se evaluó usando el procedimiento de pinzamiento hiperinsulinémico euglicémico como se describe. Todas las muestras de sangre iniciales se recolectaron entre las 8 y las 10 am después de un ayuno nocturno. Todos los protocolos de estudio han sido aprobados por el comité de Ética de la Universidad de Leipzig (363-10-13122010 y 017-12-230112). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar en el estudio.

Metabolitos sanguíneos

Los niveles séricos de glucosa y triglicéridos (TG) se determinaron utilizando un monitor de glucosa automático (One Touch, Lifescan, Neckargemünd, Alemania) o kits comerciales (Sigma, Munich, Alemania; RANDOX, Crumlin, Irlanda del Norte; WAKO, Neuss, Alemania, respectivamente). Los niveles de insulina se determinaron usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de ratón (Mercodia, Uppsala, Suecia).

Extracción de lípidos tisulares

Los lípidos hepáticos se extrajeron como se describió previamente (Herzig S, Hedrick S, Morantte I, Koo SH, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. *Nature*.

2003; 426: 190-193).

Histoquímica

El tejido del hígado se incrustó en el compuesto de temperatura de corte óptico Tekue Tek (Sakura, Torrance, USA). Las criosecciones de cinco micrómetros se tiñeron con hematoxilina y eosina u Oil Red O como se describe (Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammmer RE, Mangelsdorf DJ (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell 93: 693- 704).

RT-PCR cuantitativa Taqman

El ARN total se extrajo de hígado de ratón homogenizado o lisados celulares utilizando reactivo de Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADNc se preparó mediante transcripción inversa usando la enzima M-MuLV y el cebador Oligo dT (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Los ADNc se amplificaron usando kits de ensayo bajo demanda y un detector de secuencia ABIPRISM 7700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Los datos de expresión de ARN se normalizaron a los niveles de ARN de la proteína de unión a caja TATA (TBP).

La expresión del ARNm de TSC22D4 humano se midió mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real en un ciclador de temperatura fluorescente usando el ensayo TaqMan, y la fluorescencia se detectó en un detector de secuencia ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). El ARN total se aisló usando TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY), y 1 µg de ARN se transcribió de forma inversa con reactivos estándar (Life Technologies, Grand Island, NY). De cada RT-PCR, se amplificaron 2 µl en una reacción de PCR de 26 µl usando el kit de reactivos Core QPCR Brilliant SYBR verde de Stratagene (La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron en el detector de secuencia ABI PRISM 7000 para una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos de PCR, cada ciclo consistió en 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min. La expresión de ARNm de TSC22D4 y Obp2a (LCN13) humana (determinada por Hs00229526_m1 y Hs01062934_g1, respectivamente) (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) se calculó con relación a la expresión de ARN de hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1), determinada por un ensayo premezclado a demanda para HPRT1 (Hs01003267_m1) (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). La amplificación de las transcripciones específicas se confirmó mediante perfiles de curva de fusión (enfriamiento de la muestra a 68 °C y calentamiento lento a 95 °C con la medición de la fluorescencia) al final de cada PCR. La especificidad de la PCR también se verificó al someter los productos de amplificación a electroforesis en gel de agarosa.

Análisis de proteína

Se extrajo proteína de muestras de órganos congelados o hepatocitos cultivados en un tampón de lisis celular (Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II expression and signaling in skeletal muscle of humans. J Physiol. 2007; 583:50 785-795) y 20 µg de proteína se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida 4-12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los ensayos de transferencia Western se realizaron como se describe (Herzig et al, 2001) usando anticuerpos específicos para TSC22D4 (Abcam, Cambridge, UK o Sigma, Munich, Alemania), AKT, p-AKT, GSK, p-GSK (Cell signaling, Danvers, USA) o VCP (Abcam).

Plásmidos e interferencia de ARN

Para los experimentos de ARNsh, los oligonucleótidos que se dirigen al TSC22D4 de ratón (GCCTGGTTGGCATT-GACAACACGAATG; SEQ ID No. 1), se aparearon y clonaron en el vector ARNsh pENTR/U6 (Invitrogen). Se utilizaron oligonucleótidos no específicos (5'-GATCTGATC-GACACTGTAATG-3' SEQ ID No. 2) sin homología significativa con ninguna secuencia de genes de mamíferos como controles de no silenciamiento en todos los experimentos. Para los experimentos con ARNmi, se identificaron oligonucleótidos dirigidos a TSC22D4 de ratón (5'-GACAGCGATGACGATAGTGGT-3' SEQ ID No. 3) y oligonucleótidos no específicos (5'-AAATG-TACTGCGCGGGGAGAC-3' SEQ ID No. 4) en el vector pAAV-V.

Cultivo celular y ensayos de transfección transitorio

Los hepatocitos primarios de ratón se aislaron y se cultivaron como se describe (Klingmuller U, Bauer A, Bohl S, Nickel PJ, Breitkopf K, Dooley S, Zellmer S, Kern C, Merfort S, Sparna T, et al. Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways. IEE Proc Syst Biol. 2006; 153: 433-447). Brevemente, se anestesiaron ratones C57B1/6 machos de 8-12 semanas de edad por inyección i.p. de 100 mg/kg de peso corporal de clorhidrato de ketamina y 5 mg/kg de peso corporal de corhidrato de xilazina. Después de la apertura de la cavidad abdominal, el hígado se perfundió a 37 °C con HANKS I (8 gde NaCl, 0,4 g de KCl, 3,57 g de Hepes, 0,06 g de Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,06 g de KH₂PO₄ en 1 l de H₂O destilada, EGTA 2,5 mM, Glucosa 0,1%, ajustada a pH 7,4) a través de la vena porta durante 5 minutos y posteriormente con HANKS II (8 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 3,57 g de Hepes, 0,06 g de Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,06 g KH₂PO₄ en 1 l de H₂O destilada, glucosa 0,1%, colagenasa CLSII 3 mg/ml de, CaCl₂ 5 mM, ajustado a pH 7,4) durante 5-7 minutos hasta que se observó una desintegración de la estructura hepática. La cápsula del hígado se retiró y la suspensión celular se filtró a través de una malla de 100 µm. Las células se lavaron y, posteriormente, se determinó la viabilidad de las células mediante tinción con azul de tripano. Se sembraron 1. 000. 000 células vivas/pocillo en placas de seis pocillos recubiertas con

colágeno I. Después de 24 h, las células se infectaron con adenovirus recombinantes a una multiplicidad de infecciones de 100. Para los experimentos de estimulación, los hepatocitos primarios se trataron con PBS (medio de control) o insulina a una concentración de 100 nM/6 pocillos durante 10 minutos. Las células se recogieron 48 h después de la infección.

5 Análisis del cistroma de TSC22D4 hepático

El análisis de la vía KEGG de los resultados de la secuenciación de chips se clasificó por significancia. Se encontró que la vía de señalización de la insulina estaba significativamente regulada ($p = 0,00005$). La secuenciación del chip se realizó en extractos de hígado de ratones C57B1/6 machos inyectados con adenovirus ADNc Flag-TSC22D4 7 días después de la inyección.

10 Para analizar la relevancia de los hallazgos en el escenario humano, los inventores analizaron una cohorte de 66 pacientes con tolerancia normal a la glucosa (NGT) o diabetes tipo 2 (T2D). El ARNm de TSC22D4 se elevó significativamente en los hígados de pacientes con T2D en comparación con sus homólogos de NGT (Fig. 12h). En consonancia con las funciones sensibilizadoras a la insulina y gluco-reguladoras de TSC22D4 en ratones, los niveles de ARNm hepático TSC22D4 se correlacionaron significativamente con los niveles de glucosa en ayunas (Fig. 12i) y la sensibilidad a la insulina en esta cohorte humana, esta última determinada por la tasa de infusión de glucosa (GIR) durante un pinzamiento hiperinsulinémico euglucémico (Fig. 12j). Los niveles de ARNm de TSC22D4 se correlacionan positivamente con los niveles de TG y citoquinas proinflamatorias en circulación, lo que respalda los resultados de modelos animales.

20 Es importante destacar que los estudios de expresión de LCN13 en la cohorte de pacientes revelaron una correlación altamente significativa entre los niveles de ARNm de TSC22D4 y LCN 13, y demostraron una menor expresión general de LCN 13 en pacientes diabéticos en comparación con sujetos no diabéticos. Además, los niveles de ARNm de LCN 13 hepático se correlacionaron con GIR y los niveles de glucosa en ayunas en seres humanos, resumiendo en general el enlace de sensibilización a la insulina TSC22D4-LCN 13 en modelos animales.

