



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 594**

51 Int. Cl.:
A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02748339 .5**

96 Fecha de presentación : **07.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1357973**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

54 Título: **Polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **09.02.2001 US 267624 P**
18.04.2001 WO PCT/IB01/00914
04.06.2001 US 295722 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Serono Genetics Institute S.A.**
route Nationale 7
91030 Evry Cédex, FR

72 Inventor/es: **Chicca, Barbara A.;**
Chicca, John;
Denison, Blake;
Yen-Potin, Frances;
Bihain, Bernard;
Bejanin, Stephane;
Tanaka, Hiroaki;
Jobert, Severin;
Giordano, Jean-Yves y
Dumas Milne Edwards, Jean-Baptiste

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 594 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

Polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 y usos de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la investigación metabólica, en particular al descubrimiento de compuestos eficaces para reducir los niveles de colesterol, la grasa corporal y la masa corporal, y útiles para tratar enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo. Las enfermedades o trastornos metabólicos que se prevé que se traten por los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, obesidad, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, aterosclerosis, diabetes, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hipertensión.

Antecedentes de la invención

15 El siguiente análisis pretende facilitar la comprensión de la invención, pero no debe considerarse ni reconocerse como la técnica anterior a la invención.

La obesidad es un problema de salud pública que es grave, está muy extendido y continúa aumentando. En los Estados Unidos, 20 por ciento de la población es obesa; en Europa, hay un porcentaje ligeramente menor de personas obesas (Friedman (2000) Nature 404:632-634). La obesidad está asociada con un mayor riesgo de hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer, así como con complicaciones respiratorias y osteoartritis (Kopelman (2000) Nature 404:635-643). Incluso pérdidas de peso moderadas mejoran estas afecciones asociadas.

Aunque se admite que ciertos factores del estilo de vida incluyendo el entorno, la dieta, la edad y el ejercicio juegan un papel en la obesidad, ciertos estudios en gemelos, análisis de agregación familiar y estudios de adopción indican que la obesidad es, en gran parte, el resultado de factores genéticos (Barsh *et al* (2000) Nature 404:644-651). Está de acuerdo con estos estudios el hecho de que se estén identificando un número creciente de genes relacionados con la obesidad. Algunos de los genes estudiados más profundamente incluyen los que codifican leptina (*ob*) y su receptor (*db*), pro-opiomelanocortina (*Pomc*), receptor de melanocortina-4 (*Mc4r*), proteína agouti (*A^y*), carboxipeptidasa E (*fat*), receptor de 5-hidroxitriptamina 2C (*Htr2c*), hélice-bucle-hélice 2 básica naciente (*Nhlh2*), prohormona convertasa 1 (PCSK1) y proteína tubby (*tubby*) (revisado en Barsh *et al* (2000) Nature 404:644-651).

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos polipéptidos GSSP4 tienen efectos inesperados *in vitro* e *in vivo*, incluyendo utilidad para reducir el peso, prevención de aumento de peso, reducción de los niveles de colesterol y control de los niveles sanguíneos de glucosa en seres humanos y otros mamíferos. Estos efectos inesperados de la administración de polipéptidos GSSP4 en mamíferos también incluyen la reducción de niveles de ácidos grasos libres elevados debido a la administración de epinefrina, inyección *i.v.* de "Intralipid", o la administración de una comida de ensayo de alto contenido de grasa, así como un aumento de la oxidación de ácidos grasos en células musculares, reducción de los niveles de colesterol circulante, modulación de la glucosa sanguínea y reducción de peso en mamíferos, particularmente los que consumen una dieta de alto contenido de grasa/alto contenido de carbohidratos. Estos efectos son inesperados y sorprendentes dado que proteínas de estructura similar u homología (tales como colipasa y la toxina intestinal 1 de mamba) no han demostrado tener utilidad para la reducción de peso, prevención de aumento de peso, reducción de los niveles de colesterol y control de los niveles sanguíneos de glucosa. Sin embargo, los polipéptidos GSSP4 de la invención son eficaces y pueden proporcionarse a niveles factibles para tratamientos en seres humanos.

De esta manera, la invención se refiere a polipéptidos GSSP4, a polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, a vectores que comprenden dichos polinucleótidos GSSP4 y a células recombinantes para dichos polinucleótidos GSSP4, así como a composiciones farmacéutica y fisiológicamente aceptables, a composiciones que comprenden dichos polipéptidos GSSP4 y a métodos para administrar dichos polipéptidos o polinucleótidos GSSP4 en una composición farmacéutica y fisiológicamente aceptable para reducir el peso corporal, los niveles de colesterol o los niveles de glucosa, o para tratar enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo. También forman parte de la invención ensayos para identificar agonistas y antagonistas de actividades relacionadas con el metabolismo.

En un primer aspecto, la invención se refiere a polipéptidos GSSP4 purificados, aislados o recombinantes. En realizaciones preferidas, dichos polipéptidos comprenden, consisten esencialmente en o constan de los que tienen actividad significativa, donde dicha actividad se selecciona entre el grupo consistente en reducción de colesterol, regulación de colesterol, reparto de lípidos, metabolismo de lípidos, control de glucosa y actividad semejante a la de la insulina. En realizaciones preferidas, dichos polipéptidos comprenden, consisten esencialmente en, o constan de el polipéptido de longitud completa de la SEC ID N°:3 o un fragmento de aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido de longitud completa de la SEC ID N°:3. En otras realizaciones preferidas, dichos polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con los aminoácidos consecutivos correspondientes de las secuencias polipeptídicas identificadas en la SEC ID N°:3.

ES 2 312 594 T3

En otra realización preferida, el polipéptido GSSP4 puede reducir los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de: (i) ácidos grasos libres, (ii) glucosa y/o (iii) triglicéridos.

5 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que estimulan significativamente la oxidación de ácidos grasos libres o de lípidos en el músculo. Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que hacen que las células C2C12 diferenciadas en presencia de dichos polipéptidos experimenten una oxidación de oleato mayor en al menos 10%, 20%, 30%, 35% o 40% en comparación con las células no tratadas.

10 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que tienen una eficacia mayor en al menos 30% que las células no tratadas en relación con el aumento de la captación de leptina en una línea celular hepática (preferiblemente células hepáticas de ratón BPRCL (ATCC CRL-2217)).

15 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que reducen significativamente el aumento posprandial de ácidos grasos libres en plasma, particularmente después de una comida de alto contenido de grasa.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que reducen significativamente o eliminan laproducción de cuerpos cetónicos, particularmente después de una comida de alto contenido de grasa.

20 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que aumentan la captación de glucosa en células de músculo esquelético.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que aumentan la captación de glucosa en células adiposas.

25 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que aumentan la captación de glucosa en células neuronales.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que aumentan la captación de glucosa en glóbulos rojos.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que aumentan la captación de glucosa en el cerebro.

30 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que reducen significativamente el aumento posprandial de glucosa plasmática después de una comida, particularmente una comida de alto contenido de carbohidratos.

35 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que previenen significativamente el aumento posprandial de glucosa plasmática después de una comida, particularmente una comida de alto contenido de grasa o de alto contenido de carbohidratos.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que mejoran la sensibilidad a la insulina.

40 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan la ingesta de alimentos o la selección de alimentos.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan la saciedad.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan el metabolismo de ácidos grasos.

45 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan el metabolismo del colesterol, particularmente en tejidos esteroideogénicos. Por lo tanto, dichos polipéptidos tienen un papel potencial para influir, directa o indirectamente o de ambas formas, sobre los niveles de hormonas reproductoras (por ejemplo, estradiol, progesterona, testosterona).

50 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan los niveles de cortisol.

Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan los niveles de aldosterona. Por lo tanto, dichos polipéptidos tiene un papel potencial para influir, directa o indirectamente o de ambas formas, sobre los niveles de sodio y potasio.

55 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que modulan la presión sanguínea, preferiblemente para normalizar la presión sanguínea dentro de un intervalo normal.

60 Otros polipéptidos GSSP4 preferidos son los que forman multímeros (por ejemplo, heteromultímeros u homomultímeros) *in vitro* y/o *in vivo*. Son multímeros preferidos los homodímeros u homotrímeros. Otros multímeros preferidos son homomultímeros que comprenden al menos 4, 6, 8, 9, 10 ó 12 polipéptidos GSSP4. Otros multímeros preferidos son heteromultímeros que comprenden polipéptidos GSSP4 de la invención.

65 Otras realizaciones preferidas incluyen polipéptidos heterólogos que comprenden un polipéptido GSSP4 de la invención.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a polinucleótidos purificados, aislados o recombinantes que codifican dichos polipéptidos GSSP4 descritos en el primer aspecto, o su complemento. Otra realización preferida de la invención es un polinucleótido recombinante, purificado o aislado que comprende, o consistente en una secuencia ge-

ES 2 312 594 T3

nómica de mamífero, gen, ADNc o fragmentos de los mismos. En un aspecto, la secuencia procede de un ser humano, ratón u otro mamífero. En un aspecto preferido, la secuencia genómica incluye polinucleótidos aislados, purificados o recombinantes que comprenden un tramo contiguo de al menos 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 6000 ó 7500 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias polinucleotídicas descritas en la SEC ID N°:1, 2, o los complementos de las mismas, donde dicho tramo contiguo comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de nucleótidos correspondiente de la SEC ID N°: 1, 2 ó 3. En otras realizaciones, los polinucleótidos son ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN, cadenas sencillas y cadenas dobles.

10 También se prefieren polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 que tienen actividades reguladoras de colesterol.

También se prefieren polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 que tienen actividades reguladoras del peso corporal.

15 También se prefieren polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 que tienen actividades reguladoras de la grasa corporal.

También se prefieren polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 que tienen actividades reguladoras de la glucosa.

También se prefieren polinucleótidos y polipéptidos GSSP4 que tienen actividades reguladoras de los lípidos.

20 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un vector recombinante que comprende, consiste esencialmente en o consta de dicho polinucleótido descrito en el segundo aspecto.

También se describe en la presente memoria una célula recombinante que comprende, consiste esencialmente en o consta de dicho vector recombinante descrito en el tercer aspecto. También se describe una célula hospedadora recombinante para un polinucleótido de la invención.

25 En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable que comprende, consiste esencialmente en o consta de dichos polipéptidos GSSP4 descritos en el primer aspecto y un diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

30 En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método para controlar los niveles de colesterol que comprende proporcionar o administrar a individuos dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto.

35 En otras realizaciones preferidas, la invención se refiere a un método para reducir el peso corporal que comprende proporcionar o administrar a individuos dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto.

40 En otras realizaciones preferidas, la invención se refiere a un método para reducir la grasa corporal que comprende proporcionar o administrar a individuos dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto.

45 En otras realizaciones preferidas, la invención se refiere a un método para reducir o controlar la glucosa sanguínea que comprende proporcionar o administrar a individuos dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto.

50 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo que comprende proporcionar o administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto. Preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones preferidas, dicho individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano. En otra realización preferida, la composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o los polinucleótidos descritos en el segundo aspecto sugieren que un compuesto puede tener utilidad para aliviar la resistencia a la insulina en individuos, particularmente los que son obesos o tienen sobrepeso.

65 En otra realización preferida, la presente invención puede usarse en terapia complementaria en individuos para mejorar su nivel de colesterol, su peso o su nivel de glucosa, que comprende una composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto en combinación con agentes conocidos.

ES 2 312 594 T3

La presente invención también proporciona un método para mejorar los niveles de colesterol, el peso corporal o el control de glucosa en individuos, que comprende la administración de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto de manera individual, sin agentes conocidos.

5 En otra realización preferida, la presente invención puede administrarse concomitantemente o conjuntamente con agentes conocidos, por ejemplo, en forma de unidades de dosificación separadas a usar simultáneamente, por separado o secuencialmente (antes o después del agente conocido). Por consiguiente, la presente invención también proporciona un producto que contiene una composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto
10 o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto y un agente conocido como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para mejorar los niveles de colesterol, el peso corporal o el control de la glucosa en individuos, particularmente los que son obesos o tienen sobrepeso. La relación entre la composición de la presente invención y el agente conocido debe ser tal que la cantidad de cada ingrediente activo empleado sea una que proporcione un nivel terapéuticamente eficaz, pero no mayor que la cantidad recomendada como segura para la administración.

15 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto puede usarse como un método para mejorar la sensibilidad a la insulina en algunas personas, particularmente las que tienen diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, diabetes de tipo I) o diabetes no insulino dependiente (tipo II) en combinación con una
20 terapia con insulina.

En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto puede usarse como un método para mejorar la sensibilidad a la insulina en algunas personas, particularmente las que tienen diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, diabetes de tipo I) o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, tipo II) en combinación con terapias alternativas.

25 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa como un método en la profilaxis de los efectos perjudiciales a largo plazo producidos por una elevada dosificación prolongada de insulina en seres humanos que tienen IDDM o NIDDM.

30 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la hipersecreción de insulina y trastornos o afecciones producidos como resultado de dicha hipersecreción de insulina.

35 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la obesidad y las consecuencias o complicaciones de la obesidad.

40 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la hipercolesterolemia y las consecuencias o complicaciones de la hipercolesterolemia.

45 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la NIDDM o IDDM y las consecuencias o complicaciones de la NIDDM o IDDM.

50 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT).

55 De esta manera, otras realizaciones preferidas proporcionan terapias y métodos para normalizar la resistencia a la insulina.

De esta manera, otras realizaciones preferidas proporcionan terapias y métodos para reducir, ralentizar o prevenir la progresión hasta NIDDM.

60 En otras realizaciones preferidas, la presente invención de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto se usa en terapia o en métodos para reducir o prevenir la aparición del síndrome de resistencia a la insulina.

65 En otras realizaciones preferidas, se tratan o previenen de acuerdo con los métodos de la invención otras afecciones, particularmente la obesidad, asociadas con la resistencia a la insulina. De esta manera, por medio de la prevención o tratamiento de la obesidad, los métodos de la invención permitirán a un individuo tener una vida más cómoda y evitar el inicio de diversas enfermedades inducidas por la obesidad.

ES 2 312 594 T3

En otras realizaciones preferidas, la diana de los métodos de acuerdo con la presente invención incluye individuos con una tolerancia normal a la glucosa (NGT) que son obesos o que tienen hiperinsulinemia en ayunas, o que tienen ambas cosas.

5 En un octavo aspecto, la invención se refiere a un método para controlar los niveles sanguíneos de ácidos grasos libres (FFA) y el metabolismo de los lípidos que comprende proporcionar o administrar a individuos que necesitan un aumento de la movilización y utilización de las reservas de grasa y una reducción de las reservas de grasa totales dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto.

10 En otra realización preferida, la identificación de dichos individuos que necesitan un aumento de la movilización y utilización de las reservas de grasa y una reducción de las reservas de grasa totales a tratar con dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable comprende una persona que está implicada en una actividad física que aumenta la demanda metabólica. Además, el aumento de la movilización y utilización de las reservas de grasa y la reducción de las reservas de grasa totales proporcionaría un medio para reducir el peso corporal, prevenir el aumento de peso y reducir la grasa corporal en individuos con sobrepeso y obesos. De esta manera, la reducción del peso y de la obesidad reducirá el riesgo de enfermedades crónicas asociadas con la obesidad tales como, pero sin limitación, la aparición de diversos trastornos del metabolismo de los lípidos, hipertensión, diabetes de tipo II, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular e ictus.

20 En aspectos relacionados, las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para provocar la inducción de una respuesta biológica deseada en un individuo, que comprenden las etapas de: proporcionar o administrar a un individuo una composición que comprende un polipéptido GSSP4, donde dicha respuesta biológica se selecciona entre el grupo consistente en:

- 25 (a) reducción de los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de ácidos grasos libres;
- (b) reducción de los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de glucosa;
- 30 (c) reducción de los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de triglicéridos;
- (d) estimulación de la oxidación de ácidos grasos libres o de lípidos en el músculo;
- 35 (e) aumento de la captación de leptina en células hepáticas o en el hígado;
- (f) reducción del aumento posprandial en los ácidos grasos libres plasmáticos, particularmente después de una comida de alto contenido de grasa; y,
- 40 (g) reducción o eliminación de la producción de cuerpos cetónicos, particularmente después de una comida de alto contenido de grasa;
- (h) aumento de la sensibilidad de los tejidos a la insulina, particularmente del músculo, tejido adiposo, hígado o cerebro,
- 45 (i) reducción de los niveles de colesterol, particularmente en los individuos que tienen el colesterol elevado (es decir, mayor de 200 mg/dl);
- (j) modulación de los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de glucosa dentro del intervalo fisiológico, preferiblemente manteniendo la glucosa entre 60 y 190 mg/dl;
- 50 (k) modulación de los niveles (concentración) circulantes (sanguíneos, séricos o plasmáticos) de FFA dentro del intervalo fisiológico, preferiblemente manteniendo los FFA entre 190 y 420 mg/dl;
- (l) modulación de la producción de cuerpos cetónicos como resultado de una comida de alto contenido de grasa, donde dicha modulación es preferiblemente una reducción o eliminación;
- 55 (m) reducción del peso corporal particularmente en individuos con un IMC mayor de 27.

60 En un noveno aspecto, la invención se refiere a un método para preparar el polipéptido GSSP4 descrito en el primer aspecto, donde dicho método se selecciona entre el grupo consistente en: escisión proteolítica, metodología recombinante y síntesis artificial.

65 En un décimo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar polipéptidos GSSP4 recombinantes, comprendiendo el método proporcionar un mamífero transgénico, no humano, cuya leche contiene dichos polipéptidos GSSP4 recombinantes, y purificar dichos polipéptidos GSSP4 recombinantes a partir de la leche de dicho mamífero no humano. En una realización, dicho mamífero no humano es una vaca, cabra, oveja, conejo o ratón. En otra realización, el método comprende purificar polipéptidos GSSP4 recombinantes a partir de dicha leche, y además comprende escindir dicha proteína *in vitro* para obtener polipéptidos GSSP4 deseados.

ES 2 312 594 T3

En un decimoprimer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo purificado o aislado capaz de unirse específicamente a una proteína que comprende la secuencia de uno de los polipéptidos de la presente invención. En un aspecto de esta realización, el anticuerpo es capaz de unirse a un polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos, al menos 8 aminoácidos consecutivos o al menos 10 aminoácidos consecutivos de la secuencia de uno de los polipéptidos de la presente invención.

En un decimosegundo aspecto, la invención se refiere al uso de polipéptidos descritos en el primer aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo o para reducir o aumentar la masa corporal. Preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones preferidas, dicho individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En un decimotercer aspecto, la invención se refiere al uso de polipéptidos descritos en el primer aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo o para reducir la masa corporal. Preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones preferidas, dicho individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En un decimocuarto aspecto, la invención proporciona polipéptidos del primer aspecto de la invención o una composición del quinto aspecto para uso en un método de tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal.

En un decimoquinto aspecto, la invención proporciona polinucleótidos descritos en el segundo aspecto o una composición aceptable de los mismos, para uso en un método de tratamiento del cuerpo de un ser humano o de un animal. En un decimosexto aspecto, la invención se refiere a métodos para reducir el peso corporal con fines cosméticos, que comprenden proporcionar a un individuo dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto, o polipéptidos descritos en el primer aspecto. Preferiblemente, para dicha reducción de peso corporal, dicho individuo tiene un IMC de al menos 20, 25, 30, 35 ó 40.

En un decimoséptimo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o a polinucleótidos descritos en el segundo aspecto o a un polipéptido descrito en el primer aspecto para reducir la masa corporal en dichos individuos con un IMC de al menos 30, 35, 40 o 45 o para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos relacionados con el metabolismo. Preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones preferidas, dicho individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En realizaciones preferidas, la identificación de dichos individuos a tratar con dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable comprende la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de GSSP4 o la medición de los niveles de polipéptido GSSP4 o de su ARNm en muestras clínicas de dichos individuos. Preferiblemente, dichas muestras clínicas se seleccionan entre el grupo consistente en sangre, suero, plasma, orina y saliva.

En un decimooctavo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o a los polinucleótidos descritos en el segundo aspecto para reducir el peso corporal por razones cosméticas.

En otras realizaciones preferidas, la invención se refiere a la composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o a los polinucleótidos descritos en el segundo aspecto para reducir los niveles de glucosa.

ES 2 312 594 T3

En un decimonoveno aspecto, la invención se refiere a métodos para tratar la resistencia a la insulina, que comprenden proporcionar a un individuo dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o dichos polinucleótidos descritos en el segundo aspecto, o un polipéptido descrito en el primer aspecto.

5 Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N°:1 muestra la secuencia genómica de GSSP4 indicando regiones reguladoras, exones, alelos y posiciones polimórficas, y cebadores de microsecuenciación inversos y directos para identificar el haplotipo.

10 La SEC ID N°:2 muestra la secuencia de ADNc del polinucleótido GSSP4.

La SEC ID N°:3 muestra la secuencia polipeptídica de GSSP4.

15 Las SEC ID N°:4-18 muestran secuencias de nucleótidos 47-méricas de GSSP4 que comprenden un alelo polimórfico en la posición 24. Los correspondientes alelos y cebadores indicados en la SEC ID N°: 1 son los siguientes:

SEC ID N°:4 VLP_1206_C_A, m=C o A

20 SEC ID N°:5 VLP_148_A_G, r=A o G

SEC ID N°:6 VLP_1851_T_C, y=T o C

SEC ID N°:7 VLP_2551_G_A, r=G o A

25 SEC ID N°:8 VLP_3124_C_T, y=C o T

SEC ID N°:9 VLP_3563_G_A, r=G o A

SEC ID N°:10 VLP_3792_G_A, r=G o A

30 SEC ID N°:11 VLP_4417_A_C, m=A o C

SEC ID N°:12 VLP_5757_T_C, y=T o C

35 SEC ID N°:13 VLP_6322_A_G, r=G o A

SEC ID N°:14 VLP_816_G_A, r=G o A

SEC ID N°:15 VLP_924_G_A, r=G o A

40 SEC ID N°:16 VLP_99-1_174_T_C, y=T o C

SEC ID N°:17 VLP_99-1_325_C_G, s=C o G

45 SEC ID N°:18 VLP_99-2_389_T_C, y=T o C

Descripción detallada de la invención

50 Antes de describir la invención con más detalle, se proporcionan las siguientes definiciones para ilustrar y definir el significado y alcance de los términos usados para describir la presente invención.

60 Como se usa indistintamente en la presente memoria, los términos “oligonucleótidos” y “polinucleótidos” y ácido nucleico incluyen secuencias de ARN, ADN o híbridos de ARN/ADN de más de un nucleótido en una sola cadena o en forma de dúplex. Los términos incluyen “nucleótidos modificados” que comprenden al menos una modificación, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación: (a) un grupo de unión alternativo, (b) una forma análoga de purina, (c) una forma análoga de pirimidina, o (d) un azúcar análogo. Como ejemplos de grupos de unión análogos, purinas, pirimidinas y azúcares véase, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 95/04064. Las secuencias polinucleotídicas de la invención pueden prepararse por cualquier método conocido, incluyendo la generación sintética, recombinante, *ex vivo*, o una combinación de las mismas, así como utilizando cualquier método de purificación conocido en la técnica.

65 Las expresiones construcción polinucleotídica, polinucleótido recombinante y polipéptido recombinante se usan en la presente memoria de acuerdo con su uso en la técnica. Las expresiones “cadena arriba” y “cadena abajo” también se usan en la presente memoria consecuentemente con su uso en la técnica. Las expresiones “pares de bases” y “pares de bases de Watson y Crick” se usan indistintamente en la presente memoria y consecuentemente con su uso en la técnica. De manera similar, las expresiones “complementario”, “complemento del mismo”, “complemento”, “polinucleótido complementario”, “ácido nucleico complementario” y “secuencia de nucleótidos complementaria” se usan indistintamente en la presente memoria y consecuentemente con su uso en la técnica.

ES 2 312 594 T3

El término “purificado” se usa en la presente memoria para describir un polinucleótido o vector polinucleotídico de la invención que se ha separado de otros compuestos incluyendo, pero sin limitación, otros ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas (tales como las enzimas usadas en la síntesis del polinucleótido). Purificado también puede referirse, por ejemplo, a la separación de polinucleótidos cerrados covalentemente de polinucleótidos lineales, o viceversa. Un polinucleótido es sustancialmente puro cuando al menos aproximadamente 50%, 60%, 75% o 90% de una muestra contiene una única secuencia polinucleotídica. En algunos casos esto implica una determinación entre conformaciones (lineal frente a cerrada covalentemente). Típicamente, un polinucleótido sustancialmente puro comprende aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99% peso/peso de una muestra de ácido nucleico. La pureza u homogeneidad de un polinucleótido puede indicarse por varios medios bien conocidos en la técnica, tales como una electroforesis en gel de agarosa o poli(acrilamida) de una muestra seguida de la visualización de una única banda polinucleotídica tras la tinción del gel. Para ciertos fines puede proporcionarse una mayor resolución mediante el uso de HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica.

De forma similar, el término “purificado” se usa en la presente memoria para describir un polipéptido de la invención que se ha separado de otros compuestos incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y otras proteínas. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido es sustancialmente puro cuando al menos aproximadamente 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de las moléculas polipeptídicas de una muestra tienen una única secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido sustancialmente puro comprende, típicamente, aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% peso/peso de una muestra de proteína. La pureza u homogeneidad de un polipéptido se indica por varios métodos bien conocidos en la técnica, tales como una electroforesis en gel de agarosa o poli(acrilamida) de una muestra seguida de la visualización de una única banda polipeptídica tras la tinción del gel. Para ciertos fines puede proporcionarse una mayor resolución mediante el uso de HPLC u otros métodos bien conocidos en la técnica.

Además, como se usa en la presente memoria, el término “purificado” no requiere una pureza absoluta; en su lugar, se pretende que sea una definición relativa. Se contempla expresamente la purificación del material de partida o del material natural en al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud. Como alternativa, la purificación puede expresarse como “al menos” un porcentaje de pureza con respecto a polinucleótidos heterólogos (ADN, ARN o ambos) o polipéptidos. Como una realización preferida, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención tienen una pureza de al menos; 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 98%, 99%, 99,5% o 100% con respecto a polinucleótidos o polipéptidos heterólogos. Como otra realización preferida, los polinucleótidos o polipéptidos tienen “al menos” una pureza que varía desde cualquier número hasta la posición número mil, entre 90% y 100% (por ejemplo, una pureza de menos 99,995%) con respecto a polinucleótidos o polipéptidos heterólogos. Además, la pureza de los polinucleótidos o polipéptidos puede expresarse como un porcentaje (como se ha descrito anteriormente) con respecto a todos los materiales y compuestos distintos de la solución de vehículo. Cada número, hasta la posición número mil, puede considerarse una especie individual de pureza.

El término “aislado” requiere retirar el material de su entorno original (*por ejemplo*, del entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, separado de alguno o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición, y aun así estar aislado por el hecho de que el vector o la composición no son parte de su entorno natural.

Se excluyen específicamente de la definición de “aislado”: cromosomas de origen natural (por ejemplo, extensiones cromosómicas), bibliotecas de cromosomas artificiales, bibliotecas genéricas y bibliotecas de ADNc que existen como una preparación de ácido nucleico *in vitro* o como una preparación de células hospedadoras transfectadas/transformadas, donde las células hospedadoras son una preparación *in vitro* heterogénea o se siembran en placas como una población heterogénea de colonias individuales. También se excluyen específicamente las bibliotecas anteriores en las que una EST 5' constituye menos de 5% (o como alternativa, 1%, 2%, 3%, 4%, 10%, 25%, 50%, 75% o 90%, 95% o 99%) del número de insertos de ácido nucleico en las moléculas de vector. También se excluyen específicamente preparaciones de ADN genómico de células completas o de ARN de células completas (incluyendo dichas preparaciones de células completas, que se rompen mecánicamente o se digieren enzimáticamente). Se excluyen más específicamente las preparaciones de células completas anteriores como una preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis (incluyendo transferencias de las mismas) en las que el polinucleótido de la invención no se ha separado adicionalmente de los polinucleótidos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, una separación adicional por escisión de una única banda a partir de una población de bandas heterogéneas en un gel de agarosa o transferencia de nylon).

El término “cebador” denota una secuencia oligonucleotídica específica que es complementaria a una secuencia de nucleótidos diana y se usa para hibridar con la secuencia de nucleótidos diana. Un cebador sirve como un punto de inicio para la polimerización de nucleótidos catalizada por una ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa.

El término “sonda” denota un segmento de ácido nucleico definido (o un segmento análogo de nucleótidos, por ejemplo, APN como se define en la presente memoria más adelante) que puede usarse para identificar una secuencia

polinucleotídica específica presente en una muestra, comprendiendo dicho segmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos específica que se va a identificar.

5 El término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos sin tener en cuenta la longitud del polímero. Por lo tanto, dentro de la definición de polipéptido se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas. Este término tampoco especifica ni excluye modificaciones posteriores a la expresión de polipéptidos. Por ejemplo, se incluyen expresamente en el término polipéptido polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glicosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares. También se incluyen dentro de la definición polipéptidos que pueden contener uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, aminoácidos que sólo son naturales en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos de sistemas de mamíferos modificados etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural.

10 Las expresiones “control de la glucosa sanguínea”, “regulación de la glucosa” “regulación de la glucosa sanguínea”, “modulación de la glucosa sanguínea” y “control de la glucosa” se refieren a mantener o regular los niveles de glucosa en sangre, suero y plasma entre 70-190 mg/dl. Sin limitarse a teoría alguna, los compuestos/polipéptidos de la presente invención presentan un método de control crónico de la glucosa dentro de un intervalo estrecho y más fisiológico en comparación con el control de la glucosa que se consigue con las terapias actuales que tratan trastornos del metabolismo de la glucosa o de la acción de la insulina, incluyendo, pero sin limitación, hiperglucemia, resistencia a la insulina, diabetes mellitus insulino dependiente y diabetes mellitus no insulino dependiente.

20 Sin limitarse a teoría alguna, los compuestos/polipéptidos de la invención son capaces de modular el control de la glucosa (como se ha definido anteriormente), dirigiendo o repartiendo la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos y, por lo tanto, se cree que tratan “enfermedades que implican el control de la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos”. La expresión “tejidos periféricos” pretende incluir sangre, cerebro, músculo y tejido adiposo. En realizaciones preferidas, los compuestos/polipéptidos de la invención dirigen o reparten la glucosa hacia el hígado, músculo y corazón. En realizaciones preferidas alternativas, la glucosa se dirige o se reparte hacia el tejido adiposo. En otras realizaciones preferidas, la glucosa se dirige o se reparte hacia el hígado. En otras realizaciones preferidas, la glucosa se dirige o se reparte hacia el cerebro. En otras realizaciones preferidas, la glucosa se dirige hacia la sangre. En otras realizaciones preferidas más, los compuestos/polipéptidos de la invención aumentan o disminuyen la oxidación de la glucosa, preferiblemente por el músculo.

30 Sin limitarse por la teoría, los compuestos/polipéptidos de la invención son capaces de modular el reparto de lípidos endógenos o de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos y, por lo tanto, se cree que tratan “enfermedades que implican el reparto de lípidos entre el hígado y los tejidos periféricos”. La expresión “tejidos periféricos” pretende incluir sangre, músculo y tejido adiposo. En realizaciones preferidas, los compuestos/polipéptidos de la invención reparten los lípidos hacia el músculo. En realizaciones preferidas alternativas, los lípidos se reparten hacia la sangre. En realizaciones preferidas alternativas, los lípidos se reparten hacia el tejido adiposo. En otras realizaciones preferidas, los lípidos se reparten hacia el hígado. En otras realizaciones preferidas más, los compuestos/polipéptidos de la invención aumentan o disminuyen la oxidación de los lípidos endógenos o de la dieta, preferiblemente ácidos grasos libres (FFA) por el músculo. Los lípidos endógenos y de la dieta incluyen, pero sin limitación, triglicéridos (TG) y FFA.