25 Tomados en conjunto, los datos establecen al TSC22D4 como un nodo crítico en el metabolismo sistémico de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Debido a su función reguladora corriente arriba para el sistema endocrino LCN13 y la posterior mejora multiorgánica de la sensibilidad a la insulina y el almacenamiento de glucosa, es obvio que la inhibición de TSC22D4 representa un modo alternativo atractivo en la terapia preventiva y curativa de la diabetes tipo 2 y la sensibilización a la insulina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum Ruprecht-Karls Universität Heidelberg

<120> Tratamiento de la resistencia a la insulina a través de inhibidores del factor de transcripción de TSC22D4

<130> D31143WO

<150> EP 13172362.9

<151> 2013-06-17

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> **ADN**

<213> mus musculus

<400> 1

gcctggttg cattgacaac acgaatg 27

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **oligonucleótido no específico**

<400> 2
gatctgatcg aactgtaat g 21

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 3
gacagcgatg acgatagtg t 21

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **oligonucleótido no específico**

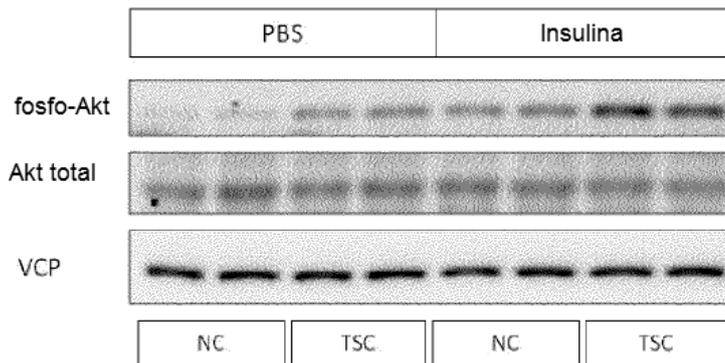
<400> 4
aaatgtactg cgcgaggaga c 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para identificar un modulador para la prevención y/o el tratamiento de la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral en un mamífero, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra biológica, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4,
- b) poner en contacto dicha muestra con al menos un modulador putativo de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, y
- 10 c) detectar un enlace entre dicho al menos un modulador putativo y dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4,
- d) identificar dicho modulador de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica TSC22D4 o el producto de expresión génica de TSC22D4, y
- 15 e) evaluar al menos uno de la actividad o expresión de TSC22D4 en presencia o ausencia de dicho modulador,
- en el que una disminución entre la actividad o expresión medida de TSC22D4 en presencia de dicho modulador en comparación con la actividad o expresión medida de TSC22D4 en ausencia de dicho modulador indica que dicho modulador es para uso en la prevención y/o tratamiento de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha actividad o expresión de TSC22D4 es actividad o expresión hepática.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende la etapa de analizar el efecto de dicho modulador en la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho modulador se selecciona de una molécula de biblioteca de péptidos, un aptámero, una molécula de biblioteca combinatoria, una molécula derivada de extracto celular, un fármaco molecular pequeño, un metabolito bacteriano, una molécula de despliegue en fagos, un anticuerpo o fragmento del mismo, una proteína, un fragmento de proteína, un polinucleótido, un oligonucleótido, en particular un ARNmi, ARNsi o ARNsh, y combinaciones de los mismos.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la evaluación de la actividad de TSC22D4 comprende un ensayo de actividad enzimática, inmunoensayo, ensayo del indicador y/o transferencia Western (Western Blot) y/o en el que la evaluación de la expresión de TSC22D4 comprende transferencia Northern (Northern Blot), análisis de micromatrices, y/o RT-PCR.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa de analizar la glucosa en sangre, los niveles de circulación de citoquinas proinflamatorias y la resistina en una muestra biológica derivada de dicho mamífero.
- 40 7. Un inhibidor de la expresión de TSC22D4 que es específico para TSC22D4, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo de un ARNmi, ARNsi y ARNsh y sus combinaciones para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades, en el que dicha enfermedad se selecciona de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y/o diabetes tipo 1 o 2, y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina, tal como, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina en el contexto de una enfermedad tumoral.
- 45 8. Un procedimiento para la detección de la resistencia a la insulina relacionada a diabetes, que comprende la etapa de medir la expresión y/o actividad biológica de TSC22D4 en una muestra biológica obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene tal enfermedad, en el que una disminución de la actividad o expresión de TSC22D4 medida en dicha muestra en comparación con la actividad o expresión de TSC22D4 medida en una muestra de un sujeto sano indica la presencia o riesgo para la resistencia a la insulina relacionada con diabetes tal como, por ejemplo, resistencia a la insulina relacionada con diabetes tipo 2.
- 50

Figura 1

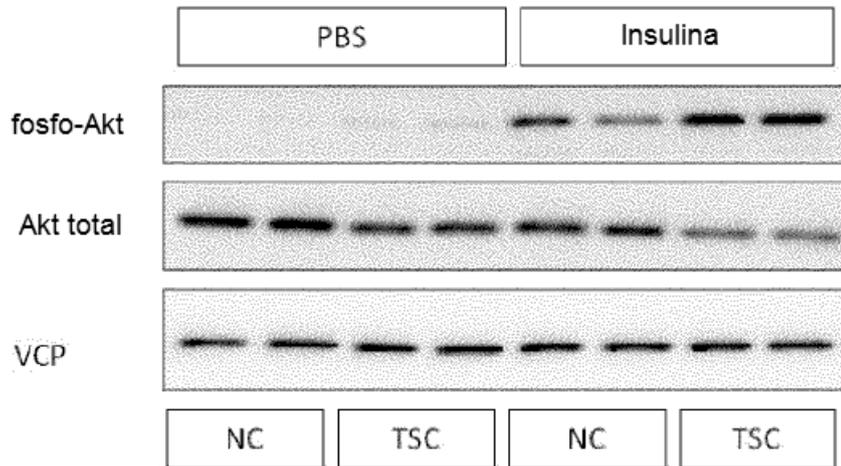
Hepatocitos de ratón primarios



NC= ARNsh control negativo

TSC= inactivación mediada por ARNsh TSC22D4

Figura 2

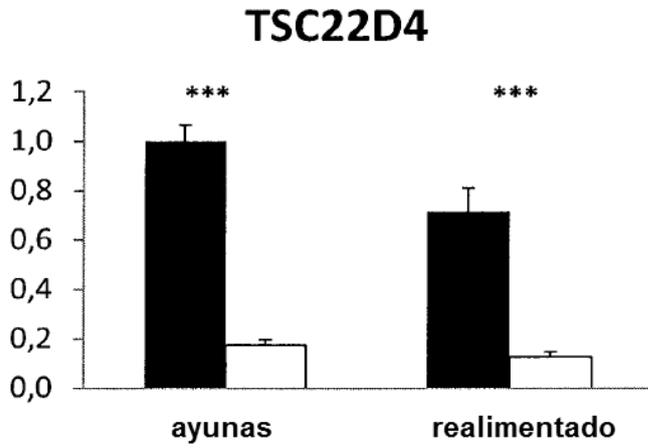


NC= ARNsh control negativo

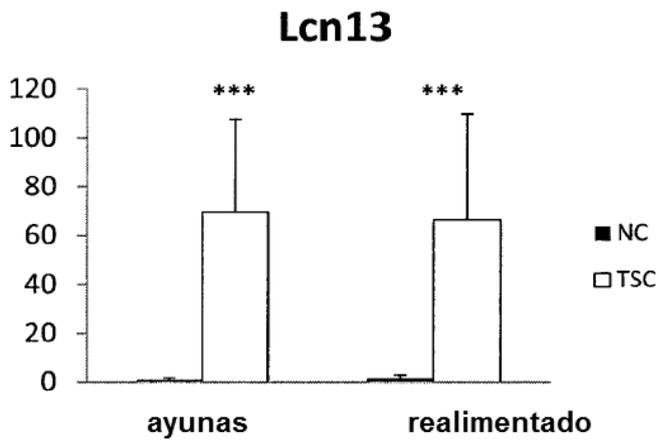
TSC= inactivación mediada por ARNsh TSC22D4

Figura 3

A)



B)



C)

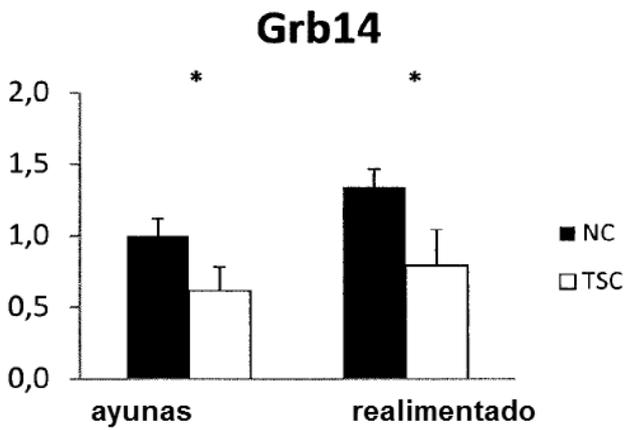
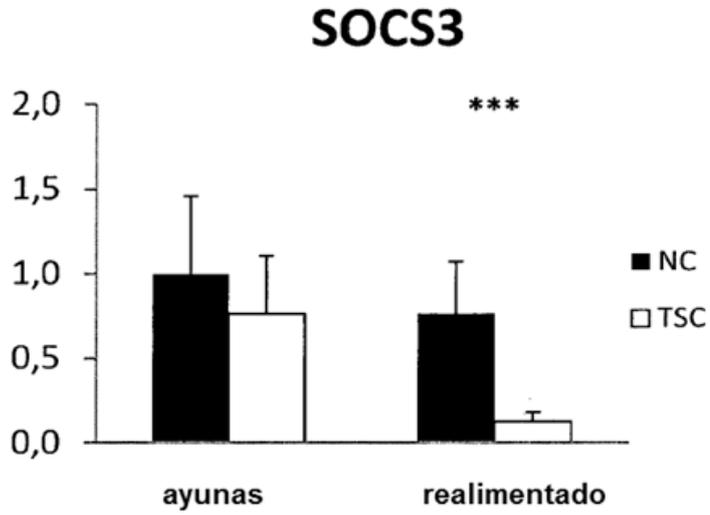


Figura 3 (continuación)

D)



E)

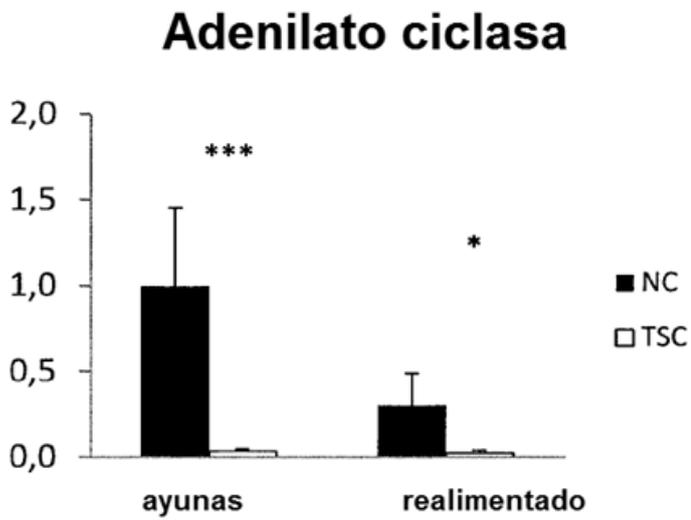
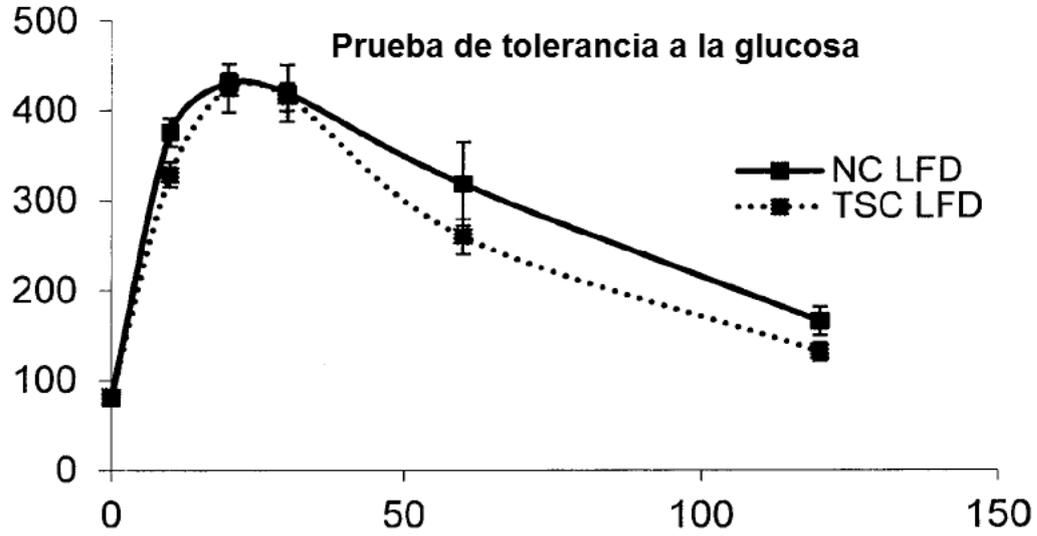


Figura 4

A)



B)

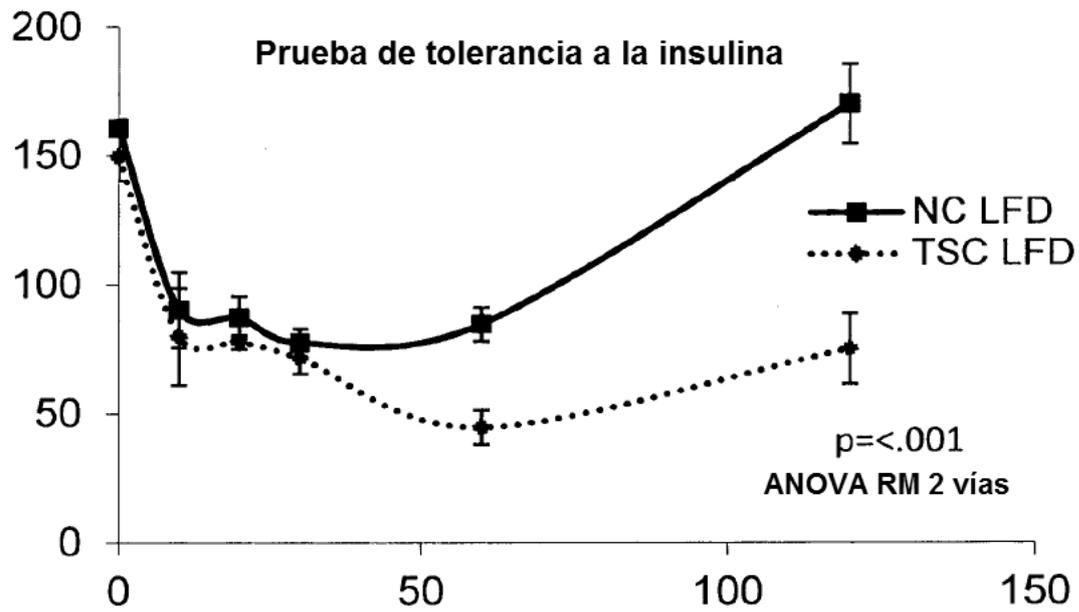
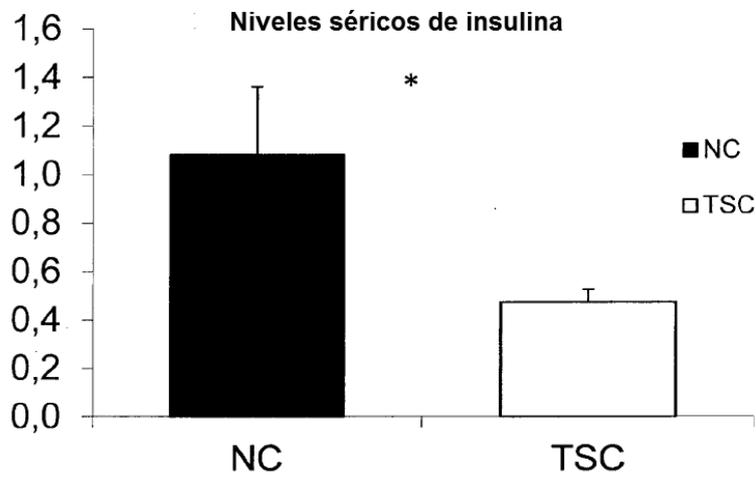