45 Las “enfermedades preferidas” en las que se cree que está implicado el control del colesterol, grasa corporal, metabolismo de lípidos, glucemia, reparto de la glucosa en sangre y reparto de lípidos incluyen obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, cánceres reproductivos, hipercortisolismo, aldosteronismo, hiperandrogenismo, hipercalemia, hipernatremia, hiperlipoproteinemia, hiperinsulinemia, hiperglucemia, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (por ejemplo, cetosis), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia, que se van a prevenir o tratar mediante los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea.

55 El término “heterólogo”, cuando se usa en la presente memoria, se pretende que designe cualquier polipéptido o polinucleótido distinto de un polipéptido GSSP4 o un polinucleótido que codifica un polipéptido GSSP4 de la presente invención.

60 Las expresiones “que comprende”, “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” se definen de acuerdo con su significado convencional. El significado definido expuesto en el M.P.E.P. controla el significado definido en la técnica y el significado definido expuesto en la ley de casos reguladora del Circuito Federal controla el significado expuesto en el M.P.E.P. Teniendo esto en consideración, las expresiones pueden sustituirse entre sí a lo largo de la presente solicitud para dar el significado específico asociado con cada término.

65 La expresión “célula hospedadora recombinante para” un polinucleótido particular de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que se ha alterado artificialmente para que contenga dicho polinucleótido de un modo que no se encuentra de forma natural en dicha célula. Por ejemplo, dicha célula puede transfectarse o transducirse de forma transitoria o estable con dicho polinucleótido de la invención.

ES 2 312 594 T3

El término “obesidad”, como se usa en la presente memoria, se define por el National Heart, Lung and Blood Institute Expert Panel (J Amer Diet Assoc 98:1178-1191, 1998) en base al Índice de Masa Corporal (IMC). El IMC se calcula como el peso corporal en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros, es decir, kg/m². Un IMC de menos de 18,5 kg/m² se considera “peso por debajo de lo normal”; un IMC de 18,5 - 24,9 kg/m² se considera “normal” (sano); un IMC de 25,0-29,9 kg/m² se considera “sobrepeso”; un IMC de 30,0-34,9 kg/m² se considera “obesidad de clase I”; un IMC de 35,0-39,9 kg/m² se considera “obesidad de clase II”; y un IMC de más de 39,9 kg/m² se considera “obesidad de clase III”. También puede usarse la circunferencia de cintura para indicar un riesgo de complicaciones metabólicas donde, en hombres, una circunferencia de más de o igual a 94 cm indica un riesgo aumentado, y mayor de o igual a 102 cm indica un riesgo sustancialmente aumentado. De forma similar, para mujeres, una circunferencia de más de o igual a 88 cm indica un riesgo aumentado, y de más de o igual a 88 cm indica un riesgo sustancialmente aumentado. La circunferencia de la cintura se mide en cm en el punto medio entre el borde inferior de las costillas y el borde superior de la pelvis. Otras medidas de obesidad incluyen, pero sin limitación, el espesor de los pliegues de piel, que es una medida en cm del espesor de los pliegues de la piel usando calibres y bioimpedancia, que se basa en el principio de que la masa magra y el agua conducirán la corriente eléctrica y la medición de la resistencia a una corriente débil (impedancia) aplicada a través de las extremidades proporciona una estimación de la grasa corporal usando una ecuación obtenida empíricamente.

Las expresiones “diabetes mellitus insulino dependiente”, “IDDM”, “diabetes de tipo I” y “diabéticos de tipo I” son sinónimas, inclusivas o intercambiables.

La expresión “complicaciones relacionadas con la diabetes” se refiere a estados patológicos o fisiológicos experimentados por pacientes diabéticos de tipo I (como se han definido previamente) o diabéticos de tipo II (como se han definido previamente) o por ambos tipos.

La expresión “diabetes mellitus no insulino dependiente”, “NIDDM”, “diabetes de tipo II” y “diabéticos de tipo II” son sinónimas, inclusivas o intercambiables.

La expresión “agente que actúa sobre el control de la glucosa sanguínea, dirigiendo la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a un compuesto o polipéptido de la invención que modula el control de la glucosa sanguínea como se ha descrito previamente. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye la oxidación de la glucosa, preferiblemente por el músculo. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye el peso corporal de los individuos o se usa para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo tal como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea.

La expresión “respuesta a un agente que actúa sobre el control de la glucosa sanguínea, dirigiendo la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a la eficacia de un fármaco, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de metabolizar un compuesto, la capacidad de convertir un profármaco en un fármaco activo y la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinámica (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo.

La expresión “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el control de la glucosa sanguínea, dirigiendo la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a los efectos adversos de la terapia debidos a extensiones de la acción farmacológica principal del fármaco o a reacciones adversas idiosincráticas debidas a una interacción del fármaco con factores únicos del hospedador. Los “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” pueden incluir, pero sin limitación, reacciones adversas tales como toxicidades dermatológicas, hematológicas o hepatológicas y además incluyen úlceras gástricas e intestinales, alteración de la función plaquetaria, lesión renal, nefritis, rinitis vasomotora con secreciones acuosas abundantes, edema angioneurótico, urticaria generalizada y asma bronquial hasta edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión y choque.

La expresión “agente que actúa sobre el reparto de la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a un compuesto o polipéptido de la invención que modula el reparto de la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos como se ha descrito previamente. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye los niveles sanguíneos de glucosa. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye la oxidación de la glucosa, preferiblemente por el músculo. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye el peso corporal de los individuos o se usa para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo tal como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y

ES 2 312 594 T3

lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardiaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardiaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea.

5 La expresión “respuesta a un agente que actúa sobre el reparto de la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a la eficacia de un fármaco, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de metabolizar un compuesto, la capacidad de convertir un profármaco en un fármaco activo y la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinámica (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo.

10 La expresión “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de la glucosa entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a los efectos adversos de la terapia debidos a extensiones de la acción farmacológica principal del fármaco o a reacciones adversas indiosincráticas debidas a una interacción del fármaco con factores únicos del hospedador. Los “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” pueden incluir, pero sin limitación, reacciones adversas tales como toxicidades dermatológicas, hematológicas o hepatológicas y además incluyen úlceras gástricas e intestinales, alteración de la función plaquetaria, lesión renal, nefritis, rinitis vasomotora con secreciones acuosas abundantes, edema angioneurótico, urticaria generalizada y asma bronquial hasta edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión y choque.

15 La expresión “agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a un compuesto o polipéptido de la invención que modula el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos como se ha descrito previamente. Preferiblemente, el agente aumenta o reduce la oxidación de los lípidos de la dieta, preferiblemente los ácidos grasos libres (FFA) por el músculo. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye el peso corporal de los individuos o se usa para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo tal como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardiaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardiaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardiaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea.

20 La expresión “respuesta a un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a la eficacia de un fármaco, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de metabolizar un compuesto, la capacidad de convertir un profármaco en un fármaco activo y la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinámica (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo.

25 La expresión “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a los efectos adversos de la terapia debidos a extensiones de la acción farmacológica principal del fármaco o a reacciones adversas indiosincráticas debidas a una interacción del fármaco con factores únicos del hospedador. Los “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” pueden incluir, pero sin limitación, reacciones adversas tales como toxicidades dermatológicas, hematológicas o hepatológicas y además incluyen úlceras gástricas e intestinales, alteración de la función plaquetaria, lesión renal, nefritis, rinitis vasomotora con secreciones acuosas abundantes, edema angioneurótico, urticaria generalizada y asma bronquial hasta edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión y choque.

30 La expresión “agente que actúa sobre el reparto de los lípidos endógenos entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a un compuesto o polipéptido de la invención que modula el reparto de los lípidos endógenos entre el hígado y los tejidos periféricos como se ha descrito previamente. Preferiblemente, el agente aumenta o reduce la oxidación de los lípidos endógenos, preferiblemente los ácidos grasos libres (FFA) por el músculo. Preferiblemente, el agente aumenta o disminuye el peso corporal de los individuos o se usa para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo tal como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardiaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM o diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM o diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardiaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardiaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea.

35 La expresión “respuesta a un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos endógenos entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a la eficacia de un fármaco, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de metabolizar un compuesto, la capacidad de convertir un profármaco en un fármaco activo y la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinámica (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo.

40 La expresión “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos endógenos entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a los efectos adversos de la terapia debidos a extensiones de la acción farmacológica principal del fármaco o a reacciones adversas indiosincráticas debidas a una interacción del fármaco con factores

únicos del hospedador. Los “efectos secundarios de un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos endógenos entre el hígado y los tejidos periféricos” pueden incluir, pero sin limitación, reacciones adversas tales como toxicidades dermatológicas, hematológicas o hepatológicas y además incluyen úlceras gástricas e intestinales, alteración de la función plaquetaria, lesión renal, nefritis, rinitis vasomotora con secreciones acuosas abundantes, edema angioneurótico, urticaria generalizada y asma bronquial hasta edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión y choque.

La expresión “enfermedades y trastornos relacionados con GSSP4”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que comprende un funcionamiento aberrante de GSSP4, o que podría tratarse o prevenirse modulando los niveles o la actividad de GSSP4. “Funcionamiento aberrante de GSSP4” incluye, pero sin limitación, niveles aberrantes de expresión de un polipéptido GSSP4 (aumentadas o disminuidas, pero preferiblemente disminuidos), actividad aberrante de un polipéptido GSSP4 (aumentados o disminuidos), e interacciones aberrantes con ligandos o moléculas de unión (aumentadas o disminuidas). Por “aberrante” se entiende un cambio del tipo o nivel de actividad observado en células, tejidos o pacientes normales, o visto previamente en la célula, tejido o paciente antes del comienzo de la enfermedad. En realizaciones preferidas, estas enfermedades y trastornos relacionados con GSSP4 incluyen obesidad y las enfermedades y trastornos metabólicos descritos previamente.

Se entiende que la expresión “tratamientos cosméticos” incluye tratamientos con compuestos o polipéptidos de la invención que aumentan o reducen la masa corporal de un individuo, donde el individuo no es clínicamente obeso o clínicamente delgado como se ha definido anteriormente. De esta manera, estos individuos tienen un índice de masa corporal (IMC) por debajo del límite establecido para la obesidad clínica (por ejemplo, por debajo de 30 kg/m²) y por encima del límite para la delgadez clínica (por ejemplo, por encima de 18,5 kg/m²). Además, estos individuos preferiblemente están sanos (por ejemplo, no tienen una enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo de la invención). También se entiende que “tratamientos cosméticos” incluyen, en algunas circunstancias, aumentos más localizados en el tejido adiposo, por ejemplo, aumentos o pérdidas específicamente alrededor de la cintura o las caderas, o alrededor de las caderas y los muslos. Estos aumentos o pérdidas localizadas de tejido adiposo pueden identificarse por aumentos o disminuciones, por ejemplo, en el tamaño de la cintura o de la cadera, por ejemplo.

El término “prevenir” o “prevención”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la administración de un compuesto antes del inicio de los síntomas clínicos de una enfermedad o afección para prevenir la manifestación física de aberraciones asociadas con la obesidad o la resistencia a la insulina en alguna medida. El término “prevenir” o “prevención” no significa que el resultado sea necesariamente absoluto, sino más bien eficaz para proporcionar algún grado de prevención o mejoría de la progresión del trastorno metabólico o relacionado con GSSP4 (es decir, proporcionar efectos protectores), mejoría de los síntomas del trastorno y mejoría de la reparación del trastorno metabólico o relacionado con GSSP4.

El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la administración de un compuesto después del inicio de los síntomas clínicos. El término “tratar” o “tratamiento” significa mejorar, aliviar los síntomas, eliminar la causa de los síntomas en una base temporal o permanente, o prevenir o ralentizar la aparición de los síntomas del trastorno o afección indicada.

La expresión “que necesita tratamiento”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la opinión del cuidador (por ejemplo, médico, enfermera, practicante, etc. en el caso de los seres humanos; y veterinario en el caso de animales, incluyendo mamíferos no humanos) de que un individuo o animal necesita o se beneficiará del tratamiento. Esta opinión se adquiere basándose en una diversidad de factores incluidos en el campo del cuidador experto, pero que incluyen el conocimiento de que el individuo o animal está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una afección que se puede tratar por los compuestos de la invención.

La expresión “percibe la necesidad de un tratamiento” se refiere a la determinación subclínica de que un individuo desea reducir el peso por razones cosméticas como se ha descrito anteriormente en la sección de “tratamiento cosmético”. La expresión “percibe la necesidad de tratamiento” en otras realizaciones puede hacer referencia a la decisión del propietario de un animal de realizar un tratamiento cosmético del animal.

El término “paciente” o “individuo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y más preferiblemente seres humanos. El término puede hacer referencia a machos o hembras, o a ambos sexos, o excluir machos o hembras.

La expresión “animal no humano” se refiere a cualquier vertebrado no humano, incluyendo aves y más habitualmente mamíferos, preferiblemente primates, animales tales como cerdos, cabras, ovejas, burros, caballos, gatos, perros, conejos o roedores, más preferiblemente ratas o ratones. Tanto el término “animal” como “mamífero” incluyen expresamente seres humanos a menos que vaya seguido de la expresión “no humano”. Los inventores creen que los polipéptidos GSSP4 pueden reducir significativamente la respuesta posprandial de la glucosa en un individuo, particularmente después de una comida de alto contenido de grasa/alto contenido de carbohidratos, sin afectar a los niveles de insulina. Además, se cree que los polipéptidos GSSP4 de la invención modulan el aumento de peso, particularmente en individuos con una dieta de alto contenido de grasa/alto contenido de carbohidratos.

La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 en la modulación de la glucosa como una nueva herramienta importante para controlar la homeostasis de energía y la regulación de la glucosa.

ES 2 312 594 T3

La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 en el reparto de la glucosa como una nueva herramienta importante para controlar la homeostasis de energía y la regulación de la glucosa.

5 La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 en el reparto de los lípidos como una nueva herramienta importante para controlar la homeostasis de energía y la regulación de los lípidos.

La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 en el reparto de los lípidos de la dieta como una nueva herramienta importante para controlar la homeostasis de energía y la regulación de los lípidos.

10 La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 en el reparto de los lípidos endógenos como una nueva herramienta importante para controlar la homeostasis de energía y la regulación de los lípidos.

Realizaciones preferidas de la invención

15 I. Polipéptidos GSSP4 de la Invención

Se han identificado polipéptidos GSSP4 que tienen actividad medible *in vitro* e *in vivo*. Estas actividades incluyen, pero sin limitación, la reducción de la respuesta posprandial de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, glucosa y triglicéridos, particularmente en ratones alimentados con una comida de alto contenido de grasa/carbohidratos, aumento de la oxidación de ácidos grasos libres en músculo *in vitro* y *ex vivo*, y pérdida de peso mantenida en ratones alimentados con una dieta de alto contenido de grasa/carbohidratos. También se proporcionan otros ensayos para la actividad de los polipéptidos GSSP4 *in vitro* e *in vivo* (ejemplos 2-13, por ejemplo), y los especialistas en la técnica pueden diseñar ensayos equivalentes.

25 La expresión actividad “relacionada con la obesidad” o “relacionada con el metabolismo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a al menos una, y preferiblemente a todas las actividades descritas en la presente memoria para los polipéptidos GSSP4. En la presente memoria se proporcionan ensayos para la determinación de estas actividades, y los especialistas habituales en la técnica pueden diseñar ensayos equivalentes. La expresión actividad “relacionada con el metabolismo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a al menos una, y preferiblemente a todas las actividades descritas en la presente memoria para los polipéptidos GSSP4. Los ensayos para la determinación de estas actividades se proporcionan en la presente memoria, se conocen en la técnica o pueden diseñarse por los especialistas habituales en la técnica. Opcionalmente, la “actividad relacionada con el metabolismo” puede seleccionarse entre el grupo consistente en el control de la glucosa sanguínea, el reparto de la glucosa, el metabolismo de la glucosa, el reparto de los lípidos, el metabolismo de los lípidos y la actividad del tipo de la insulina, o una actividad dentro de una de estas categorías. Opcionalmente, la actividad “relacionada con la obesidad” puede seleccionarse entre el grupo consistente en el reparto de los lípidos, el metabolismo de los lípidos y la actividad del tipo de la insulina, o una actividad dentro de una de estas categorías. Por actividad de “reparto de lípidos” se entiende la capacidad de localizar los lípidos de la dieta entre los grupos de tejidos principales incluyendo el tejido adiposo, el hígado y el músculo. Los inventores han demostrado que los polipéptidos GSSP4 de la invención intervienen en el reparto de los lípidos en el músculo, hígado o tejido adiposo. Por actividad de “metabolismo de los lípidos” se entiende la capacidad de influir en el metabolismo de los lípidos. Los inventores, por medio de experimentos de oxidación de ácidos grasos libres (ejemplos 4, 8, 10, 11 y 12), han demostrado que los polipéptidos GSSP4 de la invención tienen capacidad de influir en el nivel de ácidos grasos libres en el plasma además de aumentar el metabolismo de los lípidos en el músculo y de influir de manera transitoria en los niveles de triglicéridos en el plasma y en el músculo (ejemplos 7, 10 y 13). Por actividad “del tipo de la insulina” se entiende la capacidad de los polipéptidos GSSP4 de modular los niveles de glucosa en el plasma. Los inventores han descubierto que los polipéptidos GSSP4 no afectan significativamente a los niveles de insulina, pero afectan a los niveles de glucosa de manera similar a los efectos de la insulina (ejemplos 9 y 10). Estos efectos no se ven en presencia del polipéptido GSSP4 intacto (de longitud completa) o son significativamente mayores en presencia de los polipéptidos GSSP4 en comparación con el polipéptido GSSP4 de longitud completa.

50 Por polipéptido GSSP4 “intacto” o “de longitud completa”, como se usa en la presente memoria, se entiende la secuencia del polipéptido de longitud completa del polipéptido GSSP4 de la SEC ID N°:3, desde la metionina N-terminal al codón de terminación C-terminal. Los polipéptidos GSSP4 preferidos tienen la actividad biológica descrita en la presente memoria, y por lo tanto pueden ser útiles para preparar anticuerpos, ensayos de diagnóstico, etc.

55 Como otra realización preferida, están los polipéptidos GSSP4 que no permiten una elevación de la glucosa plasmática por encima de 190 mg/dl, particularmente después del consumo de alimentos, o que previenen una reducción de la glucosa en suero por debajo de 70 mg/dl, particularmente después del consumo de alimentos.

60 Como otra realización preferida, están los polipéptidos GSSP4 que no permiten una elevación de los ácidos grasos plasmáticos por encima de 420 mg/dl, particularmente después del consumo de alimentos, o que previenen una reducción de los ácidos grasos en suero por debajo de 190 mg/dl, particularmente después del consumo de alimentos.

65 Por “significativamente”, como se usa en la presente memoria, se entiende estadísticamente significativo como se determina típicamente por los especialistas habituales en la técnica. Por ejemplo, los datos se calculan típicamente como media \pm SEM, y un valor de $p \leq 0,05$ se considera estadísticamente significativo. El análisis estadístico típicamente se realiza usando el ensayo t de Student para datos no pareados o el ensayo t de Student para datos pareados, según sea apropiado en cada estudio.

En los ejemplos mostrados más adelante se proporcionan “ensayos relacionados con el metabolismo” representativos. Estos ensayos incluyen, pero sin limitación, métodos *in vivo* e *in vitro* para medir la respuesta posprandial, métodos para medir la captación de la glucosa, la oxidación de la glucosa, la concentración de glucosa, la concentración de lípidos, los niveles de ácidos grasos libres, la oxidación de ácidos grasos y métodos para medir la modulación del peso. En realizaciones preferidas, la respuesta posprandial se mide en animales no humanos, preferiblemente roedores. En realizaciones preferidas se miden parámetros fisiológicos incluyendo, pero sin limitación, los niveles de glucosa, ácidos grasos, insulina y leptina. En otras realizaciones preferidas se mide la oxidación de ácidos grasos en las células *in vitro* o *ex vivo*, preferiblemente en células o tejido muscular de animales no humanos, preferiblemente roedores. En otras realizaciones preferidas, la modulación del peso se mide en animales humanos o no humanos, preferiblemente roedores (ratas o ratones), primates, perros, gatos o cerdos con una dieta de alto contenido de grasa/carbohidratos. Opcionalmente, la “actividad relacionada con el metabolismo” incluye otras actividades no identificadas específicamente en la presente memoria. En general, los “parámetros medibles” en relación con la obesidad y el campo de la investigación metabólica pueden seleccionarse entre el grupo consistente en los niveles de ácidos grasos libres, la oxidación de ácidos grasos libres, los niveles de triglicéridos, los niveles de glucosa, los niveles de insulina, los niveles de leptina, la ingesta de alimentos y el peso corporal.

En estos ensayos relacionados con el metabolismo, los polipéptidos o polinucleótidos GSSP4, o ambos, provocarían un cambio significativo en al menos uno de los parámetros medibles seleccionados entre el grupo consistente en la lipemia posprandial, los niveles de ácidos grasos libres, los niveles de triglicéridos, los niveles de glucosa, la oxidación de la glucosa, la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos libres y el peso. Como alternativa, los polipéptidos o polinucleótidos GSSP4, o ambos, tendrían un cambio significativo en al menos uno de los parámetros medibles seleccionados entre el grupo consistente en un aumento de los niveles sanguíneos de ácidos grasos (FFA), una reducción de los niveles sanguíneos de glucosa, una reducción en los niveles de insulina, un aumento en la oxidación de la glucosa y un aumento de la oxidación de FFA.

La invención se refiere, entre otras cosas, a polipéptidos GSSP4 aislados, purificados o recombinantes. Los polipéptidos GSSP4 de la invención son útiles para tratar o prevenir la resistencia a la insulina, y para reducir el peso corporal o aumentar el peso corporal (usando antagonistas de polipéptidos GSSP4) como un tratamiento cosmético o para el tratamiento prevención de enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo. Los polipéptidos GSSP4 también son útiles, entre otras cosas, en ensayos de selección de agonistas o antagonistas de la actividad de los polipéptidos GSSP4, para inducir la producción de anticuerpos específicos para el polipéptido GSSP4, y en ensayos de diagnóstico.

Los polipéptidos GSSP4 de la presente invención preferiblemente se proporcionan en una forma aislada, y pueden estar parcialmente o sustancialmente purificados. Una versión producida de manera recombinante de uno cualquiera de los polipéptidos GSSP4 puede purificarse sustancialmente por el método de una etapa descrito por Smith *et al.* ((1988) Gene 67(1):31-40) o por los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de la invención también pueden purificarse a partir de fuentes naturales o recombinantes usando anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la invención por métodos conocidos en la técnica de la purificación de proteínas.

También se contemplan específicamente preparaciones de polipéptidos GSSP4 de la invención que implican una purificación parcial o selección de los polipéptidos GSSP4. Se prevé que estas preparaciones brutas sean el resultado de la concentración de células que expresan polipéptidos GSSP4 quizás con una pocas etapas de purificación adicionales, pero antes de terminar la purificación de los polipéptidos. Por ejemplo, las células que expresan los polipéptidos GSSP4 están presentes en un sedimento, se lisan o el producto bruto se liofiliza.

Los polipéptidos GSSP4 pueden tener una longitud de cualquier número entero desde al menos 6 aminoácidos consecutivos hasta 1 aminoácido menos que un polipéptido GSSP4 de longitud completa de la SEC ID N°:4. De esta manera, para la SEC ID N°:4, un polipéptido GSSP4 puede tener: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, o 105 aminoácidos consecutivos.

Cada polipéptido GSSP4 descrito anteriormente puede especificarse adicionalmente en términos de sus posiciones N-terminal y C-terminal. Por ejemplo, en la presente invención se incluyen todas las combinaciones de una posición N-terminal y C-terminal que podrían ocupar polipéptidos de 6 aminoácidos contiguos a 1 aminoácido menos que el polipéptido GSSP4 de longitud completa, en cualquier secuencia de polipéptido GSSP4 de longitud completa intacta y contigua dada. De esta manera, un fragmento de 6 aminoácidos consecutivos podría ocupar posiciones seleccionadas entre el grupo consistente en 1-6, 2-7, 3-8, 4-9, 5-10, 6-11, 7-12, 8-13, 9-14, 10-15, 11-16, 12-17, 13-18, 14-19, 15-20, 16-21, 17-22, 18-23, 19-24, 20-25, 21-26, 22-27, 23-28, 24-29, 25-30, 26-31, 27-32, 28-33, 29-34, 30-35, 31-36, 32-37, 33-38, 34-39, 35-40, 36-41, 37-42, 38-43, 39-44, 40-45, 41-46, 42-47, 43-48, 44-49, 45-50, 46-51, 47-52, 48-53, 49-54, 50-55, 51-56, 52-57, 53-58, 54-59, 55-60, 56-61, 57-62, 58-63, 59-64, 60-65, 61-66, 62-67, 63-68, 64-69, 65-70, 66-71, 67-72, 68-73, 69-74, 70-75, 71-76, 72-77, 73-78, 74-79, 75-80, 76-81, 77-82, 78-83, 79-84, 80-85, 81-86, 82-87, 83-88, 84-89, 85-90, 86-91, 87-92, 88-93, 89-94, 90-95, 91-96, 92-97, 93-98, 94-99, 95-100, 96-101, 97-102, 98-103, 99-104, y 100-105, de un fragmento de 105 aminoácidos consecutivos. De forma similar, en la presente invención se incluyen las posiciones ocupadas por todos los demás fragmentos de tamaños comprendidos entre 6 aminoácidos

ES 2 312 594 T3

y 105 aminoácidos de la SEC ID N°:3 y también pueden preverse inmediatamente basándose en estos dos ejemplos y, por lo tanto, no se indican individualmente para no alargar innecesariamente la memoria descriptiva. Además, en la presente invención se incluyen las posiciones ocupadas por fragmentos de 6 a 105 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°:3 y también pueden preverse inmediatamente basándose en estos dos ejemplos y, por lo tanto, no se indican individualmente para no alargar innecesariamente la memoria descriptiva. Además, las posiciones ocupadas por fragmentos de 6 aminoácidos consecutivos a 1 aminoácido menos que cualquier otro polipéptido GSSP4 de longitud completa también pueden preverse basándose en estos dos ejemplos y, por lo tanto, no se indican individualmente para no alargar innecesariamente la memoria descriptiva.

Los polipéptidos GSSP4 de la presente invención pueden describirse, como alternativa, por las fórmulas “n a c” (inclusive); donde “n” equivale a la posición del aminoácido más N-terminal (como se define por la lista de secuencias) y “c” equivale a la posición del aminoácido más C-terminal (como se define por la lista de secuencias) del polipéptido; y además donde “n” equivale a un número entero comprendido entre 1 y 99; y donde “c” equivale a un número entero comprendido entre 7 y 105, el número de aminoácidos de la secuencia del polipéptido de longitud completa; y donde “n” es un número entero menor que “c” en al menos 6. Por lo tanto, para las secuencias proporcionadas en la SEC ID N°:3, “n” es cualquier número entero de la lista consistente en: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99; y “c” es cualquier número entero seleccionado entre el grupo consistente en: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 y 105. Todas las combinaciones de posiciones “n” y “c” se incluyen como realizaciones específicas de la invención. Además, la fórmula “n” a “c” puede modificarse como “n1-n2” a “c1-c2”, donde “n1-n2” y “c1-c2” representan intervalos posicionales seleccionados entre dos números enteros anteriores cualesquiera que representen posiciones de aminoácidos de la lista de secuencias. Las fórmulas alternativas incluyen “n1-n2” a “c” y “n” a “c1-c2”.

Estas realizaciones específicas, y otras realizaciones de fragmentos de polipéptidos o polinucleótidos descritos en la presente memoria, éstas pueden modificarse para ser “al menos”, “iguales a”, “iguales o menores que”, “menores que”, “de al menos ___ pero no mayores de” o “de ___ a ___” en un tamaño especificado o posiciones N-terminales y/o C-terminales especificadas. Debe indicarse que todos los intervalos usados para describir cualquier realización de la presente invención son inclusivos a menos que se indique específicamente otra cosa.

La presente invención también proporciona la exclusión de cualquier fragmento individual especificado por las posiciones N-terminal y C-terminal o de cualquier fragmento especificado por tamaño en restos aminoacídicos como se ha descrito anteriormente. Además, puede excluirse como especie individual cualquier número de fragmentos especificados por las posiciones N-terminal y C-terminal o por tamaño en restos aminoacídicos como se ha descrito anteriormente. Además, cualquier número de fragmentos especificados por las posiciones N-terminal y C-terminal o por tamaño en restos aminoacídicos como se ha descrito anteriormente pueden constituir un fragmento polipeptídico en cualquier combinación y también pueden incluir opcionalmente secuencias polipeptídicas no GSSP4.

La expresión “fragmento de GSSP4”, como se usa en la presente memoria, se refiere a fragmentos de polipéptidos GSSP4 de longitud completa que comprenden al menos 6 y cualquier otro número entero de aminoácidos hasta 104 del polipéptido GSSP4 de longitud completa (definido anteriormente). Los polipéptidos GSSP4 de la invención incluyen variantes, fragmentos, análogos y derivados de los polipéptidos GSSP4 descritos anteriormente, incluyendo polipéptidos GSSP4 modificados.

Variantes

Un especialista habitual en la técnica reconocerá que algunos aminoácidos de las secuencias de polipéptidos GSSP4 de la presente invención pueden variar sin un efecto significativo en la estructura o función de las proteínas; habrá aminoácidos críticos en la secuencia que determinan la actividad. De esta manera, la invención también incluye variantes de polipéptidos GSSP4 que tienen actividad relacionada con el metabolismo como se ha descrito anteriormente. Estas variantes incluyen secuencias de polipéptidos GSSP4 con una o más deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de aminoácidos por mutaciones naturales o por manipulación humana, seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica de manera que tengan poco efecto sobre la actividad. Más adelante se proporcionan pautas en relación a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas.

Hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia a cambios de una secuencia de aminoácidos (véase, Bowie, *et al.* (1990) Science, 247,1306-10). El primer método se basa en el proceso de evolución, en el que se aceptan o se rechazan mutaciones por selección natural. La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o exploraciones para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad.

Estos estudios han revelado que ciertas proteínas son sorprendentemente tolerantes de sustituciones de aminoácidos e indican los cambios de aminoácidos probables en ciertas posiciones de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los aminoácidos enterrados requieren cadenas laterales no polares, mientras que generalmente se conservan algunas

ES 2 312 594 T3

características de cadenas laterales en la superficie. Se describen otras sustituciones fenotípicamente silenciosas por Bowie *et al.* (*supra*) y las referencias citadas en dicho texto.

5 En caso de una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la invención, uno o varios aminoácidos pueden reemplazarse por aminoácidos “equivalentes”. La expresión aminoácido “equivalente” se usa en la presente memoria para designar cualquier aminoácido que pueda usarse en lugar de otro de los aminoácidos, con propiedades similares, de manera que un especialista en la técnica espere que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan sustancialmente sin cambios.