Figura 4 (continuación)

C)



D)

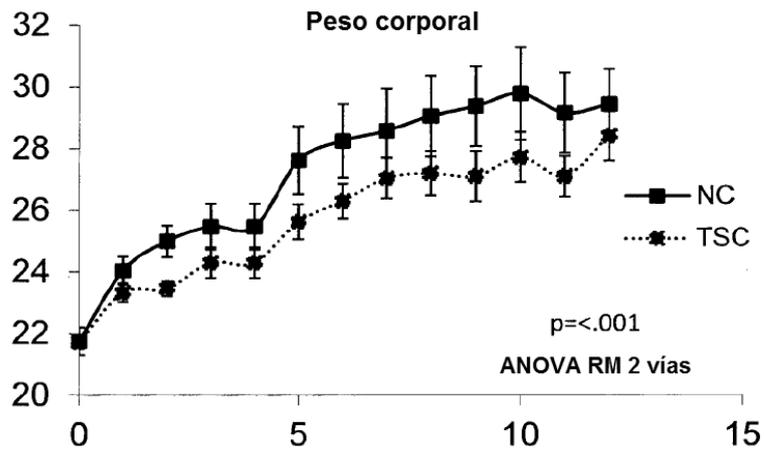


Figura 5

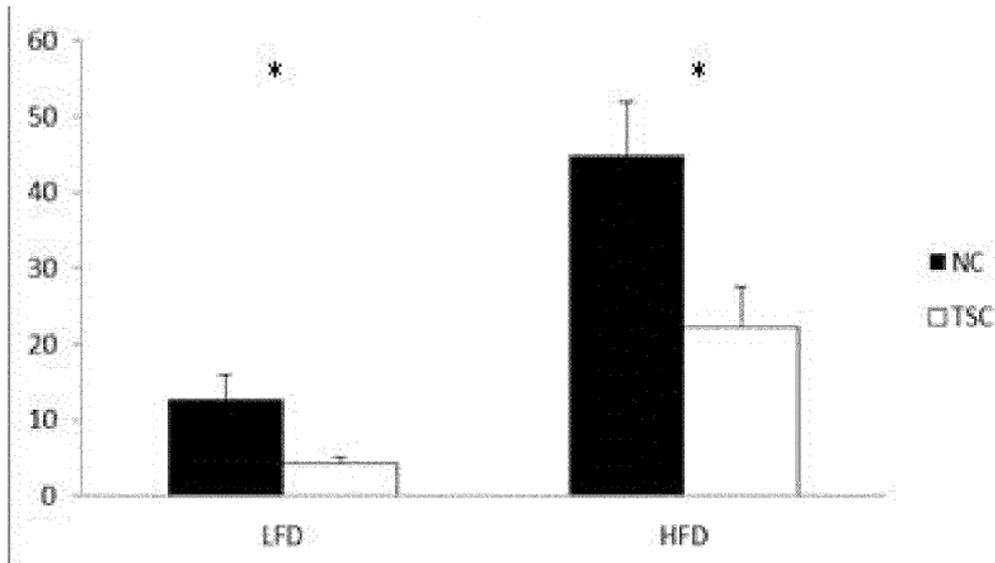
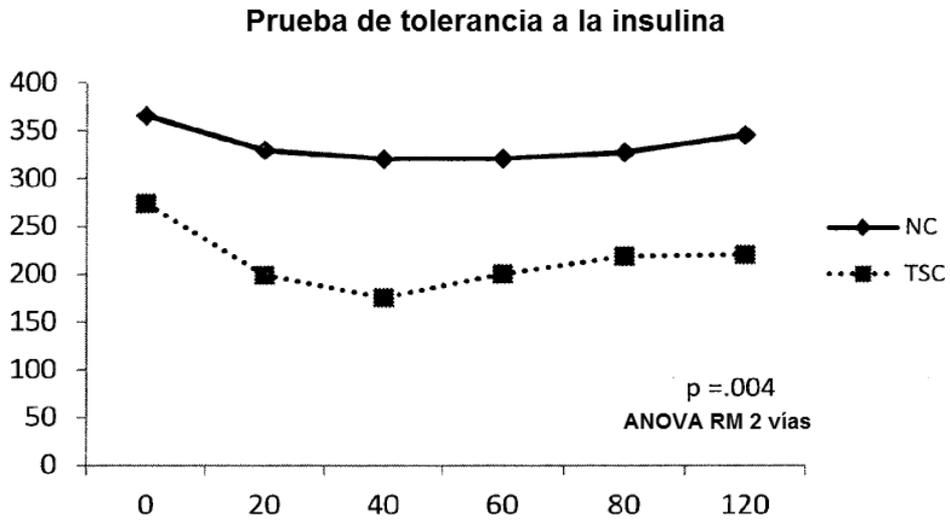


Figura 6

A)



B)

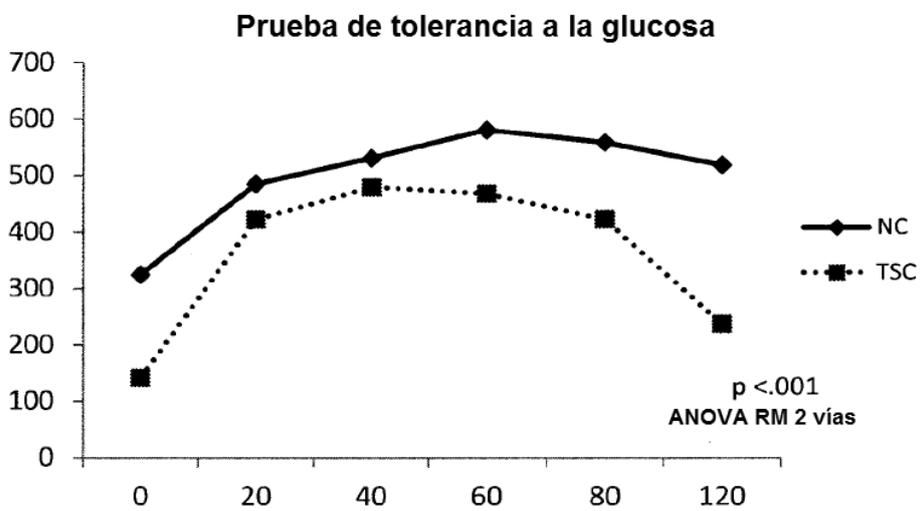
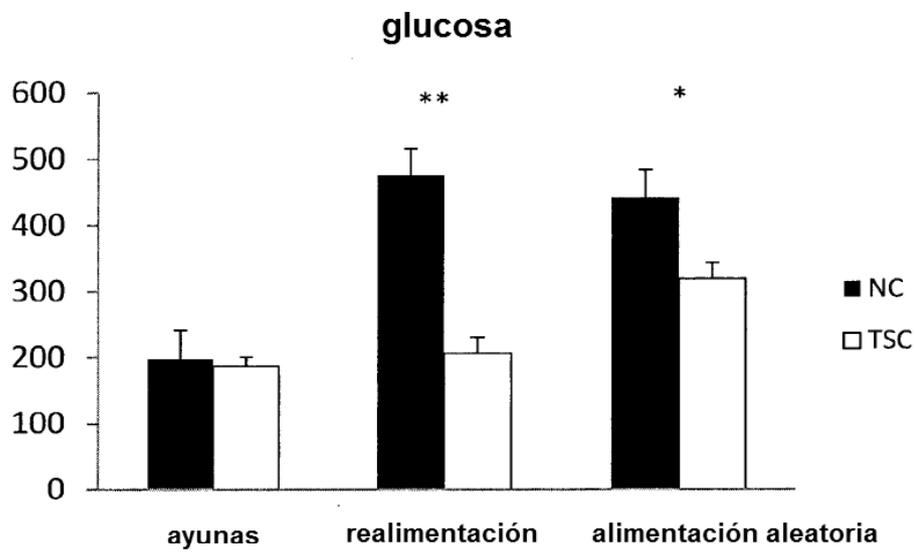


Figura 6 (continuación)

C)



D)