10 En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezado de sustituciones preferidas. Si estas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, o como se describe más adelante haciendo referencia a las clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

15 TABLA 1

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
20 Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys;
25 Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln;
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
30 Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
35 His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
He (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu;
40 Leu(L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile;
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu;
45 Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu;
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
50 Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr;phe	tyr
55 TF(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe;ala; norleucina	leu;

60 Las modificaciones sustanciales en función de la identidad inmunológica del polipéptido GSSP4 se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 65
- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 - (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, bis, lys, arg;

5 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

10 Las sustituciones no conservativas incluirán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

15 Las variaciones pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida), mutagénesis mediante alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis de casete [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante de GSSP4.

20 Los aminoácidos de las secuencias de polipéptidos GSSP4 de la invención que son esenciales para la función también pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis mediante alanina (véase, por ejemplo, Cunningham, *et al.* (1989) Science 244(4908):1081-5). Este último procedimiento introduce mutaciones individuales de alanina en todos los restos de una molécula. Después se ensaya la actividad relacionada con el metabolismo de las moléculas mutantes resultantes usando ensayos descritos anteriormente. Son de un interés especial sustituciones de aminoácidos cargados por otros aminoácidos cargados o neutros que pueden producir proteínas con características mejoradas muy deseables, tales como menor agregación. La agregación no sólo puede reducir la actividad, sino que también puede ser muy problemática cuando se preparan mutaciones farmacéutica o fisiológicamente aceptables, porque los agregados pueden ser inmunogénicos (véase, por ejemplo, Pinckard, *et al.*, (1967) Clin. Exp. Immunol 2:331-340; Robbins, *et al.*, (1987) Diabetes Jul;36(7):838-41; y Cleland, *et al.*, (1993) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 10(4):307-77).

35 De esta manera, el fragmento, derivado, análogo u homólogo de los polipéptidos GSSP4 de la presente invención puede ser, por ejemplo: (i) uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos se han sustituido por un resto aminoacídico conservado o no conservado (preferiblemente un resto aminoacídico conservado) y dicho resto aminoacídico sustituido puede estar codificado o no por el código genético (es decir, puede ser un aminoácido natural o no); o (ii) uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos incluyen un grupo sustituyente; o (iii) uno en el que el polipéptido GSSP4 se ha fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la vida media del fragmento (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se han fusionado a la forma anterior del fragmento, tal como un péptido de región de fusión Fc de IgG o una secuencia líder o secretora, o una secuencia que se emplea para la purificación de la forma anterior del fragmento o una secuencia de pro-proteína. Estos fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de los especialistas en la técnica por las enseñanzas de la presente memoria.

45 Otra realización de la invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido GSSP4 que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos conservativa, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos conservativas, no más de 40 sustituciones de aminoácidos conservativas, no más de 30 sustituciones de aminoácidos conservativas y no más de 20 sustituciones de aminoácidos conservativas. También se proporcionan polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de un fragmento de GSSP4, que tiene al menos una, pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservativas.

50 Otra realización específica de un polipéptido GSSP4 modificado de la invención es un polipéptido que es resistente a proteólisis, por ejemplo, un polipéptido GSSP4 en el que se ha modificado un enlace -CONH-péptido y se ha reemplazado por uno o más de los siguientes: un enlace (CH₂NH) reducido; un enlace (NHCO) retroinverso; un enlace metileno (CH₂-O); un enlace tiometileno (CH₂-S); un enlace carba (CH₂CH₂); un enlace cetometileno (CO-CH₂); un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂); un enlace (N-N); un enlace E-alceno; o un enlace -CH=CH-. De esta manera, la invención también incluye un polipéptido GSSP4 o una variante del mismo en la que al menos se ha modificado un enlace peptídico como se ha descrito anteriormente.

60 Además, los aminoácidos tienen dentro del cuerpo quiralidad L o D. En algunas realizaciones, es preferible alterar la quiralidad de los aminoácidos en los polipéptidos GSSP4 de la invención para prolongar la vida media dentro del cuerpo. De esta manera, en algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos están preferiblemente en la configuración L. En otras realizaciones, uno o más de los aminoácidos están preferiblemente en la configuración D.

65 Porcentaje de identidad

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 50%, al menos 60% o 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con un polipéptido GSSP4 como se ha descrito anteriormente. Con un polipéptido que tiene una "identidad" de

ES 2 312 594 T3

secuencia de aminoácidos de al menos 95% con una secuencia de aminoácidos del polipéptido GSSP4 se quiere decir que la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia del polipéptido GSSP4 excepto porque puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del polipéptido GSSP4. La secuencia de referencia es el polipéptido GSSP4 con una secuencia correspondiente a las secuencias proporcionadas en la SEC ID N°:3. Por lo tanto, para obtener un polipéptido que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 95% con una secuencia de aminoácidos del polipéptido GSSP4, hasta 5% (5 de 100) de los restos aminoacídicos de la secuencia pueden insertarse, deleccionarse o sustituirse por otro aminoácido en comparación con la secuencia del polipéptido GSSP4. Estas alteraciones pueden estar presentes en los extremos amino o carboxi o en cualquier otro lugar entre esas posiciones terminales, entremezcladas de forma individual entre restos de la secuencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia.

Como un aspecto práctico, se puede determinar si cualquier polipéptido particular tiene un porcentaje de identidad con un polipéptido GSSP4 de forma convencional usando programas informáticos conocidos. Tales algoritmos y programas incluyen, pero sin limitación, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA y CLUSTALW (Pearson y Lipman, (1988) Proc Natl Acad Sci USA Apr;85(8):2444-8; Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410; Thompson *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22(2):4673-4680; Higgins *et al.*, (1996) *Meth. Enzymol.* 266:383-402; Altschul *et al.*, (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; Altschul *et al.*, (1993) *Nature Genetics* 3:266-272). En una realización particularmente preferida, las homologías de secuencia de proteína y ácido nucleico se evalúan usando la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico ("BLAST"), que se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar;87(6):2264-8; Altschul *et al.*, 1990,1993,1997, todos *supra*). En particular se usan cinco programas BLAST específicos para realizar las siguientes tareas:

- (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de aminoácidos con una base de datos de secuencia de proteína;
- (2) BLASTN compara una secuencia problema de nucleótidos con una base de datos de secuencia de nucleótidos;
- (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptual de seis fases de una secuencia problema de nucleótidos (ambas cadenas) con una base de datos de secuencia de proteína;
- (4) TBLASTN compara una secuencia problema de proteína con una base de datos de secuencia de nucleótidos traducida en las seis fases de lectura (ambas cadenas); y
- (5) TBLASTX compara las traducciones de seis fases de una secuencia problema de nucleótidos con las traducciones de seis fases de una base de datos de secuencia de nucleótidos.

Los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, a los que se hace referencia en la presente memoria como "pares de segmentos de alta puntuación", entre una secuencia problema de aminoácidos o de ácido nucleico y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente a partir de una base de datos de secuencias de proteínas o ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de alta puntuación se identifican preferiblemente (es decir, se alinean) mediante una matriz de puntuación, muchas de las cuales se conocen en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (véase, Gonnet *et al.*, (1992) *Science* Jun 5;256(5062):1443-5; Henikoff y Henikoff (1993) *Proteins Sep*;17(1):49-61). Menos preferiblemente también se pueden usar las matrices PAM o PAM250 (véase, por ejemplo, Schwartz y Dayhoff, eds, (1978) *Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation). Los programas BLAST evalúan el significado estadístico de todos los pares de segmentos de alta puntuación identificados y seleccionan preferiblemente los segmentos que satisfacen un umbral de significado especificado por el usuario, tal como un porcentaje de homología especificado por el usuario. Preferiblemente, el significado estadístico de un par de segmentos de alta puntuación se evalúa usando la fórmula de significado estadístico de Karlin (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar;87(6):2264-8). Los programas BLAST se pueden usar con los parámetros por defecto o con parámetros modificados proporcionados por el usuario. Preferiblemente, los parámetros son parámetros por defecto.

Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada un alineamiento de secuencias global, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (1990) *Comp. App. Biosci.* 6:237-245. En un alineamiento de secuencias, las secuencias desconocida y objeto son secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en porcentaje de identidad. Son parámetros preferidos usados en un alineamiento de aminoácidos con FASTDB: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalización por Desacoplamiento=1, Penalización por Unión=20, Grupo de Aleatorización=25 Longitud=0, Puntuación Límite=1, Tamaño de Ventana=longitud de secuencia, Penalización por Hueco=5, Penalización por Tamaño de Hueco=0,05, Tamaño de Ventana=247 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, la que sea más corta.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, los resultados, en porcentaje de identidad, se tienen que corregir manualmente debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia problema, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia problema que son N- y C- terminales de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con un resto sujeto correspondiente, como

ES 2 312 594 T3

un porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. Se determina si un resto está emparejado/alineado por los resultados del alineamiento de secuencia de FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado por el anterior programa FASTDB usando los parámetros especificados, para lograr una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es lo que se usa para los propósitos de la presente invención. Solamente los restos de los extremos N y C de la secuencia objeto que no están emparejados/alineados con la secuencia problema se consideran para los propósitos de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, solamente los restos aminoacídicos problema fuera de los restos N- y C-terminales más alejados de la secuencia objeto. Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 restos aminoacídicos se alinea con una secuencia problema de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La delección tiene lugar en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB no se empareja/alinea con los primeros restos en el extremo N. Los 10 restos no emparejados representan 10% de la secuencia (número de restos en los extremos N y C no emparejados/número total de restos en la secuencia problema) de forma que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes están perfectamente emparejados, el porcentaje de identidad final sería 90%.

En otro ejemplo se compara una secuencia objeto de 90 restos con una secuencia problema de 100 restos. Esta vez, las delecciones son internas de forma que no hay restos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no están emparejados/alineados con la secuencia problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo solamente las posiciones de restos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, como se muestran en el alineamiento FASTDB, que no están emparejados/alineados con la secuencia problema, se corrigen manualmente. No se realizan otras correcciones manuales para los propósitos de la presente invención.

Producción

Obsérvese, a lo largo de la descripción, que cuando se discuten polipéptidos GSSP4, los fragmentos de GSSP4 están específicamente destinados a incluirse como un subconjunto preferido de polipéptidos GSSP4. Los métodos de producción específicos se abordan con detalle en las secciones III, IV, V y VI de la presente memoria descriptiva.

En resumen, los polipéptidos GSSP4 se aíslan preferiblemente a partir de muestras de tejido de mamífero, preferiblemente muestras humanas, o se expresan a partir de genes de mamífero, preferiblemente genes humanos, en células de mamífero, preferiblemente células humanas. Los polipéptidos GSSP4 de la invención se pueden producir usando métodos de expresión conocidos en la técnica. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos deseados de la invención, incluyendo fragmentos de los mismos, se ligan en un vector de expresión adecuado para el hospedador particular usado. Se pueden usar tanto sistemas de hospedador eucariotas como procariotas para formar polipéptidos recombinantes. Los polipéptidos se aíslan a partir de células lisadas o del medio de cultivo y se purifican hasta el grado necesario para su uso destinado. Además se pueden producir fragmentos de proteína más cortos por síntesis química. La purificación es mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, extracción diferencial, fraccionamiento con sal, cromatografía, centrifugación y similares. Los nucleótidos que comprenden la secuencia codificante de los polinucleótidos de la invención, o fragmentos de los mismos, se clonan en vectores de expresión por cualquier especialista en la técnica. Los vectores de expresión preferidos incluyen vectores de expresión eucariotas y procariotas. Se prefiere adicionalmente el vector de expresión pGEX-3X. La purificación de polipéptidos GSSP4 se puede facilitar por fusión recombinante de un péptido heterólogo al extremo C o N de los polipéptidos GSSP4. Los polipéptidos de fusión preferidos expresados incluyen polipéptidos heterólogos que contienen un marcador His añadido al extremo C, un marcador de glutatión-S-transferasa (GST) y un sitio de digestión con proteasa factor Xa.

Un método preferido para preparar los polipéptidos de la invención incluye un método que comprende las siguientes etapas: se dejan crecer células de *Escherichia coli*, preferiblemente BL21, y que comprenden preferiblemente el vector pGEX-3X que contiene los polinucleótidos de la invención que contienen un marcador His añadido al extremo C, un marcador GST y un sitio de proteasa Xa, hasta la subconfluencia, preferiblemente a una absorbancia de 0,8, y se inducen con isopropil beta-D-tiogalactósido. Las células se sedimentan, se lavan y se lisan en tampón, preferiblemente en tampón que contiene hidrocloreuro de guanidina. Se deja que los polipéptidos se unan a níquel, preferiblemente perlas que contienen Ni-NTA, y se lavan con tampones, preferiblemente tampones que contienen urea. Los polipéptidos unidos a níquel se equilibran con tampón, preferiblemente tampón que contiene cloruro sódico y cloruro cálcico, preferiblemente a pH 7,5. Los polipéptidos unidos a níquel se digieren, es decir, se tratan con tampón que comprende proteasa, preferiblemente proteasa factor Xa. La digestión se realiza preferiblemente a temperatura ambiente durante de 12 a 20 horas. El marcador GST escindido, si lo hay, se elimina por lavado con tampón, preferiblemente tampón con urea, preferiblemente a pH 5,9. Los polipéptidos de la invención se eluyen con tampón, preferiblemente tampón con urea, preferiblemente a pH 4,5. Los polipéptidos de la invención se repliegan, preferiblemente mediante métodos que comprenden las siguientes etapas: Los polipéptidos se diluyen en tampón común en la técnica, preferiblemente hasta una concentración de 100 microgramos/ml, preferiblemente en tampón que contiene urea a pH 4,5. Los polipéptidos se dializan contra tampón, preferiblemente tampón de diálisis que comprende urea 4 M, cisteína 5 mM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%, Tris 10 mM, cloruro sódico 150 mM y NaH₂PO₄ 100 mM, preferiblemente a pH 8,3. El tampón de diálisis que comprende urea 2 M se usa para sustituir el tampón de diálisis inicial, y el tampón de diálisis se sustituye al menos 1, 2 ó 3 veces durante al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 días. El polipéptido replegado se desala mediante cualquier método conocido en la técnica, preferiblemente usando una columna de filtración. Los polipéptidos de la invención se purifican adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, los polipéptidos se purifican por HPLC de fase inversa. Los polipéptidos preferiblemente se eluyen con ácido trifluoroacético al 0,08%

y un gradiente de acetonitrilo de 10-50%, y la elución se controla preferiblemente a 206 nm. El acetonitrilo y el ácido trifluoroacético se retiran para las composiciones que comprenden el polipéptido purificado, preferiblemente por evaporación por liofilización.

5 Se describen ejemplos adicionales de métodos útiles para la expresión o purificación de polipéptidos de la invención en *Methods in Enzymology*.

10 El ácido nucleico que codifica un fragmento de GSSP4 se puede obtener por PCR a partir de un vector que contenga la secuencia de nucleótidos de GSSP4 usando cebadores oligonucleotídicos complementarios al ADNc de GSSP4 deseado y que contenga secuencias de endonucleasa de restricción.

15 La transfección de un vector que expresa un fragmento de GSSP4 en células NIH 3T3 de ratón es una realización para introducir polinucleótidos en células hospedadoras. La introducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido en una célula hospedadora se puede realizar por transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.* ((1986) *Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., Amsterdam). Se contempla específicamente que, de hecho, los polipéptidos de la presente invención se pueden expresar por una célula hospedadora que carezca de un vector recombinante.

20 Un polipéptido de esta invención (es decir, un fragmento de GSSP4) se puede recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfoceulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Mucho más preferiblemente se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Los polipéptidos de la presente invención, y preferiblemente la forma secretada, también se pueden recuperar a partir de: productos purificados de fuentes naturales, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células aislados directamente o cultivados; productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procarionota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de planta superior, de insecto y de mamífero.

30 Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados. Preferiblemente, los polipéptidos de la invención no están glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto metionina modificado inicial, en algunos casos como un resultado de procesos mediados por el hospedador.

40 Además de incluir células hospedadoras que contienen las construcciones de vector que se discuten en la presente memoria, la invención también incluye células hospedadoras primarias, secundarias e inmortalizadas procedentes de vertebrado, particularmente procedentes de mamífero que se han creado por ingeniería genética para delecionar o sustituir material genético endógeno (por ejemplo, secuencia codificante), y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias polinucleotídicas heterólogas) que está asociado de forma funcional a los polinucleótidos de la invención, y que activa, altera y/o amplifica los polinucleótidos endógenos. Por ejemplo, se pueden usar técnicas conocidas en este campo para asociar de forma funcional regiones de control heterólogas (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias polinucleotídicas endógenas por recombinación homóloga, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.641.670 presentada el 24 de junio de 1997; la Publicación Internacional N° WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la Publicación Internacional N° WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Keller *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* Nov;86(22):8932-5; Koller *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* Nov; 86(22):8927-31; y Zijlstra *et al.* (1989) *Nature* Nov 23;342(6248):435-8; incorporándose las descripciones de cada uno de estos textos como referencia en su totalidad).

50 *Modificaciones*

55 Además, los polipéptidos de la invención se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Creighton, 1983 *Proteins*. New York, New York: W.H. Freeman and Company; y Hunkapiller *et al.*, (1984) *Nature* Jul 12-18;310(5973): 105-11). Por ejemplo, se puede sintetizar un fragmento de la invención relativamente corto usando un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia del fragmento. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido a-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como b-metil aminoácidos, Ca-metil aminoácidos, Na-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, los aminoácidos pueden ser D (dextrógiros) o L (levógiros).

65 La invención incluye fragmentos de polipéptidos que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Se

puede realizar cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

5 Las modificaciones post-traduccionales adicionales incluidas en la invención incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidrato ligadas a N o ligadas a O, procesamiento de extremos N-terminal o C-terminal, unión de restos químicos a la cadena principal del aminoácido, modificaciones químicas de cadenas de carbohidrato ligadas a N o ligadas a O y adición o delección de un resto de metionina N-terminal como resultado de la expresión en una célula hospedadora procariota. Los fragmentos polipeptídicos también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un
10 marcador de enzimático, fluorescente, isotónico o de afinidad para permitir la detección y aislamiento del polipéptido.

La invención también proporciona derivados modificados químicamente de los polipéptidos de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como una mayor solubilidad, estabilidad y tiempo en circulación del polipéptido, o menor inmunogenicidad. Véase la Patente de Estados Unidos N°: 4.179.337. Los restos químicos para
15 la modificación pueden seleccionarse entre polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propileno, copolímeros de glicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico y similares. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

20 El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. En el caso del polietilenglicol, el peso molecular preferido está comprendido entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término “aproximadamente” que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más y otras menos que el peso molecular indicado) para facilitar la manipulación y fabricación. Pueden usarse otros tamaños dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los
25 efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol en una proteína terapéutica o análogo).

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deben unirse al polipéptido teniendo en cuenta los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos del polipéptido. Los especialistas en la técnica disponen de
30 varios métodos de unión, por ejemplo, por el documento EP 0 401 384, incorporado en la presente memoria como referencia (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik *et al.* (1992) *Exp Hematol. Sep*;20(8): 1028-35, que presenta la pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Se prefiere para fines terapéuticos la unión a un grupo amino, tal como la unión en el extremo N-terminal o un grupo lisina.

35 *Multímeros*

Los fragmentos polipeptídicos de la invención pueden estar en forma de monómeros o multímeros (es decir, dímeros, triméros, tetrámeros y multímeros superiores). Por consiguiente, la presente invención se refiere a monómeros y multímeros de los fragmentos polipeptídicos de la invención, a su preparación y a composiciones (preferiblemente
40 composiciones farmacéuticas o fisiológicamente aceptables) que los contienen. En realizaciones específicas, los polipéptidos de la invención son monómeros, dímeros, triméros o tetrámeros. En otras realizaciones, los multímeros de la invención son al menos dímeros, al menos triméros o al menos tetrámeros.

Los multímeros incluidos en la invención pueden ser homómeros o heterómeros. Como se usa en la presente
45 memoria, el término homómero se refiere a un multímero que contiene sólo polipéptidos correspondientes a los polipéptidos GSSP4 de la invención (incluyendo fragmentos de polipéptidos, variantes, variantes de corte y empalme y proteínas de fusión correspondientes a estos fragmentos polipeptídicos descritos en la presente memoria). Estos homómeros pueden contener fragmentos polipeptídicos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. En una realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene sólo fragmentos polipeptídicos
50 que tienen secuencias de aminoácidos idénticas. En otra realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene fragmentos polipeptídicos que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. En realizaciones específicas, el multímero de la invención es un homodímero (por ejemplo, que contiene fragmentos polipeptídicos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes) o un homotrímero (por ejemplo, que contiene fragmentos polipeptídicos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas y/o diferentes). En otras realizaciones, el multímero
55 homomérico de la invención es al menos un homodímero, al menos un homotrímero o al menos un homotetrámero.

Como se usa en la presente memoria, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, que corresponden a diferentes proteínas o fragmentos polipeptídicos de las mismas) además de los polipéptidos de la invención. En una realización específica, el multímero de la invención es un heterodímero, un heterotrímero o un heterotetrámero. En otras realizaciones, el multímero heteromérico de la invención es
60 al menos un heterodímero, al menos un heterotrímero o al menos un heterotetrámero.

Los multímeros de la invención pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden unirse indirectamente, por ejemplo, por medio de la formación de liposomas. De esta manera, en
65 una realización, los multímeros de la invención, tales como, por ejemplo, homodímeros o homotrímeros, se forman cuando entran en contacto entre sí en solución polipeptídicos de la invención. En otra realización, los heteromultímeros de la invención, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrámeros, se forman cuando polipéptidos de la invención entran en contacto con anticuerpos contra los polipéptidos de la invención (incluyendo anticuerpos contra

la secuencia de polipéptido heterólogo en una proteína de fusión de la invención) en solución. En otras realizaciones, los multímeros de la invención se forman por asociaciones covalentes con y/o entre los polipéptidos de la invención. En estas asociaciones covalentes pueden estar implicados uno o más restos aminoacídicos contenidos en la secuencia polipeptídica (por ejemplo, la indicada en la lista de secuencias, o contenida en el polipéptido codificado por un clon depositado). En un caso, las asociaciones covalentes son entrecruzamientos entre restos de cisteína localizados dentro de las secuencias polipeptídicas, que interactúan en el polipéptido nativo (es decir, natural). En otro caso, las asociaciones covalentes son la consecuencia de manipulación química o recombinante. Como alternativa, en dichas asociaciones covalentes pueden estar implicados uno o más restos aminoacídicos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión de la invención.

En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión de la invención (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos número 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en la proteína de fusión Fc de la invención (como se describe en la presente memoria). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de proteínas de fusión de la invención son entre la secuencia de polipéptido heterólogo de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, tales como por ejemplo osteoprotegerina (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N°: WO 98/49305, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). En otra realización, dos o más polipéptidos de la invención se unen a través de enlazadores peptídicos. Los ejemplos incluyen los enlazadores peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.073.627 (incorporada en la presente memoria como referencia). Pueden producirse proteínas que comprenden múltiples polipéptidos de la invención separados por enlazadores peptídicos usando la tecnología de ADN recombinante convencional.

Otro método para preparar polipéptidos multímeros de la invención implica el uso de polipéptidos de la invención fusionados a una secuencia polipeptídica de cremallera de leucina o de cremallera de isoleucina. Son ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles de la invención los descritos en la solicitud PCT WO 94/10308, incorporada en la presente memoria como referencia. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido de la invención fusionado con una secuencia polipeptídica que dimeriza o trimeriza en solución se expresan en células hospedadoras adecuadas, y la proteína de fusión multimérica soluble resultante se recupera del sobrenadante de cultivo usando técnicas conocidas en este campo.

Los polipéptidos triméricos de la invención pueden ofrecer la ventaja de una mejor actividad biológica. Los restos de cremallera de leucina y los restos de isoleucina preferidos son los que forman preferiblemente trímeros. Un ejemplo es una cremallera de leucina derivada de la proteína D surfactante pulmonar (SPD), como se describe en Hoppe *et al.* FEBS Letters (1994) 16 de Mayo;344(2-3):191-5 y en la solicitud de patente de Estados Unidos con N° de Serie N° 08/446.922, incorporada en la presente memoria como referencia. En la preparación de polipéptidos triméricos de la invención pueden emplearse otros péptidos derivados de proteínas triméricas naturales. En otro ejemplo, las proteínas de la invención están asociadas por interacciones entre Flag[®] y la secuencia polipeptídica contenida en las proteínas de fusión de la invención que contienen la secuencia polipeptídica Flag[®]. En otra realización, las proteínas de la invención están asociadas por interacciones entre la secuencia del polipéptido heterólogo contenida en proteínas de fusión Flag[®] de la invención y un anticuerpo anti-Flag[®].

Los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas químicas conocidas en este campo. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea que contengan los multímeros de la invención pueden formar entrecruzamientos usando moléculas enlazadoras y técnicas de optimización de la longitud de moléculas enlazadoras conocidas en este campo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). Además, pueden generarse multímeros de la invención usando técnicas conocidas en este campo para formar uno o más entrecruzamientos intermoleculares entre los restos de cisteína localizados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que contenga el multímero (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). Además, los polipéptidos de la invención pueden modificarse rutinariamente por medio de la adición de cisteína o biotina al extremo C o al extremo N del polipéptido y pueden aplicarse técnicas conocidas en este campo para generar multímeros que contengan uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). Además, pueden aplicarse al menos 30 técnicas conocidas en este campo para generar liposomas que contengan los componentes polipeptídicos que se desea que estén contenidos en el multímero de la invención (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad).

Como alternativa, los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas de ingeniería genética conocidas en este campo. En una realización, se producen polipéptidos contenidos en multímeros de la invención de manera recombinante usando la tecnología de proteínas de fusión descrita en la presente memoria o conocida de otra manera en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). En una realización específica, se generan polinucleótidos que codifican un homodímero de la invención ligando una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la invención a una secuencia que codifica un polipéptido enlazador y después también a un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C al extremo N (sin la secuencia líder) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). En otra realización, se aplican técnicas recombinantes descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica para generar polipéptidos recombinantes de la invención que contengan un

dominio transmembrana (o péptido hidrófobo o señal) y que puedan incorporarse por técnicas de reconstitución de membranas en liposomas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.478.925, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad).

5 II. Polinucleótidos GSSP4 de la Invención

Son polinucleótidos preferidos los que codifican polipéptidos GSSP4 de la invención. Los polinucleótidos recombinantes que codifican polipéptidos GSSP4 pueden usarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitación, la expresión de los polipéptidos en células recombinantes para uso en ensayos de selección de antagonistas y agonistas de su actividad, así como para facilitar su purificación para uso de una diversidad de maneras que incluyen, pero sin limitación, en ensayos de selección de agonistas y antagonistas de su actividad, selecciones de diagnóstico e inducción de anticuerpos, así como el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo y/o para reducir la masa corporal.

15 La invención se refiere a los polinucleótidos que codifican polipéptidos GSSP4 y fragmentos polipeptídicos variantes de los mismos como se describe en la presente memoria. Estos polinucleótidos pueden estar purificados, aislados y/o pueden ser recombinantes. En todos los casos, los polinucleótidos GSSP4 deseados de la invención son los que codifican polipéptidos GSSP4 de la invención con actividad relacionada con el metabolismo como se describe y analiza en la presente memoria.

20 Fragmentos

Un fragmento polinucleotídico es un polinucleótido que tiene una secuencia que es completamente igual que parte, pero no todo el polipéptido GSSP4 de longitud completa o la secuencia de nucleótidos del polipéptido GSSP4 especificado. Estos fragmentos pueden ser “independientes”, es decir, sin formar parte o estar fusionados a otros polinucleótidos, o pueden estar comprendidos dentro de otro polinucleótido no GSSP4 (heterólogo) del que constituye una parte o región. Sin embargo, varios fragmentos de polinucleótidos GSSP4 pueden estar comprendidos dentro de un solo polinucleótido.

30 Los polinucleótidos GSSP4 de la invención comprenden desde 18 bases consecutivas hasta 18 bases consecutivas menos que las secuencias polinucleotídicas de longitud completa que codifican los polipéptidos GSSP4 intactos, por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas GSSP4 de la SEC ID N°: 1 ó 2. En un aspecto de esta realización, el polinucleótido comprende al menos 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645 ó 648 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido de la presente invención.

40 Además de los tamaños de ácido nucleico preferidos indicados anteriormente, otros ácidos nucleicos preferidos comprenden al menos 18 nucleótidos, en la presente memoria “al menos 18” se define como cualquier número entero comprendido entre 18 y el número entero que representa 18 nucleótidos menos que la posición de nucleótido más 3’ del ADNc de los polipéptidos GSSP4 indicado en la SEC ID N°: 2, o en otras partes de la presente memoria.

45 También se incluyen como polinucleótidos preferidos de la presente invención fragmentos de ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos de longitud, como se ha descrito anteriormente, que están especificados adicionalmente en términos de su posición 5’ y 3’ indicada en la lista de secuencias presentada más adelante. En el caso de las variantes alélicas y degeneradas y otras variantes, la posición 1 se define como el nucleótido más 5’ de la ORF, es decir, el nucleótido “A” del codón de iniciación (ATG), estando numerados los demás nucleótidos consecutivamente. Por lo tanto, Cada combinación de una posición de nucleótido 5’ y 3’ que puede ocupar un fragmento polinucleotídico de la invención, con una longitud de al menos 18 nucleótidos contiguos, en un polinucleótido de polipéptido GSSP4 intacto de la presente invención se incluye en la invención como una especie individual. Los fragmentos polinucleotídicos especificados por las posiciones 5’ y 3’ pueden preverse inmediatamente y, por lo tanto, no se indican individualmente para no alargar innecesariamente la memoria descriptiva.

50 Debe tenerse en cuenta que las especies anteriores de fragmentos polinucleotídicos de la presente invención pueden describirse alternativamente por la fórmula “x a y”; donde “x” equivale a la posición de nucleótido más 5’ e “y” equivale a la posición de nucleótido más 3’ del polinucleótido; y además donde “x” equivale a un número entero comprendido entre 1 y el número de nucleótidos de la secuencia polinucleotídica de la presente invención menos 18, y donde “y” equivale a un número entero comprendido entre 19 y el número de nucleótidos de la secuencia polinucleotídica de la presente invención menos 18 nucleótidos; y donde “x” es un número entero menor que “y” en al menos 18.

65 Los fragmentos de polinucleótidos GSSP4 de la invención comprenden desde 18 bases consecutivas hasta la secuencia polinucleotídica de longitud completa que codifica los fragmentos de GSSP4 descritos en la Sección II de las Realizaciones Preferidas de la Invención. En un aspecto de esta realización, el polinucleótido comprende al menos 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150,

ES 2 312 594 T3

155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 25, 30, 35, 40, 345, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 390, 95, 400, 05, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 500, 05, 510, 515, 520, 25, 30, 35, 40, 545, 50, 55, 560, 65, 570, 75, 80, 85, 90, 95, 600, 605, 610, 15, 620, 25, 630, 635, 640, 645, 50, 655, 660, 665, 70, 75, 80, 85, 690, 95, 700, 705, 10, 15, 720, 25, 40, 70, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100 ó 2200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido de la presente invención.

Además de los tamaños de ácido nucleico preferidos indicados anteriormente, otros ácidos nucleicos preferidos comprenden al menos 18 nucleótidos, donde “al menos 18” se define como cualquier número entero comprendido entre 18 y el número entero correspondiente a la posición de nucleótido más 3’ del ADNc de un fragmento de GSSP4 en la presente memoria.

También se incluyen como polinucleótidos preferidos de la presente invención fragmentos de ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos de longitud, como se ha descrito anteriormente, que están especificados adicionalmente en términos de su posición 5’ y 3’. Las posiciones 5’ y 3’ se representan por los números de posición indicados en la lista de secuencias presentada más adelante. En el caso de las variantes alélicas y degeneradas y otras variantes, la posición 1 se define como el nucleótido más 5’ de la fase de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés), es decir, el nucleótido “A” del codón de iniciación (ATG), estando numerados los demás nucleótidos consecutivamente. Por lo tanto, cada combinación de una posición de nucleótido 5’ y 3’ que puede ocupar un fragmento polinucleotídico de la invención, con una longitud de al menos 18 nucleótidos contiguos, en un fragmento de polinucleótido GSSP4 de la presente invención se incluye en la invención como una especie individual. Los fragmentos polinucleótidos especificados por las posiciones 5’ y 3’ pueden preverse inmediatamente y, por lo tanto, no se indican individualmente para no alargar innecesariamente la memoria descriptiva.

Debe tenerse en cuenta que las especies anteriores de fragmentos polinucleotídicos de la presente invención pueden describirse alternativamente por la fórmula “x a y”; donde “x” equivale a la posición de nucleótido más 5’ e “y” equivale a la posición de nucleótido más 3’ del polinucleótido; y además donde “x” equivale a un número entero comprendido entre 1 y el número de nucleótidos de las secuencias polinucleotídicas de GSSP4 de la presente invención menos 18, y donde “y” equivale a un número entero comprendido entre 9 y el número de nucleótidos de las secuencias polinucleotídicas de GSSP4 de la presente invención; y donde “x” es un número entero menor que “y” en al menos 18. Todas las combinaciones de posiciones “x” e “y” se incluyen como realizaciones específicas de la invención. Además, la fórmula “x” a “y” puede modificarse como “x1-x2” a “y1-y2”, donde “x1-x2” e “y1-y2” representan intervalos de posiciones seleccionados entre dos posiciones de nucleótidos cualesquiera de la lista de secuencias. Otras fórmulas alternativas incluyen “x1-x2” a “y” y “x” a “y1-y2”.

Estas realizaciones específicas y otras realizaciones de fragmentos polinucleotídicos descritas en la presente memoria pueden modificarse para tener un tamaño “de al menos”, “igual a”, “igual o menor que”, “menor que”, “de al menos ___ pero no mayor de ___” o “de ___ a ___” un tamaño especificado o posiciones 5’ y/o 3’ especificadas.

La presente invención también proporciona la exclusión de cualquier especie de fragmento polinucleotídico de la presente invención especificado por posiciones 5’ y 3’ o polinucleótido especificado por tamaño de nucleótidos como se ha descrito anteriormente. Puede excluirse cualquier número de fragmentos especificados por posiciones 5’ y 3’ o por tamaño de nucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

Variantes

En otras realizaciones preferidas, se prevén variantes de polinucleótidos GSSP4 que codifican polipéptidos GSSP4. Las variantes de polinucleótidos, como se usa este término en la presente memoria, son polinucleótidos cuya secuencia difiere de un polinucleótido de referencia. Una variante de un polinucleótido puede ser una variante natural tal como una variante alélica natural, o puede ser una variante que no se considera natural. Estas variantes no naturales del polinucleótido pueden obtenerse por técnicas de mutagénesis, incluyendo las aplicadas a polinucleótidos, células u organismos. En general, las diferencias son limitadas, de manera que las secuencias de nucleótidos de la referencia y de la variante son muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas.

También se prevén específicamente variantes de polinucleótidos que comprenden una secuencia sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, codifican polipéptidos GSSP4 de la presente invención. También sería rutinario para un especialista en la técnica generar las variantes degeneradas descritas anteriormente, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (por ejemplo, cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos en células hospedadoras de otro mamífero o bacterianas).

Como se ha indicado anteriormente, las variantes de polinucleótidos pueden ser naturales, tales como una variante alélica natural, o pueden obtenerse por métodos recombinantes. Por “variante alélica” se entiende una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo (véase, por ejemplo, B. Lewin, (1990) *Genes IV*, Oxford University Press, New York). Las variantes no naturales se pueden producir usando técnicas de mutagénesis conocidas en este campo. Estas variantes de ácido nucleico incluyen las producidas por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar a uno o más nucleótidos. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de

ES 2 312 594 T3

aminoácidos conservativas o no conservativas. Entre éstas se prefieren especialmente las sustituciones, deleciones y adiciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de los polipéptidos GSSP4 de la invención. También se prefieren en relación con esto las sustituciones conservativas.

5 Los cambios de nucleótidos presentes en una variante de polinucleótido son preferiblemente silenciosos, lo cual significa que no alteran los aminoácidos codificados por el polinucleótido. Sin embargo, los cambios de nucleótidos también pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia.

10 En los casos en los que las sustituciones de nucleótidos ocasionan cambios en uno o más aminoácidos, los polipéptidos GSSP4 preferidos incluyen los que retienen una o más de las actividades relacionadas con el metabolismo descritas en la Sección I de las realizaciones Preferidas de la Invención.

15 Por “retienen las mismas actividades” se entiende que la actividad medida usando el polipéptido codificado por la variante de polinucleótido GSSP4 en ensayos es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, y no más de 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 110%, 115%, 120% o 125% de la actividad medida usando un polipéptido GSSP4 descrito en la Sección de Ejemplos en la presente memoria.

20 Por actividad “aumentada” se entiende que la actividad medida usando el polipéptido codificado por la variante de polinucleótido GSSP4 en ensayos es al menos 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 325%, 350%, 375%, 400%, 450% o 500% de la actividad medida usando un polipéptido GSSP4 descrito en la Sección de Ejemplos en la presente memoria.

25 Por actividad “disminuida” se entiende que la actividad medida usando el polipéptido codificado por la variante de polinucleótido GSSP4 en ensayos está reducida en al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50% con respecto a la actividad medida usando un polipéptido GSSP4 descrito en la Sección de Ejemplos en la presente memoria.

Porcentaje de identidad

30 La presente invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias con una identidad de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con las secuencias polinucleotídicas de la SEC ID N°: 1 ó 2 o fragmentos de las mismas que codifican un polipéptido con actividad relacionada con el metabolismo como se describe en la Sección I de las Realizaciones Preferidas de la Invención. Por supuesto, debido a la degeneración del código genético, un especialista habitual en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de las
35 moléculas de ácido nucleico con una identidad de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con las secuencias de ácido nucleico mostradas en la SEC ID N°:1 ó 2 o fragmentos de las mismas codificarán un polipéptido con actividad biológica. De hecho, como todas las variantes degeneradas de estas secuencias de nucleótidos codifican el mismo polipéptido, esto será evidente para el especialista en la técnica incluso sin realizar el ensayo de comparación descrito anteriormente. También se reconocerá en la técnica que, para las moléculas de ácido nucleico que
40 no son variantes degeneradas, un número razonable también codificarán un polipéptido con actividad biológica. Esto se debe a que el especialista en la técnica es completamente consciente de las sustituciones de aminoácidos con menos probabilidad o sin probabilidad de afectar significativamente a la función de la proteína (por ejemplo, el reemplazo de un aminoácido alifático por otro aminoácido alifático), como se ha descrito adicionalmente con anterioridad en la Sección I de las realizaciones Preferidas de la Invención.

45 Por un polinucleótido que tiene una “identidad” de secuencia de nucleótidos de al menos, por ejemplo, 95% con una secuencia de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia con la excepción de que la secuencia del polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido
50 GSSP4. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 95% con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia pueden deleccionarse, insertarse o sustituirse por otro nucleótido. La secuencia problema puede ser una secuencia entera o cualquier fragmento especificado como se describe en la presente memoria.

55 Los métodos para determinar y definir si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular tiene una identidad de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de nucleótidos de la presente invención se pueden llevar a cabo usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada un alineamiento de secuencia global, se puede determinar usando el programa
60 de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, ((1990) Comput Appl Biosci. Jul;6(3):237-45). En un alineamiento de secuencia, las secuencias problema y objeto son secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse convirtiendo primero las U en T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalización de Desacoplamiento=1, Penalización de Unión=30, Longitud de Grupo de Aleatorización=0, Puntuación Límite=1, Penalización de Hueco=5, Penalización de Tamaño de Hueco 0,05, Tamaño de Ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, lo que sea menor.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones 5' o 3', no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual en los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3' con respecto a la secuencia problema, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia problema que están en posición 5' y 3' con respecto a la secuencia objeto, que no están emparejadas/alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. Se determina si un nucleótido está emparejado/alineado por los resultados del alineamiento de secuencia de FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado por el anterior programa FASTDB usando los parámetros especificados, para lograr una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es lo que se usa para los propósitos de la presente invención. Para ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad sólo se calculan los nucleótidos fuera de los nucleótidos 5' y 3' de la secuencia objeto, como se representa por el programa FASTDB, que no están emparejados/alineados con la secuencia problema. No se realizan otras correcciones manuales para los propósitos de la presente invención.

15 *Fusiones*

También se incluyen en la presente invención polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención que están fusionados en fase a las secuencias codificantes de secuencias de aminoácidos heterólogas adicionales. También se incluyen en la presente invención ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la presente invención junto con otras secuencias no codificantes incluyendo, por ejemplo, sin limitación, secuencias no codificantes 5' y 3', secuencias de vectores, o secuencias usadas para la purificación, sondeo o cebado. Por ejemplo, las secuencias heterólogas incluyen secuencias transcritas no traducidas que pueden participar en la transcripción y procesamiento del ARNm, por ejemplo, unión a ribosomas y estabilidad del ARNm. Las secuencias heterólogas, como alternativa, pueden comprender secuencias codificantes adicionales que proporcionan funcionalidades adicionales. De esta manera, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido puede fusionarse a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en el vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, de los que muchos están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la hexa-histidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión (véase Gentz *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci USA Feb;86(3):821-4). El marcador "HA" es otro péptido útil para la purificación que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (véase Wilson *et al.*, (1984) Cell 37(3):767-78). Como se ha descrito anteriormente, otra de estas proteínas de fusión incluye ADNc del fragmento de GSSP4 fusionado a Fc en el extremo N o C.

35 III. *Vectores Recombinantes de la Invención*

El término "vector" se usa en la presente memoria para designar una molécula de ADN o ARN circular o linear, que es bicatenaria o monocatenaria, y que comprende al menos un polinucleótido de interés que se pretende transferir a una célula hospedadora o a un organismo hospedador unicelular o multicelular.

La presente invención se refiere a vectores recombinantes que comprenden uno cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente memoria.

La presente invención incluye una familia de vectores recombinantes que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos GSSP4 de la invención.

En una primera realización preferida, se usa un vector recombinante de la invención para amplificar el polinucleótido insertado en una célula hospedadora adecuada, amplificándose este polinucleótido cada vez que se replica el vector recombinante. El polinucleótido insertado puede ser uno que codifica polipéptidos GSSP4 de la invención.

Una segunda realización preferida de los vectores recombinantes de acuerdo con la invención consiste en vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos GSSP4 de la invención. Dentro de ciertas realizaciones, se emplean vectores de expresión para expresar un polipéptido GSSP4 de la invención, preferiblemente un fragmento de GSSP4 modificado descrito en la presente invención, que después puede purificarse y, por ejemplo, usarse como tratamiento de enfermedades metabólicas o simplemente para reducir la masa corporal de individuos.

La expresión requiere que en los vectores se proporcionen las señales apropiadas, incluyendo dichas señales diversos elementos reguladores tales como potenciadores/promotores tanto de fuentes virales como procedentes de mamífero, que dirigen la expresión de los genes de interés en las células hospedadoras. En los vectores de expresión de la invención generalmente se incluyen marcadores de selección de fármacos dominantes para establecer clones celulares permanentes y estables que expresan los productos, ya que son elementos que asocian la expresión de los marcadores de selección de fármacos con la expresión del polipéptido.

Más particularmente, la presente invención se refiere a vectores de expresión que incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido GSSP4 de la invención, o un fragmento de GSSP4 modificado como se describe en la presente memoria, o variantes o fragmentos de los mismos, bajo el control de una secuencia reguladora seleccionada entre polipéptidos GSSP4, o como alternativa bajo el control de una secuencia reguladora exógena.

ES 2 312 594 T3

Por consiguiente, los vectores de expresión preferidos de la invención se seleccionan entre el grupo consistente en:
(a) una secuencia reguladora de fragmentos de GSSP4 y que dirige la expresión de un polinucleótido codificante unido operativamente al mismo; y (b) una secuencia codificante de un fragmento de GSSP4 de la invención, unida operativamente a secuencias reguladoras que permiten su expresión en una célula hospedadora y/u organismo hospedador adecuado.

Algunos de los elementos que pueden encontrarse en los vectores de la presente invención se describen con más detalle en las siguientes secciones.

1) Características generales de los vectores de expresión de la invención

Un vector recombinante de acuerdo con la invención comprende, pero sin limitación, un YAC (cromosoma artificial de levadura, por sus siglas en inglés), un BAC (cromosoma artificial bacteriano, por sus siglas en inglés), un fago, un fagémido, un cósmido, un plásmido o incluso una molécula de ADN lineal que puede consistir en un ADN cromosómico, no cromosómico, semisintético o sintético. Dicho vector recombinante puede comprender una unidad transcripcional que comprende un conjunto de:

(1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión de genes, por ejemplo promotores o potenciadores. Los potenciadores son elementos de actuación en cis de ADN, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb de longitud que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción;

(2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y finalmente se traduce en un polipéptido, estando unida dicha secuencia estructural o codificante a los elementos reguladores descritos en (1); y

(3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción. Las unidades estructurales destinadas al uso en sistemas de expresión de levadura o eucariotas preferiblemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. Como alternativa, cuando una proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un resto N-terminal. Este resto después puede escindirse o no de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación, marcadores de selección que permiten la transformación de la célula hospedadora y un promotor derivado de un gen de alta expresión para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con secuencias de inicio y terminación de la traducción, y preferiblemente una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o el medio extracelular. En una realización específica donde el vector está adaptado para transferir y expresar secuencias deseadas en células hospedadoras de mamífero, los vectores preferidos comprenderán un origen de replicación en el hospedador deseado, un promotor y potenciador adecuado y también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, sitio de poliadenilación, sitio donador de aceptor de corte y empalme, secuencias terminadoras de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo el origen, promotor temprano, potenciador, sitios de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

2) Elementos reguladores

Promotores

Las regiones promotoras adecuadas usadas en los vectores de expresión de la presente invención se eligen teniendo en cuenta la célula hospedadora en la que se expresa en gen heterólogo. El promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés no se considera importante, siempre que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. De esta manera, cuando el objetivo es una célula humana, es preferible poner la región codificante del ácido nucleico adyacente y bajo el control de un promotor que pueda expresarse en una célula humana tal como, por ejemplo, un promotor humano o viral.

Un promotor adecuado puede ser heterólogo con respecto al ácido nucleico para el que controla la expresión o, como alternativa, puede ser endógeno para el polinucleótido nativo que contiene la secuencia codificante a expresar. Además, el promotor generalmente es heterólogo con respecto a las secuencias de vector recombinante dentro de las cuales se ha insertado la secuencia promotora/codificante de la construcción.

Las regiones promotoras pueden seleccionarse entre cualquier gen deseado usando, por ejemplo, vectores CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) y, más preferiblemente vectores pKK232-8 y pCM7. Son promotores bacterianos preferidos los promotores Lad, LacZ, los promotores de la ARN polimerasa del bacteriófago T3 o T7, los promotores gpt, lambda PR, PL y trp (documento EP 0036776), el promotor de la polihedrina, o el promotor de la proteína p10 de baculovirus (Kit Novagen) (Smith *et al.*, (1983) Mol Cell Biol Dec; 3(12):2156-65; O'Reilly *et al.*, (1992), el promotor lambda PR o también el promotor trc.

Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los LTR de retrovirus y la metalotioneína-L de ratón. Además,

pueden elegirse promotores específicos para un tipo celular particular, tales como los que facilitan la expresión en tejido adiposo, tejido muscular o hígado. La selección de un vector y promotor conveniente está bien dentro de la capacidad de un especialista habitual en la técnica.

5 La elección de un promotor está bien dentro de la capacidad de un especialista en el campo de la ingeniería genética. Por ejemplo, se puede hacer referencia a Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3 (1989), o también a los procedimientos descritos por Fuller *et al.* (1996) *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*.

10 *Otros elementos reguladores*

15 Cuando se emplea un inserto de ADNc, típicamente se deseará incluir una señal de poliadenilación para lograr una poliadenilación apropiada del transcrito del gen. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica con éxito de la invención y puede emplearse cualquier secuencia de este tipo, tal como las señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana y de SV40. También se contempla como un elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para aumentar los niveles de mensajero y minimizar la lectura de otras secuencias desde el casete.

20 3) *Marcadores de selección*

25 Estos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permitiría la fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Los genes marcadores de selección para la selección de células hospedadoras transformadas son, preferiblemente, la dihidrofolato reductasa o la resistencia a neomicina para cultivos de células eucariotas, TRP1 para *S. cerevisiae* o resistencia a tetraciclina, rifampicina o ampicilina en *E. coli*, o levano sacarasa para micobacterias, siendo este último marcador un marcador de selección negativo.

30 4) *Vectores preferidos*

Vectores bacterianos

35 Como un ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso en bacterias pueden comprender un marcador de selección y un origen de replicación bacteriano procedente de plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos de pBR322 (ATCC 37017). Dichos vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suecia), y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, Estados Unidos).

40 Se conocen gran cantidad de otros vectores adecuados por los especialistas en la técnica y están disponibles en el mercado, tal como los siguientes vectores bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene); pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia); pQE-30 (QIAexpress).

Vectores de baculovirus

45 Un vector adecuado para la expresión de polipéptidos de la invención es un vector de baculovirus que puede propagarse en células de insecto y en líneas de células de insecto. Un sistema de vector hospedador adecuado específico es el vector de transferencia de baculovirus pVL1392/1393 (Pharmlingen) que se usa para transfectar la línea celular SF9 (ATCC N°CRL 1711) que procede de *Spodoptera frugiperda*.

50 Otros vectores adecuados para la expresión de polipéptidos GSSP4 en un sistema de expresión de baculovirus incluyen los descritos en Chai *et al.* (1993. *Biotechnol Appl Biochem. Dic.*;18 (Pt 3):259-73); Vlasak *et al.* (1983. *Eur J Biochem Sep* 1;135(l):123-6); y Lenhard *et al.* (1996; *Gene*, 9 Mar; 169(2):187-90).

Vectores virales

55 En una realización específica, el vector procede de un adenovirus. Son vectores de adenovirus preferidos de acuerdo con la invención los descritos por Feldman y Steg (1996; *Semin Interv Cardiol Sep*; 1 (3):203-8) o Ohno *et al.* (1994; *Science*, 5 Agosto; 265 (5173): 781-4). Otro adenovirus recombinante preferido de acuerdo con esta realización específica de la presente invención es el adenovirus humano de tipo 2 o 5 (Ad 2 o Ad 5) o un adenovirus de origen animal (solicitud de patente francesa N° FR-93.05954).

60 Generalmente, se entiende que los vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados son sistemas de administración de genes recombinantes de elección para la transferencia de polinucleótidos exógenos *in vivo*, particularmente a mamíferos, incluyendo seres humanos. Estos vectores proporcionan una administración eficaz de genes en células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del hospedador.

65 Los retrovirus particularmente preferidos para la preparación o construcción de vehículos retrovirales de administración de genes *in vitro* o *in vivo* de la presente invención incluyen retrovirus seleccionados del grupo constituido por virus inductores de focos en células del visón, virus del sarcoma murino, virus de la reticuloendoteliosis y virus

del sarcoma de Rous. Los virus de la leucemia murina particularmente preferidos incluyen los virus 4070A y 1504A, Abelson (ATCC N° VR-999), Friend (ATCC N° VR-245), Gross (ATCC N° VR-590), Rauscher (ATCC N° VR-998) y el virus de la leucemia murina de Moloney (ATCC N° VR-190; Solicitud PCT N° WO 94/24298). Los virus del sarcoma de Rous particularmente preferidos incluyen el de Bryan de alto título (ATCC N° VR-334, VR-657, VR-726, VR-659 y VR-728). Otros vectores retrovirales preferidos son los que se describen en Roth *et al.* (1996), Solicitud PCT N° WO 93/25234, Solicitud PCT N° WO 94/ 06920, Roux *et al.*, ((1989) Proc Natl Acad Sci U S A Dic; 86 (23): 9079-83), Man *et al.*, (1992) J. Gen. Virol. 3: 3251-3255 y Neda *et al.*, ((1991) J Biol Chem 5 agosto; 266 (22): 14143-6).

Otro sistema de vector viral más que se contempla en la invención consiste en el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un herpesvirus, como un virus auxiliar para una replicación eficaz y un ciclo vital productivo (Muzyczka *et al.*, (1992) Curr Top Microbiol Immunol; 158: 97-129). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no estén en división y presenta una alta frecuencia de integración estable (Flotte *et al.*, (1992) Am J Respir Cell Mol Biol Sep; 7 (3): 349-56; Samulski *et al.*, (1989) J Virol Sep; 63 (9): 3822-S; McLaughlin *et al.*, (1989) Am. J. Hum. Genet. 59:561-569). Una característica ventajosa de los AAV proviene de su reducida eficacia para transducir células primarias con respecto a células transformadas.

5) Administración de vectores recombinantes

Para lograr la expresión de los polinucleótidos de la invención, estas construcciones deben administrarse a una célula. Esta administración puede realizarse *in vitro*, como en los procedimientos de laboratorio para transformar líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de ciertas patologías.

Un mecanismo es la infección viral, en la que la construcción de expresión está encapsulada en una partícula viral infecciosa.

También se contemplan en la presente invención varios métodos no virales para la transferencia de polinucleótidos en células de mamífero cultivadas, e incluyen, sin limitación, precipitación con fosfato cálcico (Graham *et al.*, (1973) Virology, Aug; 54 (2): 536-9; Chen *et al.*, (1987) Mol Cell Biol, Aug; 7 (8): 2745-52), DEAE-dextrano (Gopal, (1985) Mol Cell Biol, May; 5 (5): 1188-90), electroporación (Tur-Kaspa *et al.*, (1986) Mol Cell Biol, Feb; 6 (2): 716-8; Potter *et al.*, (1984) Proc Natl Acad Sci USA, Nov.; 81 (22): 7161-5.), microinyección directa (Harland *et al.*, (1985) J Cell Biol, Sep.; 101 (3): 1094-9), liposomas cargados con ADN (Nicolau *et al.*, (1982) Biochim Biophys Acta, Oct 11; 721 (2): 185-90; Fraley *et al.*, (1979) Proc Natl Acad Sci USA M; 76 (7): 3348-52) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, (1987) J Biol Chem Apr 5; 262 (10): 4429-32; Wu y Wu (1988) Biochemistry, Feb 9; 27 (3): 887-92). Algunas de estas técnicas pueden adaptarse con éxito para el uso *in vivo* o *ex vivo*.

Una vez que el polinucleótido de expresión se ha administrado a la célula, puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula receptora. Esta integración puede ser en la localización y orientación afín mediante recombinación homóloga (reemplazo génico) o puede integrarse en una localización inespecífica aleatoria (aumento génico). En otras realizaciones más, el ácido nucleico puede mantenerse de forma estable en la célula como un segmento de ADN episomal separado. Dichos segmentos de ácidos nucleicos o "episomas" codifican las secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de o en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora.

Una realización específica para un método para administrar una proteína o péptido en el interior de una célula de un vertebrado *in vivo* comprende la etapa de introducir una preparación que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y un polinucleótido desnudo que codifique operativamente el polipéptido de interés en el espacio intersticial de un tejido que comprende la célula, por el cual el polinucleótido desnudo se capta hacia el interior de la célula y tiene un efecto fisiológico. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro* pero puede aplicarse también *in vivo*.

Se describen composiciones para usar *in vitro* e *in vivo* que comprenden un polinucleótido "desnudo" en la solicitud PCT N° WO 90/11092 (Vical Inc.) y también en la solicitud PCT N° WO 95/11307 (Institut Pasteur, INSERM, Universidad de Ottawa), así como en los artículos de Tascon *et al.* (1996) Nature Medicine. 2 (8): 888-892 y de Huygen *et al.* ((1996) Nat Med, Aug 2; 2 (8): 893-8).

En otra realización más de la invención, la transferencia de un polinucleótido desnudo de la invención, incluyendo una construcción polinucleotídica de la invención, al interior de células, puede realizarse con un bombardeo de partículas (biolística), siendo dichas partículas microproyectiles recubiertos de ADN acelerados hasta una velocidad elevada, que permite que perforan las membranas celulares y entren en las células sin destruirlas, tal como se describe en Klein *et al.* ((1990) Curr Genet Feb; 17 (2): 97-103).

En una realización más, el polinucleótido de la invención puede encerrarse en un liposoma (Ghosh y Bacchawat, (1991) Targeted Diagn Ther;4: 87-103; Wong *et al.*, (1980) Gene 10: 87-94; Nicolau *et al.*, (1987) Methods Enzymol.; 149:157-76). Estos liposomas pueden dirigirse además a células que expresen LSR mediante la incorporación de lecitina, triglicéridos, ACRP30 u otros ligandos de LSR conocidos en la membrana del liposoma.

ES 2 312 594 T3

En una realización específica, la invención proporciona una composición para la producción *in vivo* de un polipéptido GSSP4 descrito en la presente memoria. Comprende un polinucleótido desnudo que codifica operativamente este polipéptido, en solución en un vehículo fisiológicamente aceptable y adecuado para la introducción en un tejido para provocar que las células del tejido expresen dicho polipéptido.

La cantidad de vector que se inyecta en el organismo hospedador deseado varía de acuerdo con el lugar de inyección. Como una dosis indicativa, se inyectarán entre 0,1 y 100 μg del vector en el cuerpo de un animal, preferiblemente en el cuerpo de un mamífero, por ejemplo, el cuerpo de un ratón.

En otra realización del vector de acuerdo con la invención, puede producirse *in vitro* en una célula hospedadora, preferiblemente en una célula hospedadora recogida previamente del animal que se va a tratar y, más preferiblemente, una célula somática tal como una célula muscular. En una etapa posterior, la célula que se ha transformado con el vector que codifica los polipéptidos GSSP4 deseados o el fragmento deseado de los mismos se reintroduce en el cuerpo del animal para administrar la proteína recombinante dentro del cuerpo por vía local o sistémica.

IV. Células recombinantes

En la presente memoria se describen células hospedadoras recombinantes, por ejemplo, que se han transformado o transfectado con uno de los polinucleótidos descritos en la presente memoria y, más en concreto, con un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido GSSP4 de la invención, tal como cualquiera de los que se describen en la sección "Polinucleótidos de la invención". Estos polinucleótidos pueden estar presentes en células como resultado de una transfección estable o transitoria. Las células hospedadoras pueden transformarse (células procariotas) o transfectarse (células eucariotas) con un vector recombinante tal como uno cualquiera de los que se describen en la sección "Vectores recombinantes de la invención".

Generalmente, una célula hospedadora recombinante comprende al menos uno de los polinucleótidos o de los vectores recombinantes que se describen en la presente memoria.

Son células hospedadoras preferidas usadas como receptoras de vectores recombinantes las siguientes:

a) Células hospedadoras procariotas: cepas de *Escherichia coli* (por ejemplo, cepa DH5- α), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y cepas de especies como *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y

b) Células hospedadoras eucariotas: células HeLa (ATCC N^oCCL2; N^oCCL2.1; N^oCCL2.2), células Cv 1 (ATCC N^oCCL70), células COS (ATCC N^oCRL1650; N^oCRL1651), células Sf-9 (ATCC N^oCRL1711), células C127 (ATCC N^o CRL-1804), 3T3 (ATCC N^o CRL-6361), CHO (ATCC N^o CCL-61), de riñón humano 293 (ATCC N^o 45504; N^o CRL-1573), BHK (ECACC W 84100501; N^o 84111301), células PLC, HepG2 y Hep3B.

Las construcciones en las células hospedadoras pueden usarse de una forma convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante.

Después de la transformación de un hospedador adecuado y del cultivo del hospedador a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce por medios apropiados, tal como cambio de temperatura o inducción química, y las células se cultivan durante un periodo adicional.

Típicamente, las células se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se conserva para una purificación adicional.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación y descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisis celular. Dichos métodos son bien conocidos por los especialistas.

Además, estas células recombinantes pueden generarse *in vitro* o *in vivo* en un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente seleccionado del grupo constituido por ratones, ratas, perros, cerdos, ovejas, vacas y primates, sin incluir seres humanos. Posteriormente, las células recombinantes generadas *in vitro* también pueden implantarse quirúrgicamente, por ejemplo, en un animal. Son bien conocidos en la técnica métodos para generar células recombinantes *in vivo* en animales.

En la presente memoria se describen células hospedadoras homológamente recombinantes primarias, secundarias e inmortalizadas procedentes de vertebrados, preferiblemente procedentes de mamíferos y, particularmente, de origen humano, que se han obtenido por ingeniería genética para: a) insertar polinucleótidos exógenos (heterólogos) en el ADN cromosómico endógeno de un gen de dirección, b) delecionar un ADN cromosómico endógeno, y/o c) reemplazar un ADN cromosómico endógeno con polinucleótidos exógenos. Las inserciones, delecciones y/o reemplazos de secuencias polinucleotídicas pueden realizarse en las secuencias codificantes del gen de dirección y/o en regiones reguladoras tales como secuencias promotoras y potenciadoras, asociadas de manera funcional con el gen de dirección.

En la presente memoria se describe un método de preparación de una célula hospedadora homológamente recombinante *in vitro* o *in vivo*, donde se altera la expresión de un gen de dirección que normalmente no se expresa en la

ES 2 312 594 T3

célula. Preferiblemente la alteración provoca la expresión del gen de dirección en condiciones de cultivo normales o en condiciones adecuadas para producir el polipéptido codificado por el gen de dirección. El método comprende las etapas de: (a) transfectar la célula *in vitro* o *in vivo* con una construcción polinucleotídica, comprendiendo la construcción polinucleotídica; (i) una secuencia de dirección; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificante; y (iii) un sitio donante de corte y empalme no emparejado, si es necesario, produciéndose de este modo una célula transfectada; y (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga.

Se describe además un método de alteración de la expresión de un gen de dirección en una célula *in vitro* o *in vivo* donde el gen no se expresa normalmente en la célula, que comprende las etapas de: (a) transfectar la célula *in vitro* o *in vivo* con una construcción polinucleotídica, comprendiendo la construcción polinucleotídica; (i) una secuencia de dirección; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificante; y (iii) un sitio donante de corte y empalme no emparejado, si es necesario, produciéndose de este modo una célula transfectada; y (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga, produciéndose de este modo una célula homológamente recombinante; y (c) mantener la célula homológamente recombinante *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la expresión del gen.

En la presente memoria se describe un método de preparación de un polipéptido de la presente invención por alteración de la expresión de un gen de dirección endógeno en una célula *in vitro* o *in vivo*, donde el gen no se expresa normalmente en la célula, que comprende las etapas de: a) transfectar la célula *in vitro* con una construcción polinucleotídica, comprendiendo la construcción polinucleotídica; (i) una secuencia de dirección; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificante; y (iii) un sitio donante de corte y empalme no emparejado, si es necesario, produciéndose de este modo una célula transfectada; (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga, produciéndose de este modo una célula homológamente recombinante; y c) mantener la célula homológamente recombinante *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la expresión del gen, generando de este modo el polipéptido.