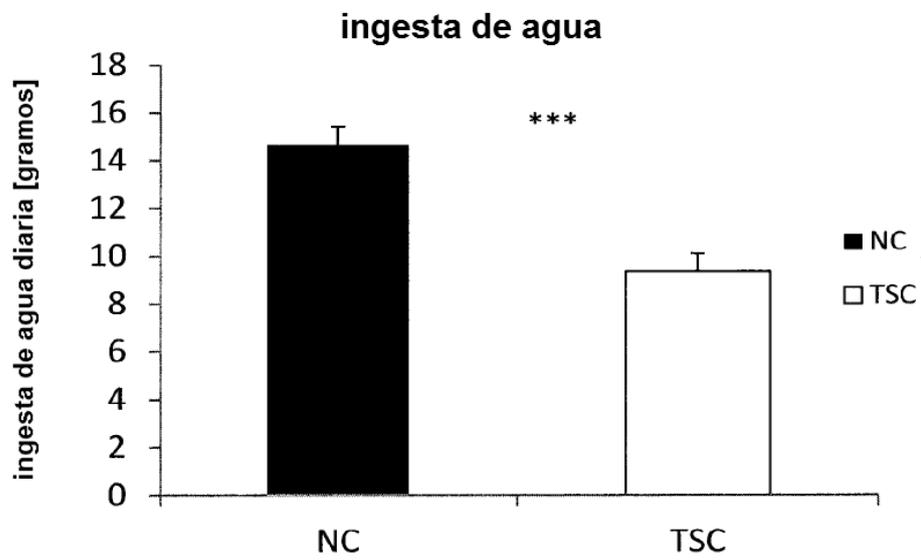
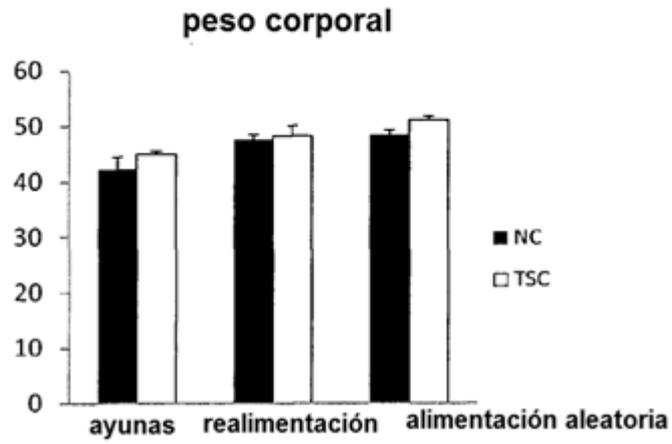
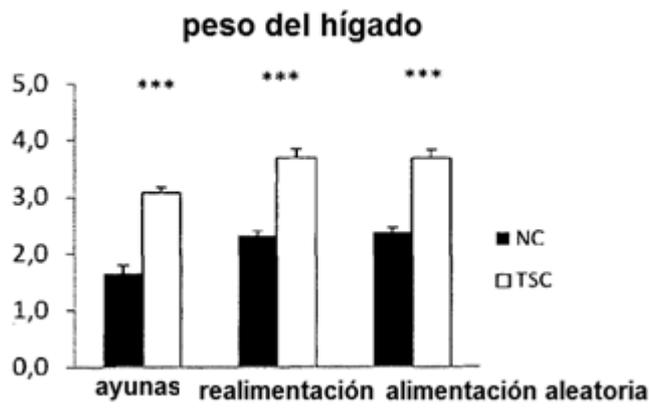


Figura 7

A)



B)



C)

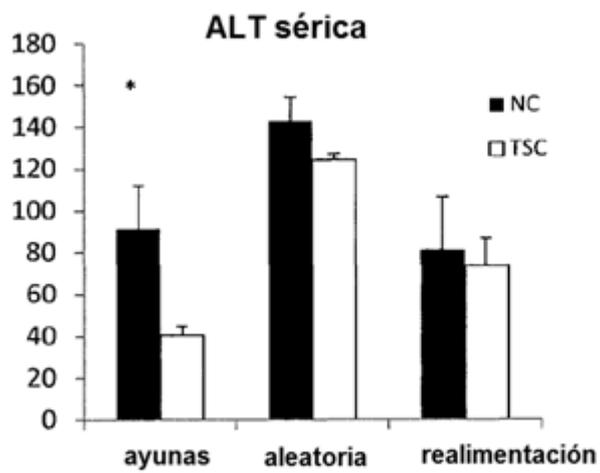
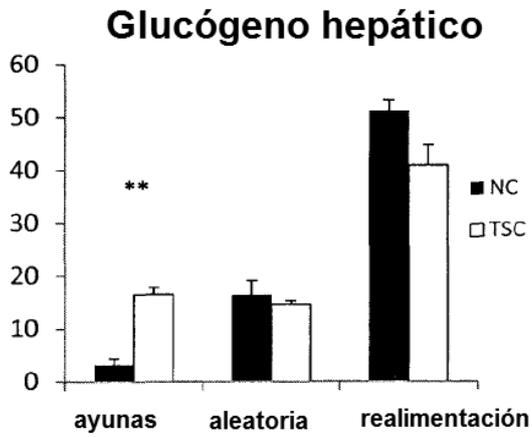
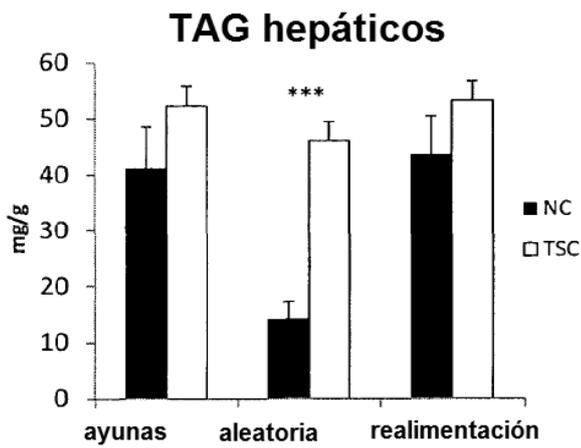


Figura 7 (continuación)

D)



E)



F)

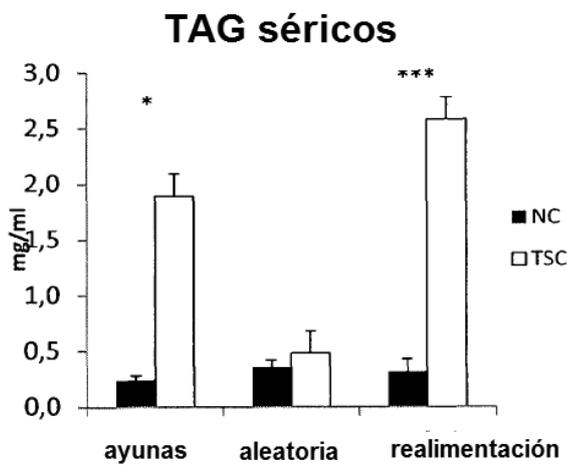
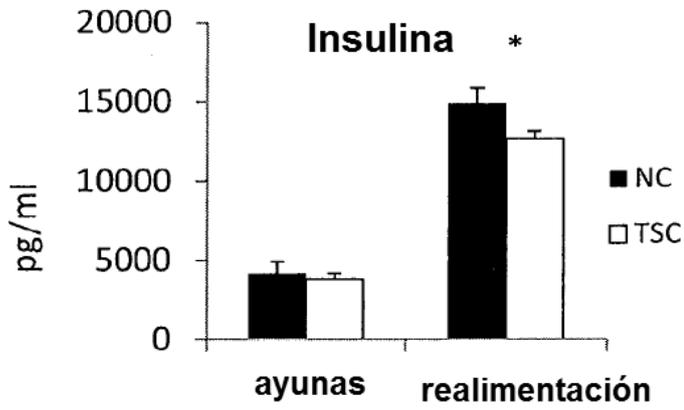
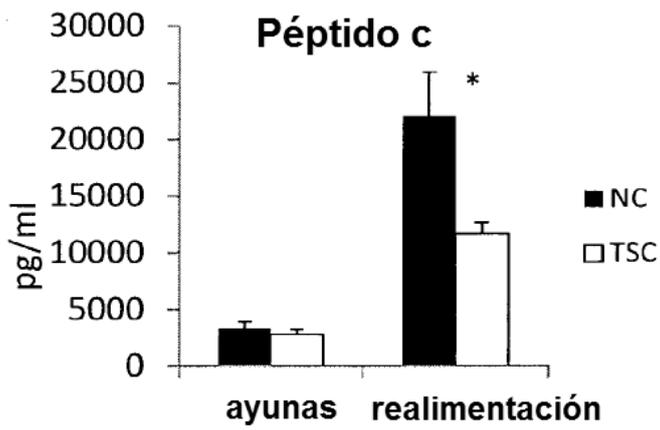