Se describe además una construcción polinucleotídica que altera la expresión de un gen de dirección en un tipo celular en el que el gen no se expresa normalmente. Esto se produce cuando se inserta una construcción polinucleotídica en el ADN cromosómico de la célula de dirección, donde la construcción polinucleotídica comprende: a) una secuencia de dirección; b) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificante; y c) un sitio donante de corte y empalme no emparejado, si es necesario. Se incluyen además construcciones polinucleotídicas, como se han descrito anteriormente, donde la construcción comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido y está en fase con el gen endógeno de dirección después de la recombinación homóloga con ADN cromosómico.

Las composiciones pueden producirse, y los métodos realizarse, mediante técnicas conocidas en este campo, tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos N°: 6.054.288; 6.048.729; 6.048.724; 6.048.524; 5.994.127; 5.968.502; 5.965.125; 5.869.239; 5.817.789; 5.783.385; 5.733.761; 5.641.670; 5.580.734; Publicaciones Internacionales N°: WO96/29411, WO 94/12650; y artículos científicos descritos por Koller *et al.*, (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 10:705-730; cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad).

En la expresión de GSSP4 en mamíferos y, típicamente, seres humanos, las células pueden volverse defectuosas o, como alternativa, pueden mejorarse, con la inserción de una secuencia genómica o de ADNc de GSSP4, con el reemplazo del homólogo del gen de GSSP4 en el genoma de una célula animal por un polinucleótido GSSP4. Estas alteraciones genéticas pueden generarse mediante acontecimientos de recombinación homóloga usando construcciones de ADN específicas que se han descrito anteriormente.

Una clase de células hospedadoras que pueden usarse son cigotos de mamíferos, tales como cigotos murinos. Por ejemplo, pueden someterse cigotos murinos a microinyección con una molécula de ADN de interés purificada, por ejemplo, una molécula de ADN purificada que se haya ajustado previamente a un intervalo de concentración de 1 ng/ml -para insertos de BAC- 3 ng/ μ l -para insertos de bacteriófago P1 - en Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, EDTA 250 μ M que contiene NaCl 100 mM, espermina 30 μ M y espermidina 70 μ M. Cuando el ADN que se va a microinyectar tiene un gran tamaño, pueden usarse poliaminas y elevadas concentraciones de sal para evitar la rotura mecánica de este DNA, como se describe en Schedl *et al* ((1993) *Nature*, Mar 18; 362 (6417): 258-61).

Cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente memoria, incluyendo las construcciones de ADN descritas en la presente memoria, pueden introducirse en una línea de células madre (ES) embrionarias no humanas, preferiblemente una línea de células ES de ratón. Las líneas de células ES proceden de células no comprometidas pluripotentes de la masa celular interna de los blastocistos anteriores a la implantación. Son líneas de células ES preferidas las siguientes: ES-E14TG2a (ATCC N°CRL-1821), ES-D3 (ATCC N°CRL1934 y N° CRL-11632), YS001 (ATCC N° CRL-11776), 36.5 (ATCC N° CRL-11116). Para mantener las células ES en un estado no comprometido, se cultivan en presencia de células alimentadoras de crecimiento inhibido que proporcionan las señales apropiadas para conservar este fenotipo embrionario y servir como una matriz para la adherencia de las células ES. Son células alimentadoras preferidas fibroblastos embrionarios primarios que se establecen a partir de tejidos de embriones del día 13 al día 14 de prácticamente cualquier cepa de ratón, que se mantienen en cultivo, como se describe en Abbondanzo *et al.* (1993) *Methods Enzymol*; 225: 803-23) y cuyo crecimiento se inhibe por irradiación, como se describe en Robertson ((1987) *Embryo-derived stem cell lines*. En: EJ. Robertson Ed. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. IRL Press, Oxford), o mediante la presencia de una concentración inhibidora de LEF, como describen Pease y Williams (1990; *Exp Cell Res.* Oct;190(2):209-11).

ES 2 312 594 T3

Las construcciones en las células hospedadoras pueden usarse de una forma convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante.

Después de la transformación de un hospedador adecuado y del cultivo del hospedador a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce por medios apropiados, tal como cambio de temperatura o inducción química, y las células se cultivan durante un periodo adicional. Típicamente, las células se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se conserva para una purificación adicional. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación y descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisis celular. Dichos métodos son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

V. Animales transgénicos

La presente invención también proporciona métodos y composiciones para la generación de animales no humanos y plantas que expresan polipéptidos GSSP4 recombinantes, es decir, fragmentos de GSSP4 recombinantes o polipéptidos GSSP4 de longitud completa. Los animales o plantas pueden ser transgénicos, es decir, cada una de sus células contiene un gen que codifica un polipéptido GSSP4, o, como alternativa, puede introducirse un polinucleótido que codifica un polipéptido GSSP4 en células somáticas del animal o planta, por ejemplo, en células epiteliales secretoras mamarias de un mamífero. En realizaciones preferidas, el animal no humano es un mamífero, tal como una vaca, oveja, cabra, cerdo o conejo.

Los métodos para obtener animales transgénicos, tales como mamíferos, son bien conocidos por los especialistas en la técnica, y cualquiera de estos métodos puede usarse en la presente invención. En resumen, pueden producirse mamíferos transgénicos, por ejemplo, transfecando una célula madre pluripotente, tal como una célula ES con un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés. Después, las células ES transformadas satisfactoriamente pueden introducirse en un embrión en las primeras fases de desarrollo, que después se implanta en el útero de un mamífero de la misma especie. En ciertos casos, las células transformadas ("transgénicas") comprenderán parte de la línea germinal del animal resultante, y animales adultos que comprenden las células transgénicas en la línea germinal después pueden emparejarse con otros animales, con lo que finalmente se obtiene una población de animales transgénicos que tienen el transgén en cada una de sus células y que pueden transmitir de manera estable el transgén a cada descendiente. Pueden usarse otros métodos para introducir el polinucleótido, por ejemplo, introduciendo el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en un huevo fertilizado o en un embrión en sus primeras fases de desarrollo por microinyección. Como alternativa, el transgén puede introducirse en un animal por infección de cigotos con un retrovirus que contiene el transgén (Jaenisch, R. (1976) Proc. Nad. Acad. Sci. USA 73,1260-1264). Se describen métodos para obtener mamíferos transgénicos, por ejemplo, en Wall *et al.* (1992) J Cell Biochem 1992 Jun;49(2):113-20; Hogan, *et al.* (1986) en Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; en el documento WO 91/08216, o en la Patente de Estados Unidos N° 4.736.866.

En un método preferido, los polinucleótidos se microinyectan en el oocito fertilizado. Típicamente, los oocitos fertilizados se microinyectan usando técnicas convencionales y después se cultivan *in vitro* hasta que se obtiene un "embrión en fase de preimplantación". Estos embriones en fase de preimplantación preferiblemente contienen de aproximadamente 16 a 150 células. Se describen métodos para cultivar oocitos fertilizados hasta la fase de preimplantación, por ejemplo, por Gordon *et al.* ((1984) Methods in Enzymology, 101,414); Hogan *et al.* ((1986) en Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y) (para el embrión de ratón); Hammer *et al.* ((1985) Nature, 315, 680) (para embriones de conejo y porcinos); Gandolfi *et al.* ((1987) J. Reprod. Fert. 81,23-28); Rexroad *et al.* ((1988) J. Anim. Sci. 66,947-953) (para embriones ovinos); y Eyes-tone *et al.* ((1989) J. Reprod. Fert. 85, 715-720); Camous *et al.* ((1984) J. Reprod. Fert. 72,779-785); y Heyman *et al.* ((1987) Theriogenology 27, 5968) (para embriones bovinos); incorporándose en la presente memoria en su totalidad la descripción de cada una de dichas referencias. Los embriones en fase de preimplantación después se transfieren a una hembra apropiada por métodos convencionales para permitir el nacimiento de un animal transgénico o quimérico, dependiendo de la fase de desarrollo cuando se introduce el transgén.

Como la frecuencia de incorporación del transgén a menudo es baja, a menudo es deseable la detección de la integración de transgén en los embriones en fase de preimplantación usando cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Puede usarse cualquiera de varios métodos para detectar la presencia de un transgén en un embrión en fase de preimplantación. Por ejemplo, pueden retirarse una o más células del embrión en fase de preimplantación y puede detectarse la presencia o ausencia del transgén en la célula o células extraídas usando cualquier método convencional, por ejemplo, PCR. Como alternativa, la presencia de un transgén puede detectarse en el útero o después del parto usando métodos convencionales.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, se generan mamíferos transgénicos que secretan polipéptidos GSSP4 recombinantes en su leche. Como la glándula mamaria es un órgano productor de proteínas muy eficaz, dichos métodos pueden usarse para producir concentraciones de proteínas en el intervalo de gramos por litro y a menudo significativamente mayores. Preferiblemente, la expresión en la glándula mamaria se consigue uniéndose operativamente el polinucleótido que codifica el polipéptido GSSP4 a un promotor específico de glándula mamaria y, opcionalmente, a otros elementos reguladores. Los promotores adecuados y otros elementos incluyen, pero sin limitación, los derivados de WAP corto y largo de mamífero, alfa, beta y kappa caseína, alfa y beta lactoglobulina, genes beta-CN 5', así como el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Estos promotores y otros

elementos pueden obtenerse a partir de cualquier mamífero incluyendo, pero sin limitación, vacas, cabras, ovejas, cerdos, ratones, conejos y cobayas. Se proporcionan promotores y otras secuencias reguladoras, vectores y otras enseñanzas relevantes, por ejemplo, por Clark (1998) *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:337-50; Jost *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol* 17:160-4; Patentes de Estados Unidos N° 5.994.616; 6.140.552; 6.013.857; Sohn *et al.* (1999) *DNA Cell Biol.* 18:845-52; Kim *et al.* (1999) *J. Biochem. (Japón)* 126:320-5; Soulier *et al.* (1999) *Euro. J. Biochem.* 260:533-9; Zhang *et al.* (1997) *Chin. J. Biotech.* 13:271-6; Rijnkels *et al.* (1998) *Transgen. Res.* 7:5-14; Korhonen *et al.* (1997) *Euro. J. Biochem.* 245:482-9; Uusi-Oukari *et al.* (1997) *Transgen. Res.* 6:75-84; Hitchin *et al.* (1996) *Prot. Expr. Purif.* 7:247-52; Platenburg *et al.* (1994) *Transgen. Res.* 3:99-108; Heng-Cherl *et al.* (1993) *Animal Biotech.* 4:89-107; y Christa *et al.* (2000) *Euro. J. Biochem.* 267:1665-71; cuyas descripciones enteras se incorporan en la presente memoria como referencia.

En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden producirse por la leche introduciendo polinucleótidos que codifican los polipéptidos en células somáticas de la glándula mamaria *in vivo*, por ejemplo, células epiteliales secretoras mamarias. Por ejemplo, puede infundirse ADN plasmídico a través del canal del pezón, por ejemplo, en asociación con DEAE-dextrano (véase, por ejemplo, Hens *et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1523:161-171), en asociación con un ligando que puede llevar a endocitosis mediada por receptores de la construcción (véase, por ejemplo, Sobolev *et al.* (1998) 273:7928-33), o en un vector viral tal como un vector retroviral, por ejemplo, el virus de la leucemia de gibón (véase, por ejemplo, Archer *et al.* (1994) *PNAS* 91:6840-6844). En cualquiera de estas realizaciones, el polinucleótido puede unirse de manera funcional a un promotor específico de glándula mamaria, como se ha descrito anteriormente, o como alternativa, a cualquier promotor de expresión fuerte tal como CMV o MoMLV LTR.

La idoneidad de cualquier vector, promotor, elemento regulador, etc. para uso en la presente invención puede evaluarse de antemano por transfección de células tales como células epiteliales mamarias, por ejemplo, células MacT (células epiteliales mamarias bovinas) o células GME (células epiteliales mamarias de cabra), *in vitro* y evaluando la eficacia de la transfección y expresión del transgén en las células.

Para la administración *in vivo*, los polinucleótidos pueden administrarse en cualquier formulación adecuada, en cualquiera de un intervalo de concentraciones (por ejemplo, 1-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), en cualquier volumen (por ejemplo, 1-100 ml, preferiblemente 1 a 20 ml), y pueden administrarse cualquier número de veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 5 ó 10 veces), a cualquier frecuencia (por ejemplo, cada 1, 2, 3, 5, 10, o cualquier número de días). Las concentraciones, frecuencias, modos de administración, etc. adecuados dependerán del polinucleótido, vector, animal, etc., particular y pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica.

En una realización preferida, se usa un vector retroviral tal como el virus de la leucemia de gibón, como se describe en Archer *et al.* ((1994) *PNAS* 91:6840-6844). Como la infección retroviral típicamente requiere división celular, puede estimularse la división celular en la glándula mamaria junto con la administración del vector, por ejemplo, usando un factor tal como benzoato de estradiol, progesterona, reserpina o dexametasona. Además, la infección retroviral y otros métodos de infección pueden facilitarse usando compuestos auxiliares tales como polibreno.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para obtener polipéptidos GSSP4 a partir de la leche, la cantidad de leche obtenida y, por lo tanto, la cantidad de polipéptidos GSSP4 producidos, puede aumentarse usando cualquier método convencional de inducción de la lactación, por ejemplo, usando hexestrol, estrógenos y/o progesterona.

Los polinucleótidos usados en estas realizaciones pueden codificar un polipéptido GSSP4 de longitud completa o un fragmento de GSSP4. Típicamente, el polipéptido codificado incluirá una secuencia señal para asegurar la secreción de la proteína en la leche. Cuando se usa una secuencia de GSSP4 de longitud completa, la proteína de longitud completa puede aislarse, por ejemplo, a partir de la leche y escindirse *in vitro* usando una proteasa adecuada. Como alternativa, puede introducirse un segundo polinucleótido que codifica proteasa en el animal o en las células de la glándula mamaria, con lo que la expresión de la proteasa da como resultado la escisión del polipéptido GSSP4 *in vivo*, con lo que se permite el aislamiento directo de fragmentos de GSSP4 de la leche.

VI. Composiciones Farmacéuticas o Fisiológicamente Aceptables de la Invención

Los polipéptidos GSSP4 de la invención pueden administrarse a animales no humanos y/o a seres humanos, solos o en composiciones farmacéuticas o fisiológicamente aceptables en las que se mezclan con vehículos o excipientes adecuados. Después, la composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable se proporciona a una dosis terapéuticamente eficaz. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un polipéptido GSSP4 suficiente para dar como resultado la prevención o mejora de los síntomas o el estado fisiológico de enfermedades o trastornos relacionados con el metabolismo que se determina por los métodos descritos en la presente memoria. Una dosis terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de un polipéptido GSSP4 necesaria para producir una reducción del peso o para prevenir un aumento en la velocidad de aumento de peso en personas que desean este efecto por razones cosméticas. Una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido GSSP4 de la invención es la dosis que es adecuada para potenciar la pérdida de peso o el aumento de peso con un uso o administración periódica continuada. Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de polipéptidos GSSP4 en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA última edición.

Otras enfermedades o trastornos en cuyo tratamiento pueden usarse los polipéptidos GSSP4 de la invención incluyen, pero sin limitación, obesidad y enfermedades o trastornos relacionados con el metabolismo tales como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente y diabetes de tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes de tipo II a tratar por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares y lesiones renales. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. Otros trastornos relacionados con el metabolismo a tratar por los compuestos de la invención incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Los polipéptidos GSSP4 también pueden usarse para potenciar la función física durante el trabajo o el ejercicio o para potenciar un sentimiento de bienestar general. Las actividades de función física incluyen andar, correr, saltar, levantar peso y/o escalar.

Los polipéptidos GSSP4 o antagonistas de los mismos también pueden usarse para tratar la dislexia, trastorno de déficit de atención (ADD), trastorno de déficit de atención/hiperactividad (ADHD) y trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia mediante la modulación del metabolismo de ácidos grasos, más específicamente, la producción de ciertos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Se considera expresamente que los polipéptidos GSSP4 de la invención pueden proporcionarse solos o en combinación con otros compuestos farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Actualmente se conocen bien en la técnica otros compuestos útiles para el tratamiento de la obesidad y otras enfermedades y trastornos.

En una realización preferida, los polipéptidos GSSP4 son útiles para, y se usan en, el tratamiento de la resistencia a la insulina usando métodos descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. Más particularmente, una realización preferida se refiere a un proceso para la modificación y regulación terapéutica del metabolismo de la glucosa en un sujeto animal o humano, que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento (como alternativa, en una base temporizada diaria) un polipéptido GSSP4 (o polinucleótido que codifica dicho polipéptido) en una cantidad de dosificación y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los niveles plasmáticos de glucosa en dicho sujeto animal o humano.

Otras realizaciones preferidas se refieren a métodos para la profilaxis o tratamiento de la diabetes que comprenden administrar a un sujeto que necesita tratamiento (como alternativa en una base temporizada diaria) un polipéptido GSSP4 (o polinucleótido que codifica dicho polipéptido) en una cantidad de dosificación y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los niveles plasmáticos de glucosa en dicho sujeto animal o humano.

Vías de Administración

Las vías de administración adecuadas incluyen administración oral, nasal, rectal, transmucosa o intestinal, liberación parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, intrapulmonares (inhaladas) o intraoculares usando métodos conocidos en la técnica. Un método particularmente útil para administrar los compuestos para potenciar la pérdida de peso implica la implantación quirúrgica, por ejemplo en la cavidad abdominal del receptor, de un dispositivo para liberar los polipéptidos GSSP4 durante un periodo de tiempo prolongado. Otras vías de administración particularmente preferidas son formulaciones de aerosol y de depósito. Se contemplan expresamente formulaciones de liberación sostenida, particularmente de depósito, de los medicamentos de la presente invención.

Composición/Formulación

Las composiciones y medicamentos farmacéutica o fisiológicamente aceptables para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares. Una formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Algunos de los medicamentos descritos en la presente memoria incluirán un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable y al menos un polipéptido que es un polipéptido GSSP4 de la invención. Para inyección, los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico, tal como un tampón fosfato o bicarbonato. Para administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para que la barrera sea permeable. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica.

Las preparaciones farmacéutica o fisiológicamente aceptables que pueden tomarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas cerradas herméticamente preparadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas, tales como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

ES 2 312 594 T3

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convencionalmente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor gaseoso adecuado, por ejemplo, dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para liberar una cantidad predeterminada. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse de manera que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o por infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéutica o fisiológicamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener además estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos, y que permitan la preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo o liofilizado para la constitución con un vehículo adecuado, tal como agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Además, los compuestos pueden liberarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Dependiendo de su naturaleza química, las cápsulas de liberación sostenida pueden liberar los compuestos durante un periodo de unas semanas a más de 100 días.

Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas o fisiológicamente aceptables también pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o de gel adecuados. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

45 *Dosificación Eficaz*

Las composiciones farmacéutica o fisiológicamente aceptables adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin para el que están destinadas. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo o aliviar los síntomas existentes del sujeto sometido a tratamiento. La determinación de las cantidades eficaces está bien dentro de la capacidad de los especialistas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo de células. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes que incluye o comprende un punto o intervalo de concentraciones que, según se ha demostrado, aumenta la captación o unión de leptina o lipoproteína en un sistema *in vitro*. Esta información puede usarse para determinar de manera más segura las dosis útiles en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto que tiene como resultado la mejoría de los síntomas en un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de estos compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para 50% de la población de ensayo) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre la DL50 y la DE50. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

ES 2 312 594 T3

Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo de células y estudios animales pueden usarse para la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de estos compuestos preferiblemente está dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50, con toxicidad pequeña o nula. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden elegirse por el médico individual teniendo en consideración el estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch. 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del compuesto activo que sean suficientes para mantener o prevenir una pérdida o aumento de peso, dependiendo de la situación particular. Las dosificaciones necesarias para conseguir estos efectos dependerán de las características individuales y de la vía de administración.

Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor de la concentración mínima eficaz. Los compuestos deben administrarse usando un régimen que mantenga niveles plasmáticos por encima de la concentración mínima eficaz durante 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90%; y más preferiblemente entre 50-90%. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

La cantidad de composición administrada, por supuesto, dependerá del sujeto a tratar, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, de la manera de administración y criterio del médico a cargo del caso.

Un intervalo de dosificación preferido para la cantidad de polipéptido GSSP4 de la invención, que puede administrarse en una base regular diaria para conseguir los resultados deseados, incluyendo una reducción en los niveles de lipoproteínas ricas en triglicéridos en plasma circulante, varía de 0,01-0,5 mg/kg de masa corporal. Un intervalo de dosificación más preferido es de 0,05-0,1 mg/kg. Por supuesto, estas dosificaciones diarias pueden liberarse o administrarse en pequeñas cantidades periódicamente durante el transcurso del día. Debe tenerse en cuenta que estos intervalos de dosificación son sólo intervalos preferidos y no se pretende que sean limitantes de la invención.

VII. Métodos de Tratamiento

La invención se refiere, entre otras cosas, a métodos para prevenir o tratar enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo, que comprenden proporcionar a un individuo que necesita dicho tratamiento un polipéptido GSSP4 de la invención. Preferiblemente, el polipéptido GSSP4 tiene actividad relacionada con el metabolismo *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, el polipéptido GSSP4 se proporciona al individuo en una composición farmacéutica que preferiblemente se toma por vía oral. Preferiblemente, el individuo es un mamífero, y más preferiblemente es un ser humano. En realizaciones preferidas, la enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones muy preferidas, se usan polipéptidos GSSP4 en composiciones farmacéuticas para modular el peso corporal en individuos sanos por razones cosméticas.

La invención también se refiere a un método para prevenir o tratar enfermedades y trastornos relacionados con el metabolismo, que comprende proporcionar a un individuo que necesita dicho tratamiento un compuesto identificado por ensayos de la invención (descritos en la Sección VI de las Realizaciones Preferidas de la Invención y en los Ejemplos). Preferiblemente, estos compuestos antagonizan o agonizan los efectos de los polipéptidos GSSP4 en las células *in vitro*, músculos *ex vivo*, o en modelos animales. Como alternativa, estos compuestos agonizan o antagonizan los efectos de los polipéptidos GSSP4 sobre el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los ácidos grasos o el metabolismo de los lípidos. Preferiblemente, el compuesto se proporciona al individuo en una composición farmacéutica que preferiblemente se toma por vía oral. Preferiblemente, el individuo es un mamífero, y más preferiblemente es un ser humano. En realizaciones preferidas, la enfermedad o trastorno relacionado con el metabolismo se selecciona entre el grupo consistente en obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, enfermedad cardíaca, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, diabetes de tipo II), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, diabetes de tipo I), complicaciones relacionadas con la diabetes (tales como elevación de los cuerpos cetónicos), microangiopatía, retinopatía, lesiones oculares, neuropatía, nefropatía, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y lesiones microangiopáticas, así como síndromes tales como acantosis nigricans, leprechaunismo y lipoatrofia a tratar por los métodos de la invención. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria y elevación de la presión sanguínea. En realizaciones muy preferidas, las composiciones farmacéuticas se usan para modular los niveles de glucosa. En realizaciones muy preferidas, las composiciones farmacéuticas se usan para modular el peso corporal por razones cosméticas.

En otra realización preferida, los pacientes NIDDM a menudo se tratan con secretagogos de insulina orales, tales como fumarato de 1,1-dimetil-2-(2-morfolinofenil)guanidina (BTS67582) o sulfonilureas incluyendo tolbutamida, tolazamida, clorpropamida, glibendamida, glimepirida, glipizida y glidazida, o con agentes de sensibilización a la insulina incluyendo metformina, ciglitazona, troglitazona y pioglitazona. Otro uso de la presente invención es en la terapia de pacientes NIDDM para mejorar su peso y control de glucosa, que comprende una composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto en combinación con un secretagogo de insulina oral o un agente de sensibilización a la insulina. Preferiblemente, el secretagogo de insulina oral es fumarato de 1,1-dimetil-2-(2-morfolinofenil)guanidina (BTS67582) o una sulfonilurea seleccionada entre tolbutamida, tolazamida, clorpropamida, glibendamida, glimepirida, glipizida y glidazida. Preferiblemente, el agente de sensibilización a la insulina se selecciona entre metformina, ciglitazona, troglitazona y pioglitazona.

La presente invención también proporciona un método para mejorar el peso y control de glucosa de pacientes NIDDM, que comprende la administración de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto solos, sin un secretagogo de insulina oral o un agente de sensibilización a la insulina. En otra realización preferida, la presente invención puede administrarse concomitante o conjuntamente con el secretagogo de insulina oral o el agente de sensibilización a la insulina, por ejemplo, en forma de unidades de dosificación separadas a usar simultáneamente, por separado o secuencialmente (antes o después del secretagogo o antes o después del agente de sensibilización). Por consiguiente, la presente invención también proporciona un producto que contiene una composición de dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o polinucleótidos descritos en el segundo aspecto y un secretagogo de insulina oral o agente de sensibilización a la insulina como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para mejorar el peso y el control de la glucosa en pacientes NIDDM. La relación entre la composición de la presente invención y el secretagogo de insulina oral o agente de sensibilización a la insulina es tal que la cantidad de cada ingrediente activo empleado será una que proporcione un nivel terapéuticamente eficaz, pero no mayor que la cantidad recomendada como segura para la administración.

La acción de reducir la resistencia a la insulina por la presente invención indica que los compuestos de esta invención pueden ser útiles en la fabricación de un medicamento que puede usarse como sensibilizador a la insulina. Por consiguiente, la presente invención proporciona además el uso en la fabricación de un medicamento que es un sensibilizador a la insulina.

En otras realizaciones, algunos pacientes a los que se les ha diagnosticado diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, Tipo I) también pueden mostrar resistencia a la insulina en cierta medida. Por lo tanto, puede ser beneficioso tratar a estos pacientes con dicha composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable descrita en el quinto aspecto o con polinucleótidos descritos en el segundo aspecto para reducir su resistencia a la insulina. Esto significaría que estos pacientes necesitarían una menor dosificación de insulina para mantener un control similar o mejor de su diabetes, ya que la dosis de insulina está asociada con una mayor eficacia de reducción de la glucosa sanguínea. Esta terapia proporcionaría efectos beneficiosos a largo plazo en términos de la reducción de los efectos perjudiciales que pueden producirse por una dosificación elevada prolongada del tratamiento con insulina. Además, algunos pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, Tipo II) también se tratan con insulina y tienen resistencia a la insulina. Por consiguiente, la presente invención proporciona además un método, y el uso del mismo en la fabricación de un medicamento para reducir la cantidad de insulina que necesita diariamente un ser humano que tiene NIDDM. La presente invención también proporciona un método, y el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para la profilaxis de los efectos perjudiciales a largo plazo producidos por una dosificación elevada prolongada de insulina en seres humanos que tienen IDDM.

Una consecuencia de la resistencia es la elevación de las concentraciones de glucosa. Esto, a su vez, ocasiona un aumento en la liberación de insulina. La hiperinsulinemia, tanto en ayunas como en situación posprandial, es un signo característico de la resistencia a la insulina. La hiperinsulinemia también se produce por estimulación de la gluconeogénesis. Ciertos estudios epidemiológicos han demostrado que la hiperinsulinemia es un factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad en enfermedades cardiovasculares (Smith U. (1994) *Am. J. Clin. Nutr.* 59, suppl. 686S). Por consiguiente, la invención también proporciona agentes terapéuticos y métodos para reducir o prevenir la hipersecreción de insulina y trastornos o afecciones debidas a esta hipersecreción.

La NIDDM está asociada con diversas complicaciones. Como se define en la presente memoria, "complicaciones de la NIDDM" se refiere a complicaciones cardiovasculares o varias de las alteraciones metabólicas y circulatorias que están asociadas con la hiperglucemia, por ejemplo, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y/o hiperproinsulinemia, retraso de liberación de insulina, dislipidemia, retinopatía, neuropatía periférica, hipertensión y otras enfermedades de las arterias coronarias (CAD). La CAD es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con NIDDM. De esta manera, al proporcionar agentes terapéuticos y métodos para reducir los niveles de glucosa, la invención proporciona agentes terapéuticos y métodos para tratar o prevenir la NIDDM y sus consecuencias.

La invención también proporciona agentes terapéuticos y métodos para tratar y prevenir una alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT). El significado habitual de alteración de la tolerancia a la glucosa es que es una afección asociada con la resistencia a la insulina que es intermedia entre franca, NIDDM y una tolerancia a la glucosa normal (NGT). Se sabe que un alto porcentaje de la población IGT progresa a NIDDM en relación con las personas con una tolerancia a la glucosa normal (Sad, *et al.*, *New Engl. J. Med.* 1988; 319:1500-6). De esta manera, al proporcionar

agentes terapéuticos y métodos para reducir o prevenir la IGT, es decir, para normalizar la resistencia a la insulina, puede retrasarse o prevenirse la progresión hasta NIDDM.

La IGT se diagnostica por un procedimiento en el que se determina que la respuesta de una persona afectada a la glucosa posprandial es anómala según se evalúa por los niveles de glucosa plasmática posprandiales de 2 horas. En este ensayo, se administra una cantidad medida de glucosa al paciente y se miden los niveles de glucosa sanguínea a intervalos regulares, normalmente cada media hora durante las dos primeras horas y cada hora posteriormente. En un individuo "normal" o sin IGT, los niveles de glucosa se elevan durante las dos primeras horas hasta un nivel menor de 140 mg/dl y después se reducen rápidamente. En un individuo con IGT, los niveles de glucosa sanguínea son mayores y el nivel de reducción tiene una menor velocidad.

La resistencia a la captación de glucosa estimulada por la insulina en individuos que no se vuelven francamente hiperglucémicos, sin embargo, aumenta la probabilidad de que estos individuos desarrollen otras numerosas enfermedades. En particular, un intento de compensar la resistencia a la insulina pone en marcha una serie de acontecimientos que juegan un papel importante en el desarrollo tanto de la hipertensión como de la enfermedad cardíaca coronaria (CAD), tal como la enfermedad vascular aterosclerótica prematura. Este grupo de anomalías se denomina comúnmente "Síndrome Metabólico", o "Síndrome de Resistencia a la Insulina" o "síndrome X". También se ha notificado que están asociadas con la resistencia a la insulina las concentraciones plasmáticas elevadas de triglicéridos y las concentraciones plasmáticas reducidas de colesterol-HDL, condiciones que se sabe que están asociadas con la CAD. De esta manera, al proporcionar agentes terapéuticos y métodos para reducir o prevenir la resistencia a la insulina, la invención proporciona métodos para reducir y/o prevenir la aparición del síndrome de resistencia a la insulina.

Otras enfermedades están asociadas con la resistencia a la insulina y, de esta manera, pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos de la invención. Por ejemplo, la obesidad, que es el resultado de un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto de energía, está muy relacionada con la resistencia a la insulina y la diabetes (Hotamisligil, Spiegelman *et al.*, Science, 1993,259:87-91). En los seres humanos la obesidad puede definirse como un peso corporal que excede en 20% el peso corporal deseado para individuos del mismo sexo, altura y estructura (Slans, L. B., in *Endocrinology & Metabolism*, 2d Ed., McGraw-Hill, New York 1987, páginas 1203-1244; véase también, R. H. Williams, *Textbook of Endocrinology*, 1974, páginas 904-916). En otros animales (o también en seres humanos) la obesidad puede determinarse por patrones de peso corporal correlacionados con los perfiles de prolactina dado que miembros de una especie que son jóvenes, delgados y "sanos" (es decir, sin ningún trastorno ni trastorno metabólico) tienen perfiles plasmáticos diarios de niveles de prolactina que siguen un patrón regular que es muy reproducible con una pequeña desviación típica. La obesidad, o el exceso de depósitos de grasa, se correlaciona y puede desencadenar el inicio de diversos trastornos metabólicos, por ejemplo, hipertensión, diabetes de tipo II (NIDDM), aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, etc. Incluso en ausencia de obesidad clínica (de acuerdo con la definición anterior) la reducción de los almacenes de grasa corporal (notablemente los almacenes de grasa visceral) en el hombre, especialmente en una base a largo plazo o permanente, tendría un efecto beneficioso significativo, tanto cosmética como fisiológicamente. De esta manera, por medio de la prevención o tratamiento de la obesidad, los métodos de la invención permitirán a un individuo tener una vida más cómoda y evitar el inicio de diversas enfermedades inducidas por la obesidad.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene el síndrome de ovario poliquístico (PCOS). PCOS se encuentra entre los trastornos más comunes de las mujeres premenopáusicas, afectando a 5-10% de esta población. Es un síndrome de etiología desconocida caracterizado por hiperandrogenismo, anovulación crónica, defectos en la acción de la insulina, secreción de la insulina, esteroidogénesis ovárica y fibrinólisis. Las mujeres con PCOS a menudo presentan resistencia a la insulina y tienen un mayor riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa o NIDDM en la tercera o cuarta décadas de vida (Dunaif *et al. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3299). El hiperandrogenismo también es una característica de una diversidad de estados de resistencia a la insulina, desde el síndrome de tipo A, a través del leprechaunismo y la diabetes lipoatrófica, hasta el síndrome de tipo B, cuando estas afecciones aparecen en mujeres premenopáusicas. Se ha sugerido que la hiperinsulinemia *per se* produce hiperandrogenismo. Se ha demostrado que los agentes de sensibilización a la insulina, por ejemplo, troglitazona, son eficaces en PCOS y que, en particular, se mejoran los defectos en la acción de la insulina, secreción de insulina, esteroidogénesis ovárica y fibrinólisis (Ehrman *et al. J. Clin. Invest.* 100:1230), tales como en seres humanos resistentes a la insulina. Por consiguiente, la invención proporciona métodos para reducir la resistencia a la insulina y normalizar la glucosa sanguínea para tratar y/o prevenir de esta manera PCOS.

La resistencia a la insulina también está asociada con frecuencia con infecciones y cánceres. De esta manera, la prevención o reducción de la resistencia a la insulina de acuerdo con los métodos de la invención puede prevenir o reducir infecciones y cánceres.

La resistencia a la insulina puede diagnosticarse por varios métodos, tales como por el ensayo de tolerancia a la glucosa intravenosa o por la medición del nivel de insulina en ayunas. Es bien conocido que hay una excelente correlación entre la altura del nivel de insulina en ayunas y el grado de resistencia a la insulina. Por lo tanto, se podrían usar los niveles elevados de insulina en ayunas como un marcador sustituto para la resistencia a la insulina con el fin de identificar a los individuos con tolerancia a la glucosa normal (NGT) que tienen resistencia a la insulina. Otra forma de hacer esto es seguir la estrategia descrita en The New England Journal of Medicine, N° 3, páginas 1188 (1995), es decir, seleccionar sujetos obesos como un criterio inicial para la entrada en el grupo de tratamiento. Algunos sujetos obesos tienen alterada la tolerancia a la glucosa (IGT) mientras que otros tienen una tolerancia a la glucosa normal (NGT). Como esencialmente todos los sujetos obesos son resistentes a la insulina, es decir, incluso los sujetos obesos

ES 2 312 594 T3

NGT son resistentes a la insulina, tienen hiperinsulinemia en ayunas. Por lo tanto, la diana del tratamiento de acuerdo con la presente invención puede definirse como individuos NGT que son obesos o que tienen hiperinsulinemia en ayunas, o que tienen ambas cosas.

5 La resistencia a la insulina también puede diagnosticarse por el ensayo de pinza de glucosa euglucémica. Este ensayo implica la administración simultánea de una infusión constante de insulina y una infusión de velocidad variable de glucosa. Durante este ensayo, que dura 3-4 horas, la concentración plasmática de glucosa se mantiene constante a niveles euglucémicos midiendo el nivel de glucosa cada 5-10 minutos y después ajustando la infusión de glucosa de velocidad variable para mantener el nivel plasmático de glucosa sin cambios. En estas circunstancias, la velocidad de entrada de glucosa en la corriente sanguínea es igual a la velocidad global de eliminación de glucosa en el cuerpo. La diferencia entre la velocidad de eliminación de glucosa en el estado basal (sin infusión de insulina) y el estado con infusión de insulina representa la captación de glucosa mediada por insulina. En individuos normales, la insulina provoca un aumento brusco y prolongado en la eliminación global de glucosa en el cuerpo, mientras que en sujetos NIDDM, este efecto de la insulina está debilitado en gran medida y sólo es 20-30% del normal. En sujetos resistentes a la insulina con IGT o NGT, la velocidad de eliminación de glucosa estimulada por insulina está aproximadamente en la mitad del camino entre los sujetos normales y NIDDM. Por ejemplo, a una concentración plasmática de insulina en estado estacionario de aproximadamente 100 uU/ml (un nivel fisiológico), la velocidad de eliminación de glucosa en sujetos normales es de aproximadamente 7 mg/kg/min. En sujetos NIDDM, es de aproximadamente 2,5 mg/kg/min., y en pacientes con IGT (o sujetos resistentes a la insulina con NGT) es de aproximadamente 4-5 mg/kg/min. Éste es un ensayo preciso y muy reproducible y puede distinguir pacientes dentro de estas categorías. También se sabe que según se van volviendo los sujetos más resistentes a la insulina, se eleva el nivel de insulina en ayunas. Hay una excelente correlación positiva entre la altura del nivel de insulina en ayunas y la magnitud de la resistencia a la insulina medida por los ensayos de pinza de la glucosa euglucémica y, por lo tanto, esto proporciona el fundamento para usar los niveles de insulina en ayunas como medida sustituta de la resistencia a la insulina.

25 De esta manera, puede usarse cualquiera de los ensayos descritos anteriormente u otros ensayos conocidos en la técnica para determinar que un sujeto es resistente a la insulina, pudiendo tratarse dicho paciente de acuerdo con los métodos de la invención para reducir o curar la resistencia a la insulina. Como alternativa, los métodos de la invención también pueden usarse para prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina en un sujeto, por ejemplo, los que se sabe que tienen un mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina.

Más generalmente, la presente invención se refiere al tratamiento con polipéptidos GSSP4, cuando se demuestra que un individuo tiene un genotipo particular para el marcador GSSP4. El tratamiento comprende proporcionar polipéptidos GSSP4 farmacéuticamente aceptables al individuo. La cantidad exacta de polipéptido GSSP4 proporcionada se determinará por medio de ensayos clínicos bajo la pauta de médicos cualificados, pero sería de esperar que estuviera en el intervalo de 5-7 mg por individuo y por día. En general, un intervalo preferido sería de 0,5 a 14 mg por individuo y por día, siendo un intervalo muy preferido el comprendido entre 1 y 10 mg por individuo y por día. Los individuos que podrían beneficiarse del tratamiento con polipéptidos GSSP4 pueden identificarse por genotipificación.

40 *Genotipificación de GSSP4*

Los métodos de tratamiento usando genotipificación para identificar individuos que se beneficiarían de los tratamientos de la invención se basan en el descubrimiento de que se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en GSSP4 que demuestran una asociación en adolescentes obesos con los niveles de ácidos grasos libres (FFA) y del cociente respiratorio, otros que demuestran una asociación con la relación entre IMC y leptina, y otros que demuestran una asociación con los niveles de glucosa. Además, una combinación de SNP de GSSP4 asociados con el metabolismo de FFA y leptina también puede predecir las personas que tendrán un sobrepeso grave.

En resumen, el término “genotipo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la identidad de los alelos presentes en un individuo o en una muestra. El término “genotipificación” de una muestra o un individuo en relación con un marcador bialélico consiste en determinar el alelo específico o el nucleótido específico que lleva un individuo en un marcador bialélico. Los marcadores bialélicos generalmente consisten en un polimorfismo en una posición de una sola base. Por lo tanto, cada marcador bialélico corresponde a dos formas de una secuencia polinucleotídica que, cuando se comparan entre sí, presentan una modificación de nucleótido en una posición. Normalmente, la modificación de nucleótido implica la sustitución de un nucleótido por otro, opcionalmente el alelo original o alternativo de los marcadores bialélicos descritos en la SEC ID N°:1. Opcionalmente puede especificarse que está presente el alelo original o el alelo alternativo de estos marcadores bialélicos. Los polinucleótidos preferidos pueden consistir, consistir esencialmente o comprender, un tramo contiguo de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo de la posición de alelo alternativo indicada en la SEC ID N°:1 así como secuencias que son complementarias a dicho tramo. El “tramo contiguo” puede tener una longitud de al menos 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 250, 500 ó 1000 nucleótidos, en la medida en que un tramo contiguo de estas longitudes sea coherente con las longitudes de la secuencia de identificación particular.

Los métodos de genotipificación comprenden determinar la identidad de un nucleótido en el sitio del marcador bialélico de GSSP4 por cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente se usa microsecuenciación. El genotipo se usa para determinar si un individuo debe tratarse con polipéptidos GSSP4. De esta manera, estos métodos de genotipificación se realizan en muestras de ácido nucleico derivadas de un solo individuo. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y se describen con detalle en las solicitudes mencionadas más adelante brevemente.

ES 2 312 594 T3

Para identificar el nucleótido presente en un sitio de marcador bialélico puede usarse cualquier método conocido en la técnica. Como el alelo de marcador bialélico a detectar se ha identificado y especificado en la presente invención, la detección resultará sencilla para un especialista en la técnica empleando cualquiera de varias técnicas. Muchos métodos de genotipificación requieren la amplificación previa de la región de ADN que lleva el marcador bialélico de interés. Aunque en el momento actual a menudo se prefiere la amplificación de la diana o señal, los presentes métodos de genotipificación también incluyen métodos de detección ultrasensibles que no requieren amplificación.

Los métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica que pueden usarse para detectar polimorfismos bialélicos incluyen métodos tales como el análisis por transferencia puntual convencional, análisis de polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP; Orita *et al.* (1989) Proc Natl Acad Sci USA Apr;86(8):2766-70), electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización (DGGE), análisis de heterodúplex, detección de escisión de desacoplamiento y otras técnicas convencionales tales como las descritas en Sheffield *et al.* (1991; Am J Hum Genet Oct;49(4):699-706); White *et al.* (1992), Grompe *et al.* ((1989) Proc Natl Acad Sci USA Aug;86(15):5888-92; (1993) Nat Genet. Oct;5(2):III-7). Otro método para determinar la identidad del nucleótido presente en un sitio polimórfico particular emplea un derivado de nucleótido resistente a exonucleasa especializado como se describe en la patente de Estados Unidos 4.656.127.

Los métodos preferidos implican determinar directamente la identidad del nucleótido presente en un sitio de marcador bialélico por un ensayo de secuenciación, ensayo de amplificación con especificidad de alelo o ensayo de hibridación. A continuación se proporciona una descripción de algunos métodos preferidos. Un método muy preferido es la técnica de microsecuenciación. El término "secuenciación" se usa en la presente memoria para hacer referencia a la extensión por la polimerasa de complejos de doble cadena de cebador/plantilla e incluye tanto la secuenciación tradicional como la microsecuenciación. Los marcadores bialélicos preferidos, como se muestran en la SEC ID N°:1 y los 47meros correspondientes como se muestran en las SEC ID N°:4-18, incluyen, pero sin limitación:

- 1 Marcador bialélico 1: posición base 148, alelos alternos A/G
- 2 Marcador bialélico 2: posición base 2551, alelos alternos G/A
- 3 Marcador bialélico 3: posición base 4417, alelos alternos A/C
- 4 Marcador bialélico 4: posición base 6322, alelos alternos A/G (cambio de aminoácido de isoleucina a valina)
- 5 Marcador bialélico 7: posición base 816, alelos alternos G/A
- 6 Marcador bialélico 8: posición base 924, alelos alternos G/A
- 7 Marcador bialélico 9: posición base 1206, alelos alternos C/A
- 8 Marcador bialélico 10: posición base 1851, alelos alternos T/C
- 9 Marcador bialélico 11: posición base 3124, alelos alternos C/T
- 10 Marcador bialélico 12: posición base 3563, alelos alternos G/A
- 11 Marcador bialélico 13: posición base 3792, alelos alternos G/A
- 12 Marcador bialélico 14: posición base 5757, alelos alternos C/T

1) Ensayos de secuenciación

El nucleótido presente en un sitio polimórfico puede determinarse por métodos de secuenciación. En una realización preferida, se someten muestras de ADN a amplificación por PCR antes de la secuenciación usando cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, el ADN amplificado se somete a reacciones de secuenciación con terminador didesoxi automático usando un protocolo de secuenciación de ciclo de colorante-cebador. El análisis de la secuencia permite la identificación de la base presente en el sitio del marcador bialélico.

2) Ensayos de macrosecuenciación

En los métodos de microsecuenciación, el nucleótido en un sitio polimórfico en un ADN diana se detecta por una reacción de extensión de cebador de un solo nucleótido. Este método implica cebadores de microsecuenciación apropiados que hibridan justo cadena arriba de la base polimórfica de interés en el ácido nucleico diana. Se usa una polimerasa para extender específicamente el extremo 3' del cebador con un solo ddNTP (terminador de la cadena) complementario al nucleótido en el sitio polimórfico. Después se determina la identidad del nucleótido incorporado de cualquier manera adecuada. Se describen cebadores de microsecuenciación preferidos en la SEC ID N°: 1.

Típicamente, las reacciones de microsecuenciación se realizan usando ddNTP fluorescentes y los cebadores de microsecuenciación extendidos se analizan por electroforesis en máquinas de secuenciación ABI 377 para determinar la identidad del nucleótido incorporado como se describe en el documento EP 412 883. Como alternativa, puede usarse electroforesis capilar para procesar un gran número de ensayos simultáneamente.

Pueden usarse diferentes estrategias para el marcaje y detección de ddNTP. Se ha descrito un método de detección de fases homogéneas basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia por Chen y Kwok ((1997) *Nucleic Acids Res.* Jan 15;25(2):347-53) y Chen *et al.* ((1997) *Proc Natl Acad Sci USA* Sep 30;94(20): 10756-61). En este método, se incuban fragmentos de ADN genómico amplificados que contienen sitios polimórficos con un cebador marcado con fluoresceína en el extremo 5' en presencia de didesoxirribonucleósido trifosfatos marcados con colorante alélicos y una Taq polimerasa modificada. El cebador marcado con colorante se extiende una base por el colorante-terminador específico para el alelo presente en la plantilla. Al final de la reacción de genotipificación, se analizan directamente las intensidades de fluorescencia de los dos colorantes en la mezcla de reacción sin separación o purificación. Todas estas etapas pueden realizarse en el mismo tubo y los cambios de fluorescencia pueden controlarse a tiempo real. Como alternativa, el cebador extendido puede analizarse por Espectrometría de masas MALDI-TOF. La base en el sitio polimórfico se identifica por la masa añadida sobre el cebador de microsecuenciación (véase Haff y Smirnov, (1997) *Nucleic Acids Res.* Sep 15;25(18):3749-50; (1997) *Genome Res.* Apr;7(4):378-88).

La microsecuenciación puede conseguirse por el método de microsecuenciación establecido o por modificaciones o derivados de dicho método. Los métodos alternativos incluyen varias técnicas de microsecuenciación en fase sólida. El protocolo básico de microsecuenciación es el mismo que se ha descrito anteriormente, con la excepción de que el método se realiza como un ensayo de fase heterogénea, en el que el cebador o la molécula diana se inmoviliza o captura en un soporte sólido. Para simplificar la separación del cebador y el análisis de adición de nucleótido terminal, se unen oligonucleótidos a soportes sólidos o se modifican de tal manera que se permite la separación por afinidad así como extensiones por la polimerasa. Los extremos 5' y los nucleótidos internos de los oligonucleótidos sintéticos pueden modificarse de varias formas diferentes para permitir diferentes estrategias de separación de afinidad, por ejemplo, biotinylation. Si se usa un solo grupo de afinidad sobre los oligonucleótidos, los oligonucleótidos pueden separarse del reactivo terminador incorporado. Esto elimina la necesidad de separación física o por tamaños. Más de un oligonucleótido pueden separarse del reactivo terminador y analizarse simultáneamente si se usa más de un grupo de afinidad. Esto permite el análisis de varias especies de ácido nucleico o más información sobre la secuencia de ácido nucleico por reacción de extensión. No es necesario que el grupo de afinidad esté en el oligonucleótido de cebado, sino que puede estar presente, como alternativa, en la plantilla.

Por ejemplo, la inmovilización puede realizarse a través de una interacción entre el ADN biotinilado y pocillos de microtitulación recubiertos con estreptavidina o partículas de poliestireno recubiertas con avidina. De la misma manera, pueden unirse oligonucleótidos o plantillas a un soporte sólido en un formato de alta densidad. En estas reacciones de microsecuenciación en fase sólida, los ddNTP incorporados pueden estar radiomarcados (Sylvänen, (1994) *Clin Chim Acta.* May;226(2):225-36) o unidos a fluoresceína (Livak y Hainer, (1994) *Hum Mutat.*;3(4):379-85). La detección de los ddNTP radiomarcados puede conseguirse por técnicas basadas en centelleo. La detección de ddNTP unidos a fluoresceína puede basarse en la unión de anticuerpo anti fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina, seguido de incubación con un sustrato cromogénico (tal como fosfato de *p*-nitrofenilo).

Otros posibles pares de indicador-detección incluyen: ddNTP unido a dinitrofenilo (DNP) y conjugado anti-DNP fosfatasa alcalina (Harju *et al.*, (1993) *Clin Chem.* Nov;39(11 Pt 1):2282-7) o ddNTP biotinilado y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante con *o*-fenilendiamina como sustrato (documento WO 92/15712). Como otro procedimiento de microsecuenciación en fase sólida alternativo, Nyren *et al.* ((1993) *Anal Biochem.* Jan;208(1):171-5) describieron un método basado en la detección de actividad ADN polimerasa por un ensayo de detección de pirofosfato inorgánico luminométrico enzimático (ELIDA).

Pastinen *et al.* ((1997) *Genome Res.* Jun;7(6):606-14) describen un método para la detección múltiple de un polimorfismo de un solo nucleótido en el que se aplica el principio de minisequenciación en fase sólida a un formato de matriz de oligonucleótidos. Más adelante se describen con más detalle matrices de alta densidad de sondas de ADN unidas a un soporte sólido (chips de DNA).

Se apreciará que puede usarse cualquier cebador que tenga un extremo 3' inmediatamente adyacente al nucleótido polimórfico. De manera similar, se apreciará que puede realizarse un análisis de microsecuenciación para cualquier marcador bialélico o cualquier combinación de marcadores bialélicos de la presente invención.

3) Métodos de Ensayo de Amplificación con Especificidad de Alelo

La discriminación entre los dos alelos de un marcador bialélico también puede conseguirse por amplificación específica de alelos, una estrategia selectiva por la que uno de los alelos se amplifica sin, o a una velocidad mucho mayor que, la amplificación del otro alelo. Esto se consigue situando la base polimórfica en el extremo 3' de uno de los cebadores de amplificación. Debido a las formas de extensión desde el extremo 3' del cebador, una no coincidencia en o cerca de esta posición tiene un efecto inhibitorio sobre la amplificación. Por lo tanto, en condiciones de amplificación apropiadas, estos cebadores sólo dirigen la amplificación en su alelo complementario. La determinación de la localización precisa de la no coincidencia y de las condiciones de ensayo correspondientes está dentro del conocimiento del especialista en la técnica.

ES 2 312 594 T3

El “Ensayo de Ligamiento a Oligonucleótidos” (OLA) usa dos oligonucleótidos que se diseñan de manera que sean capaces de hibridarse a secuencias contiguas de una sola cadena de las moléculas diana. Uno de los oligonucleótidos se biotinila, y el otro se marca de forma detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en una molécula diana, los oligonucleótidos hibridarán de tal forma que sus extremos estén contiguos, y se creará un sustrato de ligamiento que puede capturararse o detectarse. El OLA puede detectar polimorfismos de un solo nucleótido y puede combinarse ventajosamente con PCR como se describe por Nickerson *et al.* ((1990) Proc Natl Acad Sci USA Nov; 87 (22): 8923-7). En este método, se usa PCR para conseguir la amplificación exponencial del ADN diana, que después se detecta usando OLA.

Otros métodos de amplificación que son particularmente adecuados para la detección de polimorfismo de un solo nucleótido incluyen LCR (reacción en cadena de la ligasa) y Gap LCR (GLCR). LCR usa dos pares de sondas para amplificar exponencialmente una diana específica. Las secuencias de cada pareja de oligonucleótidos se seleccionan de manera que permitan al par hibridarse con las secuencias contiguas de la misma cadena de la diana. Dicha hibridación forma un sustrato para una ligasa dependiente de plantilla. De acuerdo con la presente invención, la LCR puede realizarse con oligonucleótidos que tienen las secuencias proximal y distal de la misma cadena de un sitio del marcador bialélico.

En una realización, el oligonucleótido se diseñará de forma que incluya el sitio del marcador bialélico. En dicha realización, las condiciones de reacción se seleccionan para que los oligonucleótidos puedan ligarse juntos sólo si la molécula diana contiene o carece del nucleótido específico que es complementario al marcador bialélico del oligonucleótido.

En una realización alternativa, los oligonucleótidos no incluirán el marcador bialélico, de tal forma que cuando se hibriden con la molécula diana, se cree un “hueco” como se describe en el documento WO 90/01069. Después, este hueco se “carga” con dNTP complementarios (como los mediados por ADN polimerasa), o por un par adicional de oligonucleótidos. Por lo tanto, al final de cada ciclo, cada cadena individual tiene un complemento capaz de servir como diana durante el siguiente ciclo y se obtiene amplificación exponencial de forma específica para el alelo de la secuencia deseada.

El Genetic Bit Analysis™ mediado por ligasa/polimerasa es otro método para determinar la identidad de un nucleótido en un sitio seleccionado previamente en una molécula de ácido nucleico (documento WO 95/21271). Este método implica la incorporación de un nucleósido trifosfato que es complementario al nucleótido presente en el sitio seleccionado previamente sobre el extremo de una molécula cebadora, y su posterior ligamiento con un segundo oligonucleótido. La reacción se controla detectando un marcador específico unido a la fase sólida de la reacción o por detección en solución.

4) Métodos de Ensayo de Hibridación

Un método preferido para determinar la identidad del nucleótido presente en un sitio del marcador bialélico hibridación de ácido nucleico. Las sondas de hibridación que pueden usarse convenientemente en tales reacciones, incluyen preferiblemente sondas específicas para ADNc de GSSP4 que rodean a los marcadores bialélicos de GSSP4. Puede usarse cualquier ensayo de hibridación incluyendo hibridación de Southern, hibridación de Northern, hibridación de transferencia puntual e hibridación en fase sólida (véase Sambrook *et al.*, *supra*).

Hibridación se refiere a la formación de una estructura dúplex mediante dos ácidos nucleicos monocatenarios debido al emparejamiento de bases complementarias. Puede producirse hibridación entre cadenas de ácido nucleico exactamente complementarias o entre cadenas de ácido nucleico que contienen regiones minoritarias de desacoplamiento. Pueden diseñarse sondas específicas que hibriden con una forma de marcador bialélico y no con la otra y, por lo tanto, que sean capaces de discriminar entre diferentes formas alélicas. Las sondas con especificidad de alelo a menudo se usan por parejas, mostrando un miembro de un par un acoplamiento perfecto con una secuencia diana que contiene el alelo original y mostrando el otro un acoplamiento perfecto con la secuencia diana que contiene el alelo alternativo.

Las condiciones de hibridación deben ser suficientemente rigurosas como para que haya una diferencia significativa en la intensidad de hibridación entre alelos, y preferiblemente una respuesta esencialmente binaria, con lo que una sonda hibrida sólo con uno de los alelos. Las condiciones de hibridación rigurosas, con especificidad de secuencia, bajo las cuales una sonda hibridará sólo con la secuencia diana exactamente complementaria son bien conocidas en la técnica (Sambrook *et al.*, *supra*). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de manera que estén aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica y pH definidos. Aunque estas hibridaciones pueden realizarse en solución, se prefiere emplear un ensayo de hibridación en fase sólida. El ADN diana que comprende un marcador bialélico de la presente invención puede amplificarse antes de la reacción de hibridación.

La presencia de un alelo específico en la muestra se determina detectando la presencia o ausencia de dúplex híbridos estables formados entre la sonda y el ADN diana. La detección de dúplex híbridos puede realizarse por varios métodos. Se conocen bien varios formatos de ensayos de detección que utilizan marcadores detectables unidos a la diana o a la sonda para permitir la detección de los dúplex híbridos. Típicamente, los dúplex de hibridación se separan

de los ácidos nucleicos no hibridados y después se detectan los marcadores unidos a los dúplex. Los especialistas en la técnica reconocerán que pueden emplearse etapas de lavado para retirar el exceso de ADN diana o sonda, así como el conjugado no unido. Además, son adecuados formatos de ensayo heterogéneos convencionales para detectar los híbridos usando los marcadores presentes en los cebadores y sondas.

Dos ensayos desarrollados recientemente permiten la discriminación de alelos basada en la hibridación sin necesidad de separaciones o lavados (véase Landegren U. *et al.*, (1998) *Genome Res.* Aug;8(8):769-76). En ensayo TaqMan aprovecha la actividad nucleasa 5' de la Taq ADN polimerasa para digerir una sonda de ADN hibridada específicamente con el producto de amplificación que se acumula. Las sondas TaqMan se marcan con un par de colorante donador-aceptor que interacciona por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). La escisión de la sonda TaqMan por la polimerasa en avance durante la amplificación disocia el colorante donador del colorante aceptor de inactivación, aumentando en gran medida la fluorescencia del donador. Todos los reactivos necesarios para detectar dos variantes alélicas pueden ensamblarse al principio de la reacción y los resultados se controlan a tiempo real (véase Livak *et al.*, 1995).

En un procedimiento basado en hibridación homogénea alternativa, se usan balizas moleculares para las discriminaciones de alelos. Las balizas moleculares son sondas oligonucleotídicas con forma de horquilla que indican la presencia de ácidos nucleicos específicos en soluciones homogéneas. Cuando se unen a sus dianas, experimentan una reorganización conformacional que restaura la fluorescencia de un fluoróforo inactivado internamente (Tyagi *et al.*, (1998) *Nat Biotechnol.* Jan;16(1):49-53).

Los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para producir sondas que pueden usarse en ensayos de hibridación para la detección de alelos marcadores bialélicos en muestras biológicas. Estas sondas se caracterizan por comprender preferiblemente entre 8 y 50 nucleótidos, y por ser suficientemente complementarias a una secuencia que comprende un marcador bialélico de la presente invención como para hibridar con el mismo y preferiblemente por ser suficientemente específicas como para poder discriminar la secuencia diana para una sola variación de nucleótido. Una sonda particularmente preferida tiene una longitud de 25 nucleótidos. Preferiblemente, el marcador bialélico está a una distancia menor de 4 nucleótidos del centro de la sonda polinucleotídica. En sondas particularmente preferidas, el marcador bialélico está en el centro de dicho polinucleótido. En realizaciones preferidas, la base polimórfica está a una distancia de menos de 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido del centro de dicho polinucleótido, más preferiblemente en el centro de dicho polinucleótido. Preferiblemente, las sondas de la presente invención están marcadas o inmovilizadas en un soporte sólido.

Por medio del ensayo de la hibridación con una sonda con especificidad de alelo, se puede detectar la presencia o ausencia de un alelo marcador bialélico en una muestra dada. Dentro de los "ensayos de hibridación" se incluyen específicamente hibridaciones paralelas de alto rendimiento en formato de matriz y se describen más adelante.

5) Hibridación con Matrices Direccionables de Oligonucleótidos

Los ensayos de hibridación basados en matrices de oligonucleótidos se basan en las diferencias en estabilidad de hibridación de oligonucleótidos cortos con variantes de secuencia diana perfectamente emparejadas y desemparejadas. Se consigue un acceso eficaz a la información sobre el polimorfismo a través de una estructura básica que comprende matrices de alta densidad de sondas oligonucleotídicas unidas a un soporte sólido (por ejemplo, el chip) en posiciones seleccionadas. Cada chip de ADN puede contener de miles a millones de sondas de ADN sintéticas individuales dispuestas en un patrón de tipo rejilla y miniaturizarse hasta el tamaño de un dime.

La tecnología del chip ya se ha aplicado con éxito en numerosos casos. Por ejemplo, se ha realizado la selección de mutaciones en el gen BRCA1, en cepas mutantes de *S. cerevisiae*, y en el gen de la proteasa del virus VIH-1 (Hacia *et al.*, (1996) *Nat Genet.* Dec;14(4):441-7; Shoemaker *et al.*, (1996) *Nat Genet* Dec; 14(4):450-6; Kozal *et al.*, (1996) *Nat Med.* Jul;2(7):753-9). Pueden producirse chips de diversos formatos para uso en la detección de polimorfismos bialélicos en una base adaptada por Affymetrix (GeneChip™), Hyseq (HyChip y HyGnostics) y Protogene Laboratories.

En general, estos métodos emplean matrices de sondas oligonucleotídicas que son complementarias a segmentos de secuencia de ácido nucleico diana de un individuo, incluyendo dichas secuencias diana un marcador polimórfico. El documento EP 785280 describe una estrategia de enlosamiento para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido.

En resumen, las matrices generalmente pueden "enlosarse" para un gran número de polimorfismos específicos. Por "enlosamiento" se entiende generalmente la síntesis de una serie definida de sondas oligonucleotídicas que se obtiene a partir de una secuencia complementaria a la secuencia diana de interés, así como variaciones preseleccionadas de esa secuencia, por ejemplo, sustitución de una o más posiciones dadas con uno o más miembros de la serie base de monómeros, es decir, nucleótidos. En la solicitud PCT N° WO 95/11995 se describen adicionalmente estrategias de enlosamiento. En un aspecto particular, las matrices se enlosan para un número de secuencias marcadoras bialélicas identificadas específicas. En particular, la matriz se enlosa para incluir varios bloques de detección, siendo específico cada bloque de detección para un marcador bialélico específico o una serie de marcadores bialélicos.

Por ejemplo, un bloque de detección puede enlosarse para incluir varias sondas que incluyen el segmento de secuencia que incluye un polimorfismo específico. Para asegurar sondas que son complementarias a cada alelo, las sondas se sintetizan en pares que difieren en el marcador bialélico. Además de las sondas que difieren en la base polimórfica, dentro del bloque de detección generalmente también se enlosan sondas monosustituídas. Estas sondas monosustituídas tienen bases en y hasta un cierto número de bases en cualquier dirección desde el polimorfismo, sustituidas con los demás nucleótidos (seleccionados entre A, T, G, C y U). Típicamente, las sondas en un bloque de detección enlosado incluirán sustituciones de las posiciones de secuencia hasta y que incluyen las que están separadas por 5 bases del marcador bialélico. Las sondas monosustituídas proporcionan controles internos para la matriz enlosada, para distinguir la hibridación real de la hibridación cruzada artefactual. Después de completar la hibridación con la secuencia diana y de lavar la matriz, la matriz se explora para determinar la posición de la matriz con la que hibrida la secuencia diana. Después se analizan los datos de hibridación de la matriz explorada para identificar el alelo o alelos del marcador bialélico que están presentes en la muestra. La hibridación y la exploración pueden realizarse como se describe en la publicación PCT N° WO 92/10092 y WO 95/11995 y en la patente de Estados Unidos N° 5.424.186.