Figura 8

A)



B)



C)

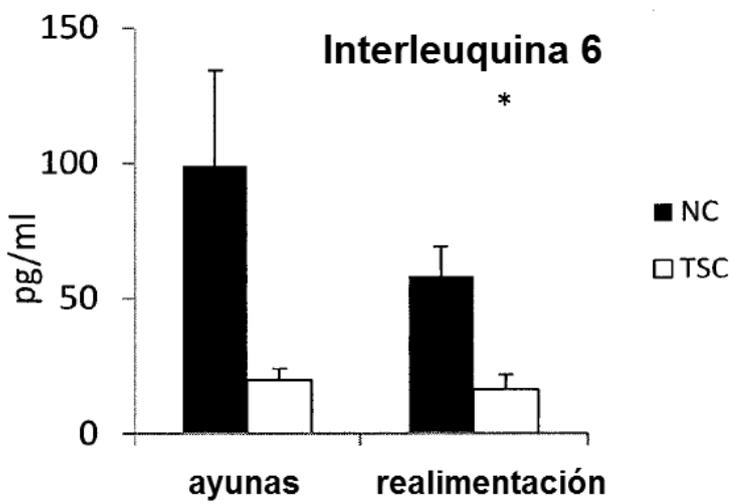
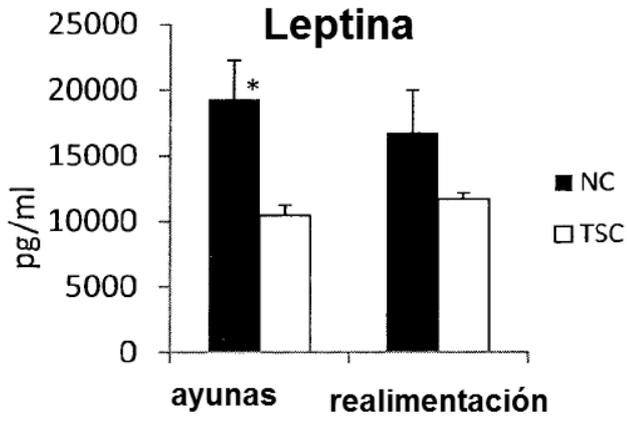
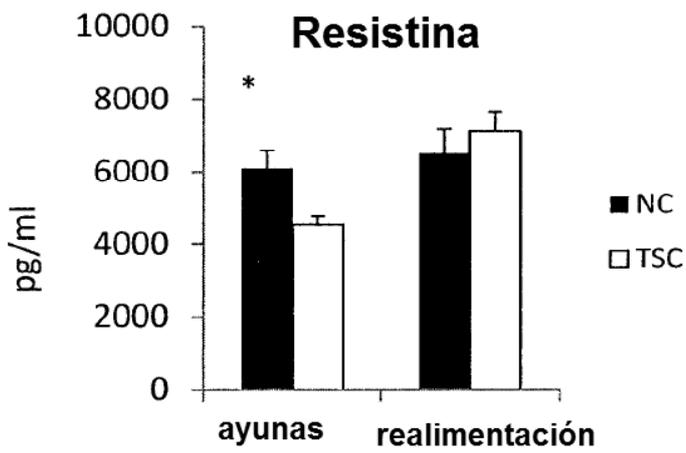


Figura 8 (continuación)

D)



E)



F)

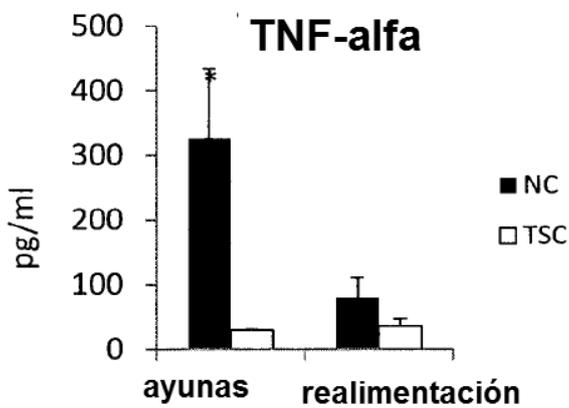
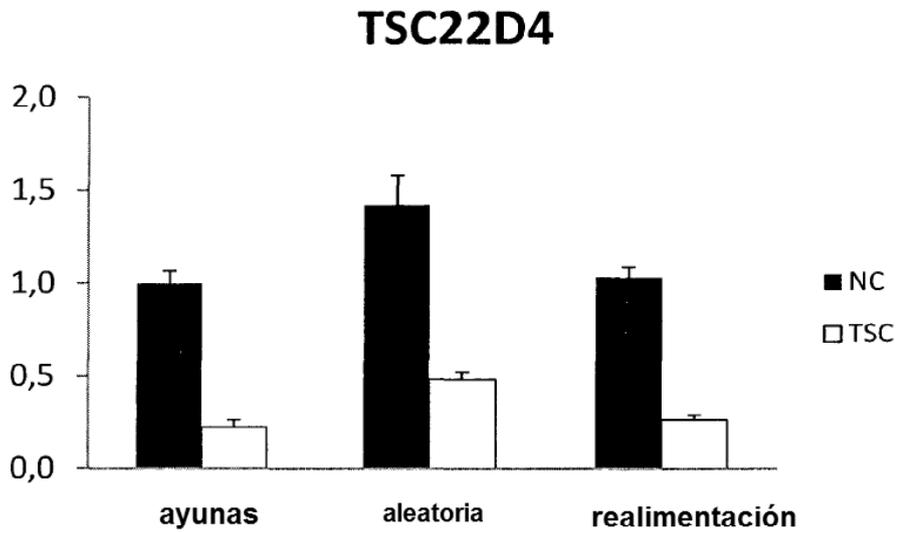


Figura 9

A)



B)

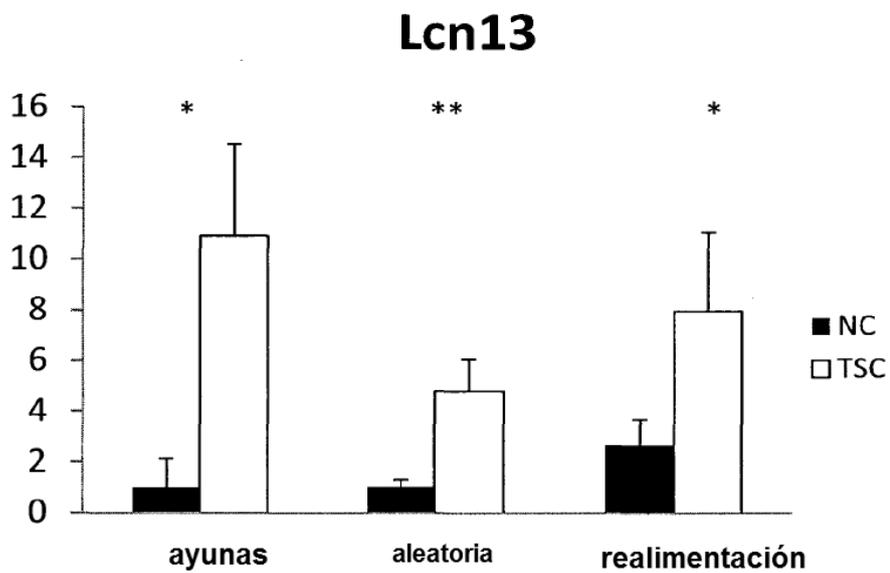
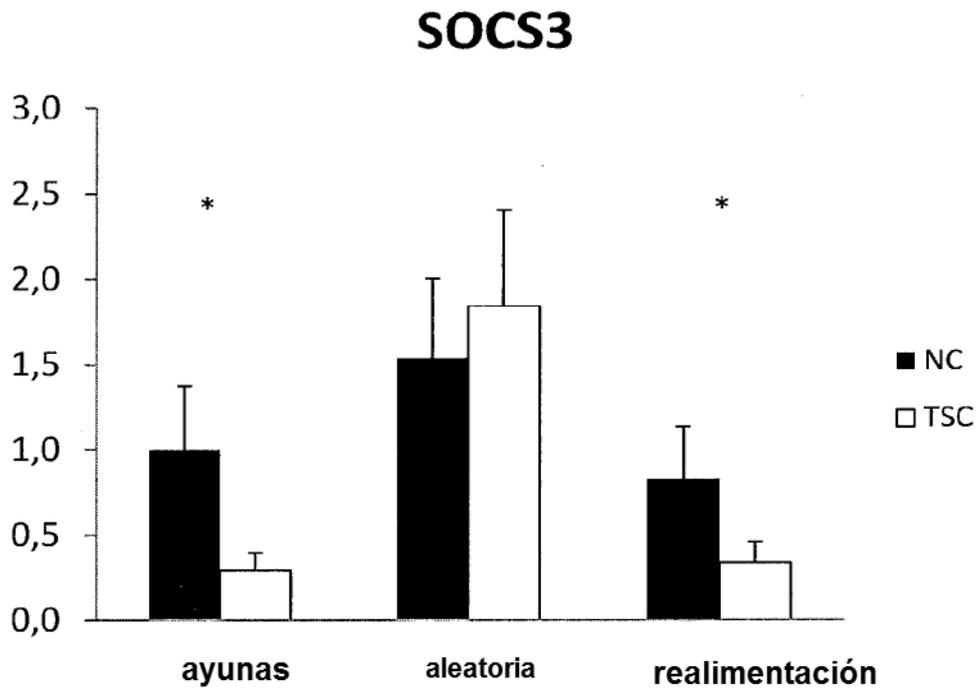