De esta manera, en algunas realizaciones los chips pueden comprender una matriz de secuencias de ácido nucleico de fragmentos de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, la base polimórfica está a una distancia de menos de 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido del centro de dicho polinucleótido, más preferiblemente en el centro de dicho polinucleótido. En algunas realizaciones, el chip puede comprender una matriz de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de estos polinucleótidos.

6) *Sistemas Integrados*

Otra técnica que puede usarse para analizar polimorfismos incluye sistemas integrados multicomponente que miniaturizan y compartimentalizan procesos tales como PCR y reacciones de electroforesis capilar en un solo dispositivo funcional. Se describe un ejemplo de esta técnica en la patente de Estados Unidos 5.589.136, que describe la integración de la amplificación por PCR y la electroforesis capilar en chips.

Pueden preverse sistemas integrados principalmente cuando se usan sistemas de microfluidos. Estos sistemas comprenden un patrón de microcanales diseñados en una oblea de vidrio, silicio, cuarzo o plástico incluida en un microchip. El movimiento de las muestras se controla por fuerzas eléctricas, electro-osmóticas o hidrostáticas aplicadas a través de diferentes áreas del microchip para crear válvulas microscópicas funcionales y bombas sin partes móviles. Variando el voltaje se controla el flujo de líquido en intersecciones entre los canales micromecanizados y cambios en el caudal de líquido para el bombeo a través de diferentes secciones del microchip.

Para la genotipificación de marcadores bialélicos, el sistema de microfluidos puede integrar amplificación de ácidos nucleicos, microsecuenciación, electroforesis capilar y un método de detección tal como detección de fluorescencia inducida por láser.

En una primera etapa, las muestras de ADN se amplifican, preferiblemente por PCR. Después, los productos de amplificación se someten a reacciones de microsecuenciación automáticas usando ddNTP (fluorescencia específica para cada ddNTP) y los cebadores de oligonucleótidos apropiados que hibridan cadena arriba de la base polimórfica diana. Una vez finalizada la extensión en el extremo 3', los cebadores se separan de los ddNTP fluorescentes no incorporados por electroforesis capilar. El medio de separación usado en electroforesis capilar puede ser, por ejemplo, poliacrilamida, polietilenglicol o dextrano. Los ddNTP incorporados en los productos de extensión de cebador de un solo nucleótido se identifican por detección de fluorescencia. Este microchip puede usarse para procesar al menos de 96 a 384 muestras en paralelo. Puede usar la detección de fluorescencia inducida por láser de cuatro colores habitual de los ddNTP.

Estudios de asociación de GSSP4

Los estudios de asociación se centran en las frecuencias de población y se basan en el fenómeno de desequilibrio de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento es la desviación de la aleatoriedad de la aparición de pares de alelos específicos en diferentes loci en el mismo cromosoma. Si un alelo específico en un gen dado está asociado directamente con un rasgo particular, su frecuencia estará estadísticamente aumentada en una población afectada (positiva para el rasgo), en comparación con la frecuencia en una población negativa para el rasgo o en una población de control aleatoria. Como consecuencia de la existencia de desequilibrio de ligamiento, la frecuencia de todos los demás alelos presentes en el haplotipo que lleva el alelo causante del rasgo también estará aumentada en individuos positivos para el rasgo en comparación con individuos negativos para el rasgo o controles aleatorios. Por lo tanto, la asociación entre el rasgo y cualquier alelo (específicamente un alelo marcador bialélico) en el desequilibrio de ligamiento con el alelo causante del rasgo será suficiente para sugerir la presencia de un gen relacionado con el rasgo en esa región particular.

Pueden genotipificarse poblaciones de casos-control en relación con marcadores bialélicos para identificar asociaciones que localicen de forma más estrecha un alelo causante de un rasgo, ya que cualquier marcador en desequilibrio de ligamiento con un marcador dado asociado con un rasgo se asociará con el rasgo. El desequilibrio de ligamiento permite analizar las frecuencias relativas en poblaciones de casos-control de un número limitado de polimorfismos genéticos (específicamente marcadores bialélicos) como alternativa a la selección de todos los polimorfismos funcionales posibles para encontrar alelos causantes de rasgos. Los estudios de asociación comparan la frecuencia de alelos marcadores en poblaciones de casos-control no relacionadas, y representan herramientas poderosas para la disección de rasgos complejos.

Poblaciones de casos-control (criterios de inclusión)

Los estudios de asociación basados en la población no se refieren a la herencia familiar, sino que comparan la prevalencia de un marcador genético particular, o una serie de marcadores, en poblaciones de casos-control. Son estudios de casos-control basados en la comparación de individuos de casos no relacionados (afectados o positivos para el rasgo) e individuos de control no relacionados (no afectados, negativos para el rasgo o aleatorios). Preferiblemente, el grupo de control se compone de individuos no afectados o negativos para el rasgo. Además, el grupo de control es étnicamente correspondiente a la población de casos. Además, el grupo de control preferiblemente corresponde a la población de casos para el factor de confusión conocido principal para el rasgo en estudio (por ejemplo, coincide en edad en caso de un rasgo dependiente de la edad). Idealmente, los individuos de las dos muestras se emparejan de tal manera que es de esperar que difieran únicamente en su estado de enfermedad. Las expresiones “población positiva para el rasgo”, “población de casos” y “población afectada” se usan indistintamente en la presente memoria.

Una etapa importante en la disección de rasgos complejos usando estudios de asociación es la elección de poblaciones de casos-control (véase, Lander y Schork, (1994) *Science*, Sep 30;265(5181):2037-48). Una etapa importante en la elección de poblaciones de casos-control es la definición clínica de un rasgo o fenotipo dado. Cualquier rasgo genético puede analizarse por el método de asociación propuesto en la presente memoria por medio de la selección cuidadosa de los individuos a incluir en los grupos fenotípicos positivo y negativo para el rasgo. A menudo son útiles cuatro criterios: fenotipo clínico, edad de inicio, historia familiar y gravedad.

El procedimiento de selección para rasgos continuos o cuantitativos (tales como, por ejemplo, la presión sanguínea) implica la selección de individuos en extremos opuestos de la distribución fenotípica del rasgo en estudio, para incluir en estas poblaciones positiva para el rasgo y negativa para el rasgo individuos con fenotipos no solapantes. Preferiblemente, las poblaciones de casos-control consisten en poblaciones fenotípicamente homogéneas. Las poblaciones positivas para el rasgo y negativas para el rasgo consisten en poblaciones fenotípicamente uniformes de individuos, representando cada uno entre 1 y 98%, preferiblemente entre 1 y 80%, más preferiblemente entre 1 y 50%, aún más preferiblemente entre 1 y 30% y aún más preferiblemente entre 1 y 20% de la población total en estudio, y estos individuos preferiblemente se seleccionan entre individuos que presentan fenotipos no solapantes. Cuanto más clara es la diferencia entre los dos fenotipos del rasgo, mayor es la probabilidad de detectar una asociación con marcadores bialélicos. La selección de los fenotipos drásticamente diferentes pero relativamente uniformes permite comparaciones eficaces en estudios de asociación y la posible detección de diferencias marcadas a nivel genético, siempre que los tamaños de muestra de las poblaciones en estudio sean suficientemente significativos.

En realizaciones preferidas, se recluta un primer grupo de entre 50 y 300 individuos positivos para el rasgo, preferiblemente aproximadamente 100 individuos, de acuerdo con sus fenotipos. En estos estudios se incluye un número similar de individuos negativos para el rasgo.

En la presente invención, los ejemplos típicos de criterios de inclusión incluyen obesidad y trastornos relacionados con la obesidad así como parámetros fisiológicos asociados con la obesidad tales como niveles de ácidos grasos libres, niveles de glucosa, niveles de insulina, niveles de leptina, niveles de triglicéridos, niveles de oxidación de ácidos grasos libres y pérdida de peso.

Análisis de Asociación

La estrategia general para realizar estudios de asociación usando marcadores bialélicos derivados de una región que lleva un gen candidato es explorar dos grupos de individuos (poblaciones de casos-control) para medir y comparar estadísticamente las frecuencias de alelos de los marcadores bialélicos de la presente invención en los dos grupos.

Si se identifica una asociación estadísticamente significativa con un rasgo para al menos uno o más de los marcadores bialélicos analizados, se puede asumir que: el alelo asociado es directamente responsable de causar el rasgo (es decir, el alelo asociado es el alelo causante del rasgo), o más probablemente, el alelo asociado está en desequilibrio de ligamiento con el alelo causante del rasgo. Las características específicas del alelo asociado con respecto a la función del gen candidato normalmente proporcionan una perspectiva adicional a la relación entre el alelo asociado y el rasgo (causal o en desequilibrio de ligamiento). Si las pruebas indican que lo más probable es que el alelo asociado dentro del gen candidato no sea el alelo causante del rasgo sino que esté en desequilibrio de ligamiento con el alelo causante del rasgo real, el alelo causante del rasgo puede encontrarse por secuenciación de las proximidades del marcador asociado, y realizando estudios adicionales de asociación con los polimorfismos que se revelan de una manera repetitiva. Los estudios de asociación normalmente se realizan en dos etapas sucesivas. En una primera fase, en las poblaciones positiva para el rasgo y negativa para el rasgo se determinan las frecuencias de un número reducido de marcadores bialélicos del gen candidato. En una segunda fase del análisis, se refina adicionalmente la posición de los loci genéticos responsables del rasgo dado usando una mayor densidad de marcadores de la región relevante. Sin embargo, si el gen candidato en estudio tiene una longitud relativamente pequeña, puede ser suficiente una sola fase para establecer asociaciones significativas.

Análisis de Haplotipo

Como se ha descrito anteriormente, cuando aparece por primera vez un cromosoma que lleva un alelo de una enfermedad en una población como resultado de mutación o migración, el alelo mutante necesariamente reside en

un cromosoma que tiene una serie de marcadores ligados: el haplotipo ancestral. Este haplotipo puede rastrearse a través de poblaciones y puede analizarse su asociación estadística con un rasgo dado. Los estudios de asociación de complementación de un solo punto (alélico) con estudios de asociación de múltiples puntos también denominados estudios de haplotipo aumentan la potencia estadística de los estudios de asociación. De esta manera, un estudio de asociación de haplotipo permite definir la frecuencia y el tipo de haplotipo portador ancestral. El análisis del haplotipo es importante ya que aumenta la potencia estadística de un análisis que implica marcadores individuales.

En una primera etapa de un análisis de frecuencia de haplotipo, se determina la frecuencia de los posibles haplotipos basándose en diversas combinaciones de los marcadores bialélicos identificados de la invención. Después se compara la frecuencia de haplotipo para poblaciones distintas de individuos positivos para el rasgo y de control. El número de individuos positivos para el rasgo que deberían someterse a este análisis para obtener resultados estadísticamente significativos normalmente varía entre 30 y 300, variando el número preferido de individuos entre 50 y 150. Se aplican las mismas consideraciones al número de individuos no afectados (o control aleatorio) usados en el estudio. Los resultados de este primer análisis proporcionan frecuencias de haplotipo en poblaciones de casos-control, y para cada frecuencia de haplotipo evaluada, se calculan un valor de p y una razón de posibilidades. Si se encuentra una asociación estadísticamente significativa, puede conseguirse una aproximación del riesgo relativo de que un individuo que lleva el haplotipo dado esté afectado con el rasgo en estudio.

Análisis de interacción

Los marcadores bialélicos de la presente invención también pueden usarse para identificar patrones de marcadores bialélicos asociados con rasgos detectables resultantes de interacciones poligénicas. El análisis de la interacción genética entre alelos en loci no ligados requiere una genotipificación individual usando las técnicas descritas en la presente memoria. El análisis de la interacción alélica entre una serie seleccionada de marcadores bialélicos con un nivel apropiado de significado estadístico puede considerarse un análisis de haplotipo. El análisis de interacción consiste en estratificar las poblaciones de casos-control con respecto a un haplotipo dado para los primeros loci y realizar un análisis de haplotipo con los segundos loci con cada subpoblación.

VIII. Ensayos para identificar moduladores de la actividad de polipéptidos GSSP4

La invención se refiere a métodos para seleccionar uno o más compuestos que modulen la actividad de GSSP4 en las células, que incluyen proporcionar posibles compuestos a ensayar a las células. En los ejemplos 2, 5-7, 9-11 se describen ensayos ejemplares que pueden usarse. En estos ensayos se añadirían compuestos a ensayar con respecto su actividad inhibidora o estimuladora en comparación con los efectos de polipéptidos GSSP4 solos. También pueden usarse otros ensayos en los que se observa un efecto basándose en la adición de polipéptidos GSSP4 para seleccionar moduladores de la actividad de polipéptidos GSSP4 o efectos de la presencia de polipéptidos GSSP4 en las células. La etapa esencial es aplicar un compuesto desconocido y después controlar en un ensayo el cambio con respecto a lo que se observa cuando sólo se aplican a las células los polipéptidos GSSP4. Un cambio se define como algo que es significativamente diferente en presencia del compuesto más un polipéptido GSSP4 en comparación con cuando está presente el polipéptido GSSP4 solo. En este caso, sería significativamente diferente un "aumento" o una "disminución" en un efecto medible de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%.

El término "modulación", como se usa en la presente memoria, se refiere a un cambio medible en una actividad. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, modulación de receptores estimulados por lipólisis (LSR), modulación de leptina, modulación de lipoproteínas, niveles plasmáticos de FFA, oxidación de FFA, niveles de TG, niveles de glucosa y peso. Estos efectos pueden ser *in vitro* o preferiblemente *in vivo*. La modulación de una actividad puede ser un aumento o una reducción de la actividad. De esta manera, la actividad de LSR puede aumentarse o disminuirse, la actividad de la leptina puede aumentarse o disminuirse y la actividad de lipoproteínas puede aumentarse o disminuirse. De manera similar, los niveles de FFA, TG y glucosa (y el peso) pueden aumentarse o disminuirse *in vivo*. La oxidación de ácidos grasos libres puede aumentarse o disminuirse *in vivo* o *ex vivo*.

Por actividad "LSR" se entiende la expresión de LSR en la superficie de la célula, o en una conformación particular, así como su capacidad de unirse a, captar y degradar la leptina o lipoproteínas. Por actividad de la "leptina" se entiende su unión, captación o degradación por LSR, así como su transporte a través de la barrera hematoencefálica, y potencialmente estos sucesos cuando LSR no es necesariamente el factor de mediación o el único factor de mediación. De manera similar, por actividad de "lipoproteína" se entiende su unión, captación y degradación por LSR, así como estos sucesos cuando LSR no es necesariamente el factor de mediación o el único factor de mediación. En los ejemplos 2, 5-7, 9-11 se proporcionan ensayos ilustrativos. Estos ensayos y otros ensayos comparables pueden usarse para determinar/identificar compuestos que modulan la actividad de los polipéptidos GSSP4. En algunos casos, puede ser importante identificar compuestos que modulan algunas pero no todas las actividades de los polipéptidos GSSP4, aunque preferiblemente se modifican todas las actividades.

El término "aumentar", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un compuesto de aumentar la actividad de los polipéptidos GSSP4 de alguna manera medible en comparación con el efecto de los polipéptidos GSSP4 en su ausencia. Como resultado de la presencia del compuesto, puede aumentar la unión y/o la captación de leptina, por ejemplo, en comparación con los controles en presencia del polipéptido GSSP4 solo. Preferiblemente, un aumento de actividad es un aumento de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% en comparación con el nivel de actividad en presencia del polipéptido GSSP4.

ES 2 312 594 T3

De manera similar, el término “disminuir”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un compuesto de disminuir la actividad de alguna manera medible en comparación con el efecto de un polipéptido GSSP4 en su ausencia. Por ejemplo, la presencia del compuesto reduce las concentraciones plasmáticas de FFA, TG y glucosa en ratones. Además, como resultado de la presencia de un compuesto, puede disminuir la unión y/o la captación de leptina, por ejemplo, en comparación con los controles en presencia del polipéptido GSSP4 solo. Preferiblemente, una disminución de actividad es una disminución de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% en comparación con el nivel de actividad en presencia del polipéptido GSSP4 solo.

La invención se refiere a un método para identificar un compuesto potencial para modular la masa corporal en un individuo que necesita una modulación de la masa corporal, que comprende: a) poner en contacto una célula con un polipéptido GSSP4 y un compuesto candidato; b) detectar un resultado seleccionado entre el grupo consistente en modulación de LSR, modulación de leptina, modulación de lipoproteína; modulación de la oxidación de FFA; y c) donde dicho resultado identifica dicho compuesto potencial si dicho resultado difiere del resultado obtenido cuando dicha célula se pone en contacto con el polipéptido GSSP4 solo.

En realizaciones preferidas, dicha puesta en contacto comprende además un ligando de dicho LSR. Preferiblemente dicho ligando se selecciona entre el grupo consistente en citoquinas, lipoproteínas, ácido grasos libres y C1q, y más preferiblemente dicha citoquina es leptina, y aún más preferiblemente dicha leptina es un fragmento polipeptídico de leptina como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/155.506 incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad, incluyendo cualquier figura, dibujo o tabla.

En otras realizaciones preferidas, dicho polipéptido GSSP4 es de ratón o de ser humano. En otras realizaciones preferidas, dicha célula se selecciona entre el grupo consistente en PLC, CHO-K1, Hep3B y HepG2.

En otra realización preferida, dicha modulación de lipoproteína se selecciona entre el grupo consistente en la unión, captación y degradación. Preferiblemente, dicha modulación es un aumento de dicha unión, captación o degradación. Como alternativa, dicha modulación es una reducción de dicha unión, captación o degradación.

En otras realizaciones preferidas, la modulación de leptina se selecciona entre el grupo consistente en la unión, captación, degradación y transporte. Preferiblemente, dicha modulación es un aumento de dicha unión, captación, degradación o transporte. Como alternativa, dicha modulación es una reducción de dicha unión, captación, degradación o transporte. Preferiblemente, dicho transporte es a través de la barrera hematoencefálica.

En otras realizaciones preferidas, dicha modulación de LSR es la expresión en la superficie de dicha célula. Preferiblemente, dicha detección comprende FACS, más preferiblemente dicha detección comprende además anticuerpos que se unen específicamente a dicho LSR, y aún más preferiblemente dichos anticuerpos se unen específicamente al extremo carboxi de dicho LSR.

En otras realizaciones preferidas, dicho compuesto potencial se selecciona entre el grupo consistente en péptidos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas no peptídicas, peptoides, ácidos grasos, lipoproteínas, medicamentos, anticuerpos, moléculas pequeñas y proteasas.

IX. Epítomos y Fusiones de Anticuerpos

Una realización preferida de la presente invención se refiere a polipéptidos que llevan epítomos y fragmentos polipeptídicos que llevan epítomos. Estos epítomos pueden ser “epítomos antigénicos” o tanto un “epítomo antigénico” como un “epítomo inmunogénico”. Un “epítomo inmunogénico” se define como parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpo *in vivo* cuando el polipéptido es el inmunógeno. Por otra parte, una región de polipéptido a la que se une un anticuerpo se define como un “determinante antigénico” o “epítomo antigénico”. El número de epítomos inmunogénicos de una proteína generalmente es menor que el número de epítomos antigénicos. Véase, por ejemplo, Geysen, *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:39984002. Debe tenerse en cuenta particularmente que aunque un epítomo particular puede no ser inmunogénico, es útil ya que pueden obtenerse anticuerpos *in vitro* contra cualquier epítomo.

Un epítomo puede comprender tan solo 3 aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítomo. En general, un epítomo consiste en al menos 6 de estos aminoácidos, y con más frecuencia al menos 8-10 de estos aminoácidos. En una realización preferida, los epítomos antigénicos comprenden un número de aminoácidos que es cualquier número entero comprendido entre 3 y 50. Pueden producirse fragmentos que funcionan como epítomos por medios convencionales. Véase, por ejemplo, Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985), descrito adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 4.631.211. Los métodos para determinar los aminoácidos que constituyen un epítomo inmunogénico incluyen cristalografía de rayos x, resonancia magnética nuclear bidimensional y mapeo de epítomos, por ejemplo, el método Pepscan descrito por H. Mario Geysen *et al.* (1984); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3998-4002; Publicación PCT N° WO 84/03564; y Publicación PCT N° WO 84/03506. Otro ejemplo es el algoritmo de Jameson y Wolf, Comp. Appl. Biosci. 4:181-186 (1988) (incorporándose dicha bibliografía como referencia en su totalidad). El análisis antigénico de Jameson-Wolf, por ejemplo, puede realizarse usando el programa informático PROTEAN, usando parámetros por defecto (Version 4.0 Windows, DNASTAR, Inc., 1228 South Park Street Madison, WI).

Los fragmentos que llevan epítomos de la presente invención preferiblemente comprenden de 6 a 50 aminoácidos (es decir, cualquier número entero comprendido entre 6 y 50, inclusive) de un polipéptido de la presente invención. También se incluyen en la presente invención fragmentos antigénicos entre los números enteros 6 y la secuencia de longitud completa de la lista de secuencias. Se incluyen todas las combinaciones de secuencias entre los números enteros de 6 y la secuencia de longitud completa de un polipéptido de la presente invención. Los fragmentos que llevan epítomos pueden especificarse por el número de restos aminoacídicos contiguos (como un subgénero) o por posiciones N-terminales y C-terminales específicas (como especie) como se ha descrito anteriormente en relación con los fragmentos polipeptídicos de la presente invención. De la misma manera, también puede excluirse cualquier número de fragmentos que llevan epítomos de la presente invención.

Los epítomos antigénicos son útiles, por ejemplo, para inducir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al epítopo (véase Wilson *et al.*, 1984; y Sutcliffe, J. G. *et al.*, 1983). Los anticuerpos después pueden usarse en diversas técnicas tales como técnicas de diagnóstico y de identificación de tejidos/células, como se describe en la presente memoria, y en métodos de purificación.

De manera similar, pueden usarse epítomos inmunogénicos para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, Sutcliffe *et al.*, *supra*; Wilson *et al.*, *supra*; Chow, M. *et al.*; (1985) y Bittle, F. J. *et al.*, (1985). Un epítopo inmunogénico preferido incluye los polipéptidos de la lista de secuencias. Los epítomos inmunogénicos pueden presentarse junto con un vehículo proteico, tal como albúmina, a un sistema animal (tal como un conejo o ratón) si es necesario. Se ha demostrado que epítomos inmunogénicos que comprenden sólo de 8 a 10 aminoácidos son suficientes para inducir anticuerpos capaces de unirse a, como mínimo, epítomos lineales de un polipéptido desnaturizado (por ejemplo, en transferencia de Western.).

Los polipéptidos que llevan epítomos de la presente invención se usan para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro* y métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Sutcliffe, *et al.*, *supra*; Wilson, *et al.*, *supra* y Bittle, *et al.*, 1985). Si se usa inmunización *in vivo*, los animales pueden inmunizarse con el péptido libre; sin embargo, puede reforzarse la titulación de anticuerpo anti-péptido por acoplamiento del péptido a un vehículo macromolecular, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o toxoide tetánico. Por ejemplo, los péptidos que contienen cisteína pueden acoplarse a un vehículo usando un enlazador tal como éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a vehículos usando un agente de unión más general tal como glutaraldehído. Se inmunizan animales tales como conejos, ratas y ratones con péptidos libres o acoplados al vehículo, por ejemplo, por inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 µg de péptido o vehículo proteico y adyuvante de Freund. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar una titulación útil de anticuerpo anti-péptido, que puede detectarse, por ejemplo, por medio de un ensayo ELISA usando péptido libre adsorbido en una superficie sólida. El título de anticuerpos anti-péptido en el suero de un animal inmunizado puede aumentarse por medio de la selección de anticuerpos anti-péptido, por ejemplo, por adsorción del péptido en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Como apreciará un especialista en la técnica, y como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de la presente invención incluyendo, pero sin limitación; polipéptidos que comprenden un epítopo inmunogénico o antigénico, pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse con la región constante que comprende partes de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o partes de la región constante (CH1, CH2, CH3, cualquier combinación de las mismas incluyendo dominios enteros y partes de los mismos) dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una mayor vida media *in vivo*. Esto se ha demostrado, por ejemplo, para proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas de mamífero (véase, por ejemplo, el documento EPA 0.394.827; y Traunecker *et al.*, 1988). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica con enlaces disulfuro debido a la parte de IgG también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que los polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismo solos (véase, por ejemplo, Fountoulakis *et al.*, 1995). También pueden recombinarse ácidos nucleicos que codifican los epítomos anteriores con el gen de interés para ayudar en la detección y purificación del polipéptido expresado.

Pueden generarse otras proteínas de fusión de la invención por medio de las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones o barajado de codones (denominadas colectivamente "barajado de ADN"). Puede emplearse barajado de ADN para modular las actividades de los polipéptidos de la presente invención generando de manera eficaz agonistas y antagonistas de los polipéptidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 5.605.793; 5.811.238; 5.834.252; 5.837.458; y Patten, P.A., *et al.*, (1997); Harayama, S., (1998); Hansson, L.O., *et al.* (1999); y Lorenzo, M.M. y Blasco, R., (1998). Cada uno de estos documentos se incorpora en la presente memoria como referencia). En una realización, uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de los polinucleótidos codificantes de la invención, o los polipéptidos codificados por los mismos, pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Anticuerpos

La presente invención se refiere además a anticuerpos y receptores de antígenos de células T (TCR), que se unen específicamente a los polipéptidos, y más específicamente, a los epítomos de los polipéptidos de la presente invención.

5 Los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgD, IgE o IgM, e IgY. Como se usa en la presente memoria, se entiende que el término "anticuerpo" (Ab) incluye anticuerpos enteros, incluyendo anticuerpos enteros monocatenarios, y fragmentos de unión a antígenos de los mismos. En una realización preferida, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos humano de la presente invención e incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' F(ab)2 y F(ab')2, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por enlaces disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H . Los anticuerpos pueden tener cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo.

15 Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con todo o parte de las siguientes regiones: región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluye en la invención cualquier combinación de regiones variables y región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales y policlonales quiméricos, humanizados y humanos, que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente invención. La presente invención también incluye anticuerpos que son anti-idiotípicos para los anticuerpos de la presente invención.

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos y triespecíficos o pueden tener una mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de la presente invención como para composiciones heterólogas tales como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. *et al.* (1991); las Patentes de Estados Unidos 5.573.920, 4.474.893, 5.601.819, 4.714.681, 4.925.648; Kostelny, S.A. *et al.* (1992).

30 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en términos del epítomo o epítomos o de la parte o partes que llevan epítomos de un polipéptido de la presente invención, que se reconoce o se une específicamente al anticuerpo. En el caso de proteínas de la presente invención o proteínas secretadas, los anticuerpos pueden unirse específicamente a una proteína de longitud completa codificada por un ácido nucleico de la presente invención, una proteína madura (es decir, la proteína generada por escisión del péptido señal) codificada por un ácido nucleico de la presente invención, un péptido señal codificado por un ácido nucleico de la presente invención o cualquier otro polipéptido de la presente invención. Por lo tanto, el epítomo o epítomos o la parte o partes de polipéptido que llevan epítomos pueden especificarse como se describe en la presente memoria, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en restos aminoacídicos contiguos o pueden describirse de otra manera en la presente memoria (incluyendo la lista de secuencias). También pueden excluirse como especies individuales anticuerpos que se unen específicamente a cualquier epítomo o polipéptido de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos especificados de la presente invención, y permite su exclusión.

40 Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Se incluyen anticuerpos que no se unen específicamente a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de los polipéptidos de la presente invención. En la presente invención también se incluyen anticuerpos que no se unen a polipéptidos con una identidad menor de 95%, menor de 90%, menor de 85%, menor de 80%, menor de 75%, menor de 70%, menor de 65%, menor de 60%, menor de 55%, y menor de 50% (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria, por ejemplo, usando FASTDB y los parámetros indicados en la presente memoria) con un polipéptido de la presente invención. En la presente invención también se incluyen anticuerpos que sólo se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos, que hibridan con un polinucleótido de la presente invención en condiciones de hibridación rigurosas (como se describe en la presente memoria). Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión. Las afinidades de unión preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o valor de Kd menor de 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M y 10^{-15} M.

55 Los anticuerpos de la presente invención tienen usos que incluyen, pero sin limitación, métodos conocidos en la técnica para purificar, detectar y dirigir los polipéptidos de la presente invención incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen utilidad en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de los polipéptidos de la presente invención en muestras biológicas (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988).

60 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos también pueden fusionarse de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos o toxinas. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de Estados Unidos 5.314.995; y el documento EP 0 396 387.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención o un fragmento antigénico del mismo puede administrarse a un animal para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. La expresión “anticuerpo monoclonal” no se limita a los anticuerpos producidos por la tecnología de hibridoma. El término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos que comprenden al menos un dominio de unión, donde el dominio de unión se forma por plegamiento de dominios variables de una molécula de anticuerpo para formar espacios de unión tridimensionales con una forma de superficie interna y distribución de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno, que permite una reacción inmunológica con el antígeno. La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que procede de un solo clon, incluyendo un clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en este campo incluyendo el uso de la tecnología de hibridoma, recombinante y de presentación en fagos.

Las técnicas de hibridoma incluyen las conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow *et al.* 1988; y Hammerling, *et al.* 1981). (Incorporándose dicha bibliografía como referencia en su totalidad). Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse, por ejemplo, a partir de anticuerpos producidos por hibridoma por medio de escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por la aplicación de la tecnología de ADN recombinante o por medio de química sintética usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios funcionales de anticuerpo en la superficie de una partícula de fago, que lleva secuencias polinucleotídicas que los codifican. Se selecciona el fago con la propiedad de unión deseada a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina) por medio de la selección directa con un antígeno, típicamente un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos típicamente es un fago filamentoso incluyendo fd y M13 con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados de manera recombinante con el gen del fago o el gen de la proteína VIII. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para obtener los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman U. *et al.* (1995); Ames, R.S. *et al.* (1995); Kettleborough, C.A. *et al.* (1994); Persic, L. *et al.* (1997); Burton, D.R. *et al.* (1994); documentos PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727 y 5.733.743.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos enteros, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' F(ab)₂ y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en el documento WO 92/22324; Mullinax, R.L. *et al.* (1992); y Sawai, H. *et al.* (1995); y Better, M. *et al.* (1988).

Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen las descritas en las Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.* (1991); Shu, L. *et al.* (1993); y Skerra, A. *et al.* (1988). Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, (1985); Oi *et al.*, (1986); Gillies, S.D. *et al.* (1989); y la Patente de Estados Unidos 5.807.715. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas que incluyen injerto de CDR (documentos EP 0 239 400; WO 91/09967; Patente de Estados Unidos 5.530.101; y 5.585.089), chapado (veneering) o revestimiento (resurfacing), (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E.A., 1991; Studnicka G.M. *et al.*, 1994; Roguska M.A. *et al.*, 1994) y barajado de cadenas (Patente de Estados Unidos 5.565.332). Pueden prepararse anticuerpos humanos por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente. Véanse también las Patentes de Estados Unidos 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

En la presente invención también se incluyen anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a un polipéptido de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para dirigir los polipéptidos de la presente invención a tipos celulares particulares, *in vitro* o *in vivo*, por medio de la fusión o la conjugación de los polipéptidos de la presente invención con anticuerpos específicos para receptores específicos de la superficie celular. También pueden usarse anticuerpos fusionados o conjugados con los polipéptidos de la presente invención en inmunoensayos *in vitro* y en métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harbor *et al. supra*; WO 93/21232; EP 0 439 095; Naramura, M. *et al.* 1994; Patente de Estados Unidos 5.474.981; Gillies, S.O. *et al.*, 1992; Fell, H.P. *et al.*, 1991).