Figura 9 (continuación)

C)



D)

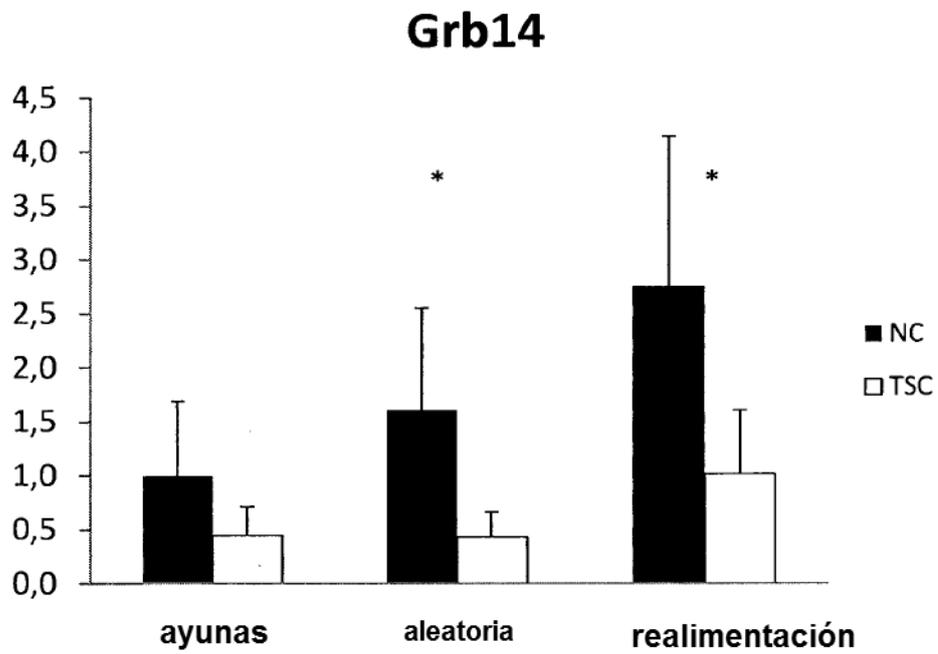


Figura 10

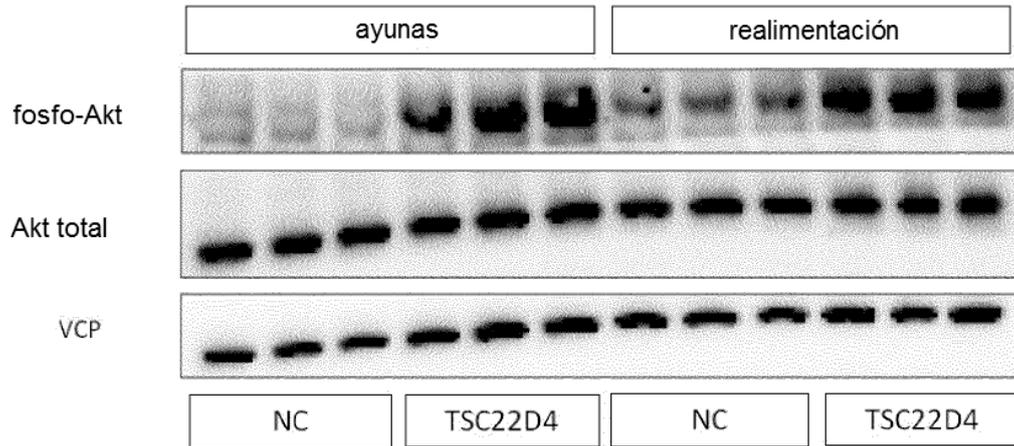


Figura 11

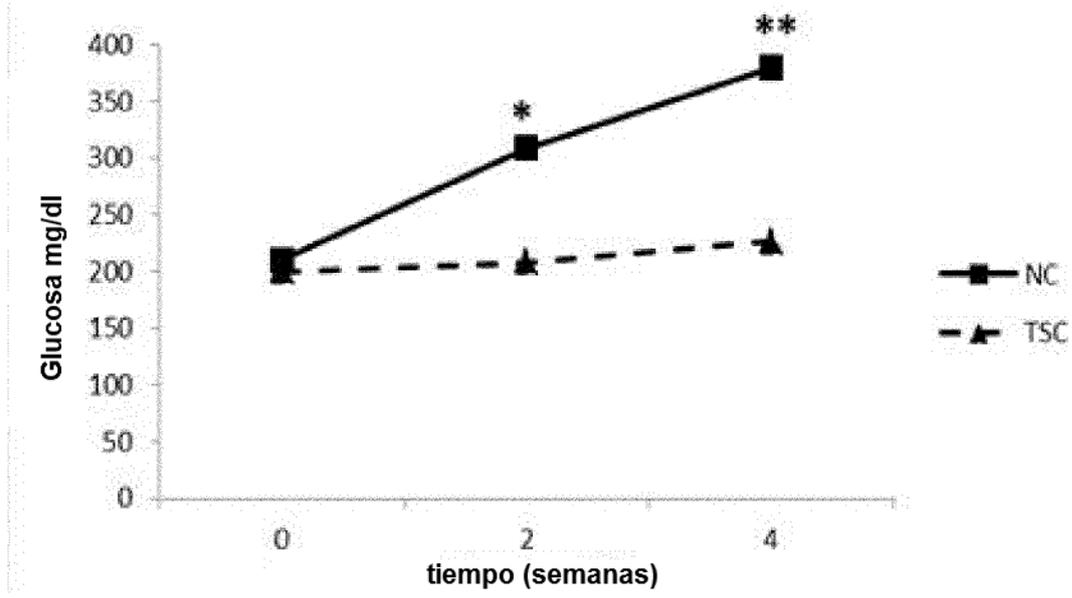


Figura 12

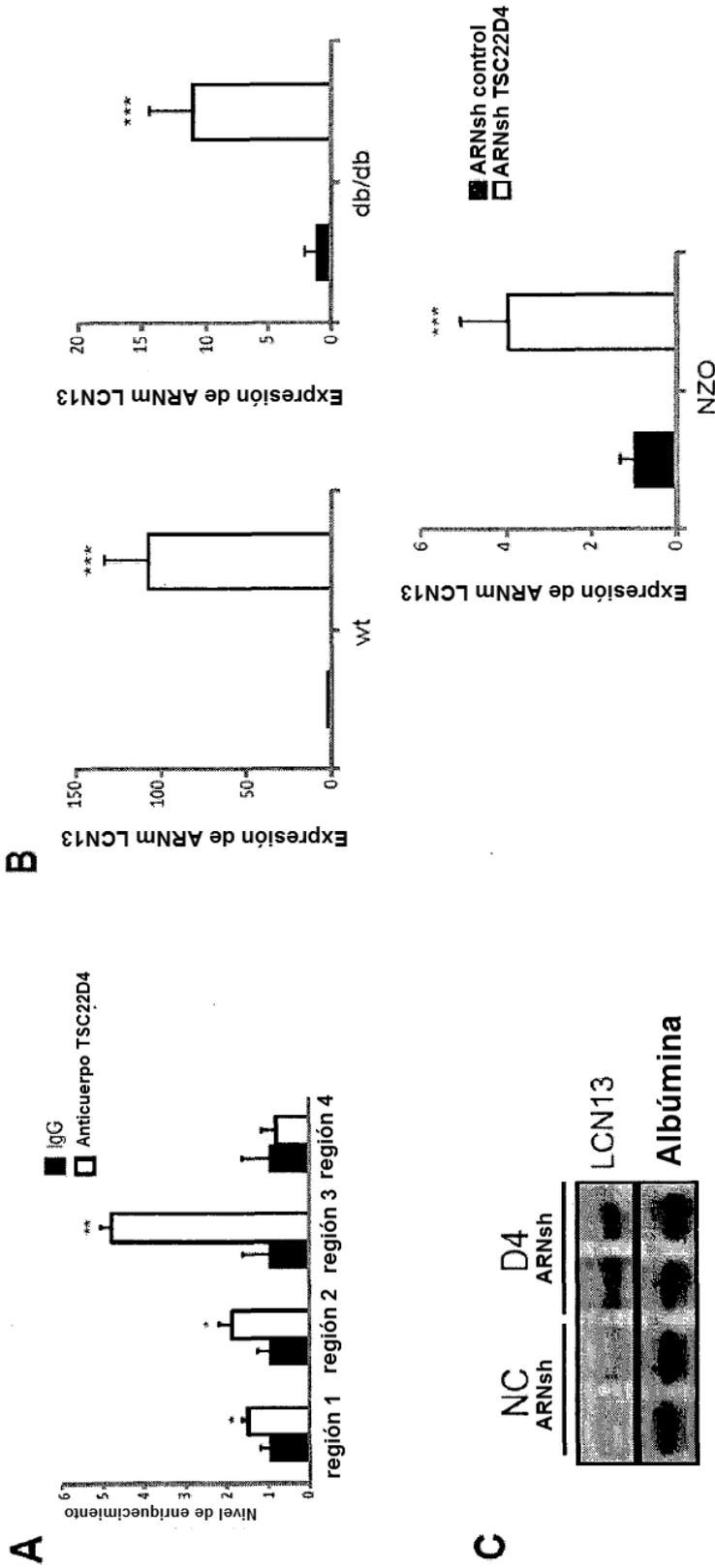


Figura 12 (continuación)

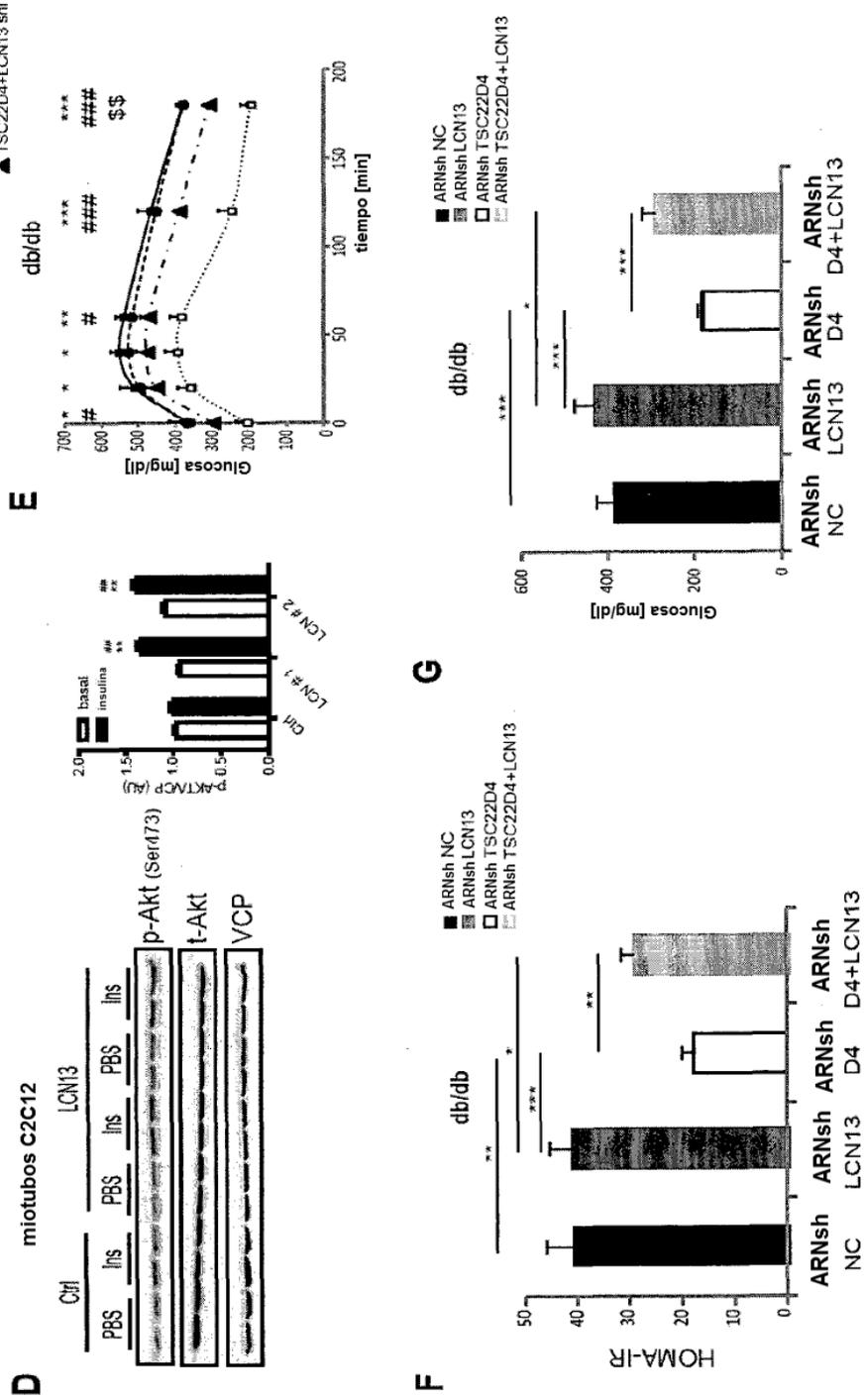


Figura 12 (continuación)

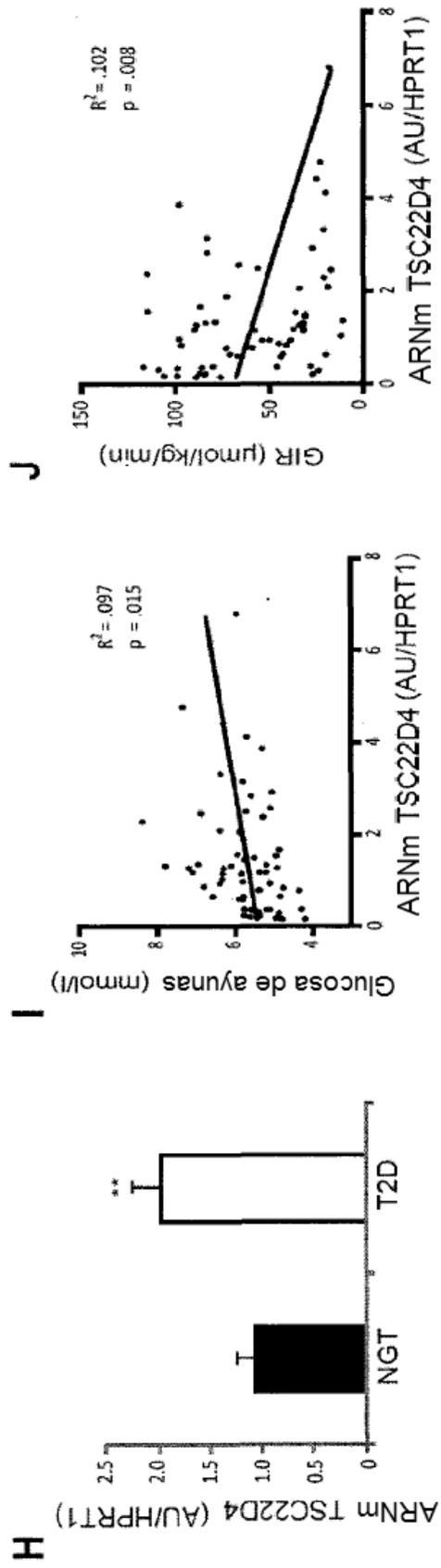


Figura 13