La presente invención también incluye composiciones que comprenden los polipéptidos de la presente invención fusionados o conjugados con dominios de anticuerpo distintos de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos

de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse con una región Fc de anticuerpo, o una parte de la misma. La parte de anticuerpo fusionada a un polipéptido de la presente invención puede comprender la región de bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2 y el dominio CH3 o cualquier combinación de dominios enteros o partes de los mismos. Los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse con las partes de anticuerpo anteriores para aumentar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos también pueden fusionarse o conjugarse con las partes de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las partes Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros a través de la unión por enlaces disulfuro entre las partes Fc. Pueden obtenerse formas multiméricas superiores fusionando los polipéptidos a partes de IgA e IgM. En la técnica se conocen métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención a partes de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.112.946; los documentos EP 0 307 434, EP 0 367 166; los documentos WO 96/04388, WO 91/06570; Ashkenazi, A. *et al.* (1991); Zheng, X.X. *et al.* (1995); y Vil, H. *et al.* (1992).

La invención se refiere además a anticuerpos que actúan como agonistas o antagonistas de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos que rompen las interacciones receptor/ligando con los polipéptidos de la invención de forma parcial o total. Se incluyen tanto anticuerpos con especificidad de receptor como anticuerpos con especificidad de ligando. Se incluyen anticuerpos con especificidad de receptor, que no impiden la unión del ligando pero impiden la activación del receptor. La activación del receptor (es decir, la señalización) puede determinarse por técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica. También se incluyen anticuerpos con especificidad de receptor que impiden tanto la unión del ligando como la activación del receptor. De manera similar, se incluyen anticuerpos de neutralización que se unen al ligando e impiden la unión del ligando al receptor, así como anticuerpos que se unen al ligando impidiendo de esta manera la activación del receptor, pero no impiden la unión del ligando al receptor. También se incluyen anticuerpos que activan el receptor. Estos anticuerpos pueden actuar como agonistas para todas o no todas las actividades biológicas afectadas por activación del receptor mediada por ligando. Los anticuerpos pueden especificarse como agonistas o antagonistas para actividades biológicas que comprenden actividades específicas descritas en la presente memoria. Los anticuerpos agonistas anteriores pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento WO 96/40281; Patente de Estados Unidos 5.811.097; Deng, B. *et al.* (1998); Chen, Z. *et al.* (1998); Harrop, J.A. *et al.* (1998); Zhu, Z. *et al.* (1998); Yoon, D.Y. *et al.* (1998); Prat, M. *et al.* (1998) J.; Pitard, V. *et al.* (1997); Liautard, J. *et al.* (1997); Carlson, N.G. *et al.* (1997) J.; Taryman, R.E. *et al.* (1995); Muller, Y.A. *et al.* (1998); Bartunek, P. *et al.* (1996).

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de los polipéptidos de la invención pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotípicos que "imitan" a los polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas por los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, Greenspan y Bona (1989); y Nissinoff (1991)). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen e inhiben de manera competitiva la multimerización del polipéptido o la unión de un polipéptido de la invención al ligando para generar anti-idiotipos que "imitan" al dominio de unión o multimerización del polipéptido y, como consecuencia, se unen y neutralizan el polipéptido o su ligando. Estos anticuerpos anti-idiotípicos de neutralización pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención o para unirse a sus ligandos/receptores y, por lo tanto, bloquear su actividad biológica.

La invención también se refiere a un anticuerpo purificado y aislado capaz de unirse específicamente a un polipéptido maduro o de longitud completa mutado de la presente invención o a un fragmento o variante del mismo, que comprende un epítipo del polipéptido mutado. En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido que comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de un polipéptido de la presente invención y que incluye al menos uno de los aminoácidos que puede codificarse por las mutaciones causantes del rasgo.

Son particularmente útiles para preparar anticuerpos animales o mamíferos no humanos, de tipo silvestre o transgénicos, que expresan una especie de un polipéptido de la presente invención diferente al polipéptido al que se desea unir el anticuerpo, y animales que no expresan un polipéptido de la presente invención (es decir, un animal knock out). Los animales knock out para ciertos genes reconocerán todas o la mayoría de las regiones expuestas de un polipéptido de la presente invención como antígenos extraños, y por lo tanto producirán anticuerpos con una mayor gama de epítopos. Además, los polipéptidos más pequeños con sólo 10 a 30 aminoácidos pueden ser útiles para obtener una unión específica a uno cualquiera de los polipéptidos de la presente invención. Además, el sistema inmune humoral de los animales que producen una especie de polipéptido de la presente invención que se parece a la secuencia antigénica preferiblemente reconocerá las diferencias entre las especies de polipéptido nativo del animal y la secuencia antigénica, y producirá anticuerpos contra esos sitios únicos en la secuencia antigénica. Esta técnica será particularmente útil para obtener anticuerpos que se unen específicamente a uno cualquiera de los polipéptidos de la presente invención.

Las preparaciones de anticuerpo preparadas de acuerdo con cualquier protocolo son útiles en inmunoensayos cuantitativos que determinan concentraciones de sustancias que llevan antígenos en muestras biológicas; también se usan semi-cuantitativamente o cualitativamente para identificar la presencia de un antígeno en una muestra biológica. Los anticuerpos también pueden usarse en composiciones terapéuticas para destruir células que expresan la proteína o para reducir los niveles de la proteína en el cuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con uno cualquiera de marcadores radiactivos, fluorescentes o enzimáticos conocidos en la técnica.

ES 2 312 594 T3

Por consiguiente, la invención también se refiere a un método para detectar específicamente la presencia de un polipéptido de la presente invención de acuerdo con la invención en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

5 a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de la presente invención; y

b) detectar el complejo antígeno-anticuerpo formado.

10 La invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar *in vitro* la presencia de un polipéptido de la presente invención en una muestra biológica, donde dicho kit comprende:

a) un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de la presente invención, opcionalmente marcado; y

15 b) un reactivo que permite la detección de los complejos antígeno-anticuerpo formados, donde dicho reactivo tiene opcionalmente un marcador, o puede reconocerse a sí mismo mediante un reactivo marcado, más particularmente en el caso en el que el anticuerpo monoclonal o policlonal mencionado anteriormente no está marcado por sí mismo.

20 Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con uno cualquiera de marcadores radiactivos, fluorescentes o enzimáticos conocidos en la técnica.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no como medios de limitación, para respaldar el descubrimiento de que los polipéptidos GSSP4 tienen eficacia en la reducción de la resistencia a la insulina y en la mejora del metabolismo de la glucosa y de los lípidos y pueden tener una acción sensibilizadora a la insulina. Un especialista en la técnica será capaz de diseñar ensayos y métodos equivalentes basándose en la descripción de la presente memoria, y todos ellos forman parte de la presente invención.

30 Ejemplo 1

Análisis de Northern de ARN de GSSP4

35 El análisis de la expresión de GSSP4 en diferentes tejidos humanos (adultos y fetales) y líneas celulares, así como en embriones de ratón en diferentes fases del desarrollo, se realiza usando transferencias de ARN poli A⁺ adquiridas en Clontech (por ejemplo, n° 7780-1, 7757-1, 7756-1, 7768-1 y 7763-1). El marcaje de sondas de ADN se realiza usando el kit RNA Strip-EZ de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridación de sondas de ADN con manchas de transferencia de ARN se realiza con solución de hibridación Ultrahyb (Ambion). En resumen, se prehibridan manchas de transferencia durante 30 min a 58°C (baja rigurosidad) o a 65°C (alta rigurosidad). Después de añadir la sonda marcada (2x10⁶ cpm/ml), las manchas de transferencia se hibridan durante una noche (14-24 horas), y se lavan 2 veces durante 20 min a 50°C con SSC 2x/SDS al 0,1% (baja rigurosidad), 2 veces durante 20 min a 58°C con SSC 1x/SDS al 0,1% (rigurosidad media) y 2 veces durante 20 min a 65°C con SSC 1x/SDS al 0,1% (rigurosidad elevada). Después de completarse los lavados, las manchas de transferencia completadas se exponen en el phosphoimager (Molecular Dynamics) durante 1-3 días.

45 Ejemplo 2

Ensayos In Vitro de la Actividad Relacionada con el Metabolismo

50 La actividad de diversas preparaciones de polipéptidos GSSP4 se evaluó usando diversos ensayos *in vitro*, incluyendo los que se proporcionan a continuación. Estos ensayos también son ejemplares de los que pueden usarse para desarrollar antagonistas y agonistas de los polipéptidos GSSP4. Para hacer esto, se compara el efecto de los polipéptidos GSSP4 en los ensayos anteriores, por ejemplo sobre la captación de la glucosa y la oxidación y el reparto de ácidos grasos en presencia de las moléculas candidatas con el efecto de los polipéptidos GSSP4 en los ensayos en ausencia de las moléculas candidatas.

Captación glucosa en células musculares in vitro

55 Se obtienen células musculares L6 en la European Culture Collection (Porton Down) y se usan en los pases 7-11. Las células se mantienen en medio de cultivo de tejidos convencional DMEM, y se evalúa la captación de glucosa usando [³H]-2-desoxiglucosa (2DG) con o sin polipéptidos GSSP4 en presencia o ausencia de insulina (10⁻⁸ M) como se ha descrito previamente (Walker P S *et al*, Glucose transport activity in L6 muscle cells is regulated by the coordinate control of subcellular glucose transporter distribution, biosynthesis, and mRNA transcription, JBC, 1990;265(3), 1516-1523, y Kilp A *et al*, Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture, Endocrinology, 1992; 130(5), 2535-2544). La captación de 2DG se expresa como el cambio en porcentaje comparado con el control (sin adición de insulina o GSSP4). Los valores se presentan como la media ± SEM de grupos de 4 pocillos por experimento. 65 Las diferencias entre los grupos de pocillos se evalúan por ensayo t de Student, y se consideran significativos valores de probabilidad p<0,05.

ES 2 312 594 T3

Efecto de la Oxidación de Ácidos Grasos en Células Musculares

Se diferencian células C2C12 en presencia o ausencia de 2 $\mu\text{g/ml}$ de proteína GSSP4 durante 4 días. En el día 4, se determinan las velocidades de oxidación de oleato midiendo la conversión de 1- ^{14}C -oleato (0,2 mM) en $^{14}\text{CO}_2$ durante 90 min. Este experimento puede usarse para seleccionar fragmentos activos y péptidos así como agonistas y antagonistas o activadores e inhibidores de polipéptidos GSSP4.

El efecto de los polipéptidos sobre la velocidad de oxidación de oleato puede compararse en células C2C12 diferenciadas (células de músculo esquelético murino; ATCC, Manassas, VA CRL-1772) y en una línea celular de hepatocitos (Hepal-6; ATCC, Manassas, VA CRL-1830). Las células cultivadas se mantienen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo de oxidación de oleato se realiza como se ha descrito previamente (Muioio *et al* (1999) Biochem J 338;783-791). En resumen, los miocitos casi confluentes se mantienen en medio de diferenciación bajo en suero (DMEM, suero de caballo al 2,5%) durante 4 días, momento en el que la formación de miotubos es máxima. Los hepatocitos se mantienen en el mismo medio DMEM suplementado con FCS al 10% durante 2 días. Una hora antes del experimento, el medio se retira y se añade 1 ml de medio de preincubación (MEM, suero de caballo al 2,5%, glucosa 3 mM, Glutamina 4 mM, Hepes 25 mM, BSA sin FFA al 1%, Oleato 0,25 mM, 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina). Al principio del experimento de oxidación, se añade ácido ^{14}C -oleico (1 $\mu\text{Ci/ml}$, American Radiolabeled Chemical Inc., St. Louis, MO) y las células se incuban durante 90 min a 37°C en ausencia/presencia de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de polipéptidos GSSP4. Después del periodo de incubación, se retiran 0,75 ml del medio y se ensaya con respecto a los productos de ^{14}C -oxidación como se describe a continuación para el experimento de oxidación de FFA muscular.

Reparto de triglicéridos y proteínas después de la oxidación de oleato en células cultivadas

Después de transferir el medio para el ensayo de oxidación de oleato, las células se ponen en hielo. Para determinar el contenido de triglicéridos y proteínas, las células se lavan con 1 ml de PBS 1x para retirar el medio residual. A cada pocillo se le añaden 300 μl de solución de disociación celular (Sigma) y se incuban a 37°C durante 10 min. Las placas se golpean suavemente para soltar las células, y se añaden 0,5 ml de PBS 1x. La suspensión celular se transfiere a un tubo eppendorf, y cada pocillo se aclara con 0,5 ml más de PBS 1x y se transfiere al tubo eppendorf apropiado. Las muestras se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desecha y al sedimento celular se le añaden 750 μl de PBS 1x/chaps al 2%. La suspensión celular se agita vorticialmente y se pone en hielo durante 1 hora. Después, las muestras se centrifugan a 13000 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfieren a un nuevo tubo y se congelan a -20°C hasta que se analizan. Se determina una medición cuantitativa del nivel de triglicéridos en cada muestra usando el kit enzimático Sigma Diagnostics GPO-TRINDER. Se sigue el procedimiento indicado en el manual, con las siguientes excepciones: el ensayo se realiza en una placa de 48 pocillos, se ensayan 350 μl de volumen de la muestra, el blanco de control consistía en 350 μl de PBS/chaps al 2%, y el patrón contenía 10 μl de patrón proporcionado en el kit más 690 μl de PBS/chaps al 2%. El análisis de las muestras se realiza en un Packard Spectra Count a una longitud de onda de 550 nm. El análisis de proteínas se realiza en 25 μl de cada una de las muestras de sobrenadante usando el ensayo de proteínas BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de las muestras se realiza en un Packard Spectra Count a una longitud de onda de 550 nm.

Unión celular y captación de polipéptidos GSSP4 detectadas por microscopía de fluorescencia

Conjugación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de polipéptidos GSSP4: se marcan proteínas GSSP4 purificadas a una concentración de 1 mg/ml con FITC usando el kit de conjugación FluoroTag FITC de Sigma (N° de artículo FITC-1). Para marcar la proteína GSSP4 se sigue el protocolo indicado en el manual de Sigma para conjugación a pequeña escala.

Cultivo de células: se siembran células de músculo esquelético de ratón C2C12 (ATCC, Manassas, VA CRL-1772) y hepatocitos de ratón Hepa-1-6 (ATCC, Manassas, VA CRL-1830) en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 2×10^5 células por pocillo. Las células C2C12 y Hepa-1-6 se cultivan de acuerdo con las instrucciones del depósito durante 24-48 horas antes del análisis. Se realiza el ensayo cuando las células alcanzan una confluencia de 80%.

Unión celular de la proteína GSSP4 marcada con FITC y captación usando microscopía: se incuban células C2C12 y Hepa 1-6 en presencia/ausencia de anticuerpo dirigido contra LSR humano (81B: secuencia N-terminal de LSR humano; no presenta reacción cruzada con LSR de ratón y 93A: secuencia C-terminal, presenta reacción cruzada con LSR de ratón) o un antisuero dirigido contra gC1qr (953) durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Se añaden al medio anticuerpos para LSR a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. El antisuero anti-gC1qr se añade al medio a un volumen de 2,5 μl de suero no diluido (alta concentración) o a una dilución de 1:100 (baja concentración). Después de la incubación con el anticuerpo especificado, se añade FITC-polipéptido GSSP4 (50 nM/ml) a cada pocillo de cultivo celular. Las células se incuban de nuevo durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Las células se lavan 2 veces con PBS, las células se raspan del pocillo y se introducen en 1 ml de PBS. La suspensión celular se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga a 1000 rpm durante 2 minutos. Se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 200 μl de PBS. La unión y captación de FITC-polipéptido GSSP4 se analiza por microscopía de fluorescencia con 40 aumentos.

Este ensayo puede ser útil para identificar agentes que faciliten o impidan la captación y/o unión de polipéptidos GSSP4 a las células.

Ejemplo 3

Ensayos in vivo de actividad relacionada con el metabolismo en modelos de diabetes en roedores

5 Como los perfiles metabólicos difieren entre diversos modelos animales de obesidad y diabetes, se emprende el análisis de múltiples modelos para separar los efectos de polipéptidos GSSP4 sobre la hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia y obesidad. La mutación en colonias de animales de laboratorio y diferentes sensibilidades a regímenes dietéticos han hecho posible el desarrollo de modelos animales con diabetes no insulino dependiente asociada con la obesidad y la resistencia a la insulina. Se han desarrollado modelos genéticos tales como db/db y ob/ob (véase Diabetes, (1982) 31(1): 1-6) en ratones y fa/fa en ratas Zucker por los diversos laboratorios para comprender la patofisiología de la enfermedad y ensayar la eficacia de nuevos compuestos antidiabéticos (Diabetes, (1983) 32: 830-838; Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. (1994). 46: 1-57). Los animales homocigotos, ratones C57 BL/KsJ-db/db desarrollados por Jackson Laboratory, Estados Unidos, son obesos, hiperglucémicos, hiperinsulinémicos y resistentes a la insulina (J. Clin. Invest., (1990) 85:962-967), mientras que los heterocigotos son delgados y normoglucémicos. En el modelo db/db, el ratón desarrolla progresivamente insulinoopenia con la edad, una característica que se observa comúnmente en las últimas fases de la diabetes humana de tipo II cuando los niveles sanguíneos de azúcar no están controlados suficientemente. El estado del páncreas y su curso varían de acuerdo con los modelos. Como este modelo se parece al de la diabetes mellitus de tipo II, los compuestos de la presente invención se ensayan con respecto a las actividades reductoras de los niveles sanguíneos de azúcar y de triglicéridos. Las ratas Zucker (fa/fa) son gravemente obesas, hiperinsulinémicas y resistentes a la insulina (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafir, en Diabetes Mellitus; H. Rifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), págs. 299-340), y la mutación fa/fa puede ser el equivalente en rata de la mutación db murina (Friedman *et al.*, Cell 69:217-220, 1992; Truett *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7806, 1991). Los ratones tubby (tub/tub) se caracterizan por obesidad, resistencia moderada a la insulina e hiperinsulinemia sin hiperglucemia significativa (Coleman *et al.*, J. Heredity 81:424, 1990).

25 Previamente, se ha notificado que la leptina invierte la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus con lipodistrofia congénita (Shimomura *et al.* Nature 401: 73-76 (1999)). Se ha descubierto que la leptina es menos eficaz en un modelo de ratón lipodistrófico diferente de diabetes lipoatrófica (Gavrilova *et al.* Nature 403: 850 (2000); incorporado en la presente memoria en su totalidad incluyendo cualquier dibujo, figura o tabla).

30 El modelo de estreptozotocina (STZ) para la diabetes inducida químicamente se ensaya para examinar los efectos de la hiperglucemia en ausencia de obesidad. Los animales tratados con STZ presentan deficiencia de insulina y son gravemente hiperglucémicos (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafir, en Diabetes Mellitus; H. Eifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), págs. 299-340). También se examina el modelo de obesidad inducida químicamente por glutamato monosódico (MSG) (Olney, Science 164:719, 1969; Cameron *et al.*, Cli. Exp. Pharmacol. Physiol. 5:41, 1978), en el que la obesidad es menos severa que en modelos genéticos y se desarrolla sin hiperfagia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Finalmente, un modelo no químico y no genético para inducción de obesidad incluye roedores que se alimentan con una dieta de alto contenido de grasa y alto contenido de carbohidratos (dieta de cafetería) *ad libitum*.

40 La presente invención incluye el uso de polipéptidos GSSP4 para reducir la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en cualquiera o todos los modelos de diabetes en roedores anteriores o en seres humanos con diabetes de tipo I o de tipo II u otras enfermedades metabólicas preferidas descritas previamente o modelos basados en otros mamíferos. En las composiciones de la presente invención, los polipéptidos GSSP4 pueden, si se desea, estar asociados con otros agentes antidiabéticos farmacológicamente activos compatibles, tales como insulina, leptina (solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/155.506) o troglitazona, solos o en combinación. Los ensayos incluyen lo descrito previamente en Gavrilova *et al.* ((2000) Diabetes Nov, 49(11): 1910-6; (2000) Nature Feb 24; 403(6772): 850) usando ratones A-ZIP/F-1, con la excepción de que los polipéptidos GSSP4 se administran por vía intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Se ensayan los niveles de glucosa e insulina de los ratones, y se controlan la ingesta de alimento y el peso del hígado, así como otros factores, tales como los niveles de leptina, FFA y TG, medidos típicamente en nuestros experimentos.

Ensayo in vivo para determinar la actividad antihiperglucémica de polipéptidos GSSP4

55 Se alojan (7-9 ratones/jaula) ratones diabéticos obesos genéticamente alterados (db/db) (macho, de 7-9 semanas de edad) en condiciones de laboratorio convencionales a 22°C y a una humedad relativa de 50%, y se mantienen con una dieta de alimento para roedores Purina y agua *ad libitum*. Antes del tratamiento, se recogen muestras de sangre de la vena de la cola de cada animal y se determinan las concentraciones sanguíneas de glucosa usando el Sistema de Control One Touch Basic Glucose (Lifescan). Se usan los ratones que tienen niveles plasmáticos de glucosa comprendidos entre 250 y 500 mg/dl. Cada grupo de tratamiento consiste en siete ratones que se distribuyen de manera que los niveles medios de glucosa sean equivalentes en cada grupo al principio del estudio. Los ratones db/db se dosifican con bombas micro-osmóticas, insertadas usando anestesia con isoflurano, para proporcionar al ratón polipéptidos GSSP4, solución salina y un péptido irrelevante, por vía subcutánea (s.c). Se toman muestras de sangre de la vena de la cola cada hora durante 4 horas y 24 y 30 h después de la dosificación y se analizan para determinar las concentraciones sanguíneas de glucosa. Se retira la comida 0-4 h después de la dosificación y posteriormente se introduce de nuevo. También se miden los pesos corporales individuales y el consumo medio de alimento (en cada jaula) después de 24 horas. Las diferencias significativas entre grupos (comparando los animales tratados con GSSP4 y los tratados con solución salina) se evalúan usando el ensayo t de Student.

ES 2 312 594 T3

Ensayo de sensibilidad a insulina in vivo

La sensibilidad a la insulina *in vivo* se examina utilizando pinzas hiperinsulinémicas-euglucémicas de dos etapas de acuerdo con el siguiente protocolo. Se encierran en jaulas roedores de cualquiera de los diversos modelos descritos en el ejemplo 2 durante al menos una semana antes de los procedimientos experimentales. Se realizan cirugías para colocar catéteres en la vena yugular y en la arteria carótida en condiciones estériles usando anestesia con ketamina y xilazina (i.m.). Después de la cirugía, se deja que todos los ratones recuperen la consciencia y se ponen en jaulas individuales. Se administran polipéptidos GSSP4 o vehículo a través de la vena yugular después de la recuperación completa y durante los dos días siguientes. Dieciséis horas después del último tratamiento, se realizan pinzas hiperinsulinémicas-euglucémicas. Los roedores se ponen en dispositivos inmovilizadores y se administra una inyección en embolada de 4 μCi de [^3H] de glucosa (NEN), seguido de una infusión continua del indicador a una dosis de 0,2 $\mu\text{Ci}/\text{min}$ (20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Dos horas después de la infusión del indicador, se recogen 3 muestras de sangre (de 0,3 ml cada una) a intervalos de 10 minutos (-20-0 min) para las mediciones basales. Después se inicia una infusión de insulina (5 mU/kg/min), y se toman muestras de sangre de 100 μl cada 10 minutos para controlar la glucosa plasmática. Se infunde una solución de glucosa al 30% usando una segunda bomba basada en los niveles plasmáticos de glucosa para alcanzar y mantener la euglucemia. Una vez establecido el estado estacionario a 5 mU/kg/min de insulina (velocidad de infusión de glucosa y glucosa plasmática estable), se obtienen 3 muestras de sangre más (de 0,3 ml cada una) para realizar las mediciones de glucosa, [^3H] glucosa e insulina (100-120 min). Después se administra una dosis mayor de insulina (25 mU/kg/min.) y las velocidades de infusión de glucosa se ajustan para la segunda pinza euglucémica y se toman muestras de sangre en el minuto 220-240. La actividad específica de la glucosa se determina en plasma desproteinizado y se realizan los cálculos de Rd y de producción de glucosa hepática (HGO), como se describe (Lang *et al.*, Endocrinology 130:43,1992). Después se determinan los niveles plasmáticos de insulina en el periodo basal y después de infusiones de 5 y 25 mU/kg/min y se comparan entre roedores tratados con GSSP4 y tratados con vehículo.

La regulación por medio de la insulina de la homeostasis de la glucosa tiene dos componentes principales; estimulación de la captación de glucosa periférica y supresión de la producción de glucosa hepática. Usando estudios de indicadores en las pinzas de glucosa, es posible determinar la parte de la respuesta a la insulina que está afectada por los polipéptidos GSSP4.

Ejemplo 4

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre ratones alimentados con una dieta de alto contenido de grasa

Se realizan experimentos usando ratones C57BL/6 de aproximadamente 6 semanas de edad (8 por grupo). Todos los ratones se encierran individualmente. Los ratones se mantienen con una dieta de alto contenido de grasa a lo largo de todos los experimentos. La dieta de alto contenido de grasa (dieta de cafetería; D12331 de Research Diets, Inc.) tiene la siguiente composición: 16% de kcal de proteínas, 26% de kcal de carbohidratos y 58% de kcal de grasa. La grasa se compone principalmente de aceite de coco, hidrogenado.

Después de alimentar a los ratones con la dieta de alto contenido de grasa durante 6 días, se insertan bombas microosmóticas usando anestesia con isoflurano, y se usan para proporcionar polipéptidos GSSP4 de longitud completa, fragmentos de polipéptido GSSP4, solución salina y un péptido irrelevante a los ratones por vía subcutánea (s.c.) durante 18 días. Los polipéptidos GSSP4 se proporcionan a dosis de 100, 50, 25 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{día}$ y el péptido irrelevante se proporciona a 10 $\mu\text{g}/\text{día}$. Se mide el peso corporal el primer, tercer y quinto día de la dieta de alto contenido de grasa y posteriormente diariamente después del inicio del tratamiento. Se mide el peso corporal final y se extraen muestras finales de sangre por punción cardíaca y se usan para determinar los niveles de triglicéridos (TG), colesterol total (TC), glucosa, leptina e insulina. También se determina la cantidad de alimento consumido al día para cada grupo. La glucosa plasmática se determina por un procedimiento de glucosa oxidasa (Analox GM7) y la insulina plasmática se determina por radioinmunoensayo (Amerlex, Amersham).

Ejemplo 5

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre el nivel plasmático de ácidos grasos libres en ratones C57 BL/6

Se ensaya el efecto de polipéptidos GSSP4 sobre la lipemia posprandial (PPL) en ratones C57BL6/J normales.

Los ratones usados en este experimento se dejan en ayunas durante 2 horas antes del experimento, después de lo cual se toma una muestra de sangre basal. Todas las muestras de sangre se toman de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (50 μl en cada punto de tiempo). A tiempo 0 (8:30 AM), se administra una comida estándar de alto contenido de grasa (6 g de mantequilla, 6 g de aceite de girasol, 10 g de leche desnatada en polvo, 10 g de sacarosa, 12 ml de agua destilada, preparada recientemente siguiendo Nb#6, JF, pg.1) por medio de una sonda (vol.=1% de peso corporal) a todos los animales.

Inmediatamente después de la comida de alto contenido de grasa, se inyectan 25 μg de un polipéptido GSSP4 i.p. en 100 μl de solución salina. Se inyecta de nuevo la misma dosis (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 100 μl) a 45 min y a 1 hora 45 min. A los animales de control se les inyecta solución salina (3x100 μl). Los animales no tratados y tratados se manipulan de forma alterna.

ES 2 312 594 T3

Se toman muestras de sangre a intervalos horarios y se ponen en hielo inmediatamente. Se prepara plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. El plasma se mantiene a -20°C y se determinan los niveles de ácido grasos libres (FFA), triglicéridos (TG) y glucosa en un periodo de 24 horas usando kits de ensayo estándar (Sigma y Wako). debido a que se dispone de una cantidad limitada de plasma, la glucosa se determina por duplicado usando muestras reunidas. Para cada punto de tiempo, se reúnen volúmenes iguales de plasma de los 8 animales por grupo de tratamiento.

Ejemplo 6

10 *Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre el nivel plasmático de leptina e insulina en ratones C57 BL/6*

Se ensaya el efecto de polipéptidos GSSP4 sobre los niveles plasmáticos de leptina e insulina durante la lipemia posprandial (PPL) en ratones C57BL6/J normales. El procedimiento experimental es el mismo que se ha descrito previamente, con la excepción de que la sangre se extrae sólo a las 0, 2 y 4 horas para poder obtener mayores muestras de sangre necesarias para la determinación de la leptina y la insulina por medio de un RIA.

En resumen, se dejan en ayunas 16 ratones durante 2 horas antes del experimento, después de lo cual se toma una muestra de sangre basal. Todas las muestras de sangre se toman de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (100 µl en cada punto de tiempo). A tiempo 0 (9:00AM), se administra una comida estándar de alto contenido de grasa por medio de una sonda (vol.=1% de peso corporal) a todos los animales. Inmediatamente después de la comida de alto contenido de grasa, se inyectan 25 µg de un polipéptido GSSP4 i.p. en 100 µl de solución salina. De nuevo se inyecta la misma dosis (25 µg en 100 µl) a 45 min y a 1 hora 45 min (grupo tratado). A los animales de control se les inyecta solución salina (3x100 µl). Los animales no tratados y tratados se manipulan de forma alterna.

Las muestras de sangre se ponen inmediatamente en hielo y se prepara el plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. El plasma se mantiene a -20°C y se determinan los ácidos grasos libres (FFA) dentro de un periodo de 24 horas usando un kit de ensayo estándar (Wako). La leptina y la insulina se determinan por RIA (ML-82K y SRI-13K, LESTCO Research, Inc., St. Charles, MO) siguiendo el protocolo del fabricante. Sin embargo, sólo se usan 20 µl de plasma. Cada determinación se realiza por duplicado. Debido a que se dispone de una cantidad limitada de plasma, la leptina y la insulina se determinan en 4 grupos de 2 animales cada uno en los dos grupos de tratamiento.

Ejemplo 7

35 *Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre los niveles plasmáticos de FFA, TG y glucosa en ratones C57 BL/6*

Se ha descrito el efecto de polipéptidos GSSP4 sobre los niveles plasmáticos de FFA, TG, glucosa, leptina e insulina durante la lipemia posprandial (PPL) en ratones C57BL6/J normales. Se muestra una pérdida de peso debida a los polipéptidos GSSP4 (2,5 µg/día) administrados a ratones C57BL6/J normales con una dieta de alto contenido de grasa.

El procedimiento experimental es similar al descrito previamente. En resumen, se dejan en ayunas 14 ratones durante 2 horas antes del experimento, después de lo cual se toma una muestra de sangre basal. Todas las muestras de sangre se toman de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (50 µl en cada punto de tiempo). A tiempo 0 (9:00AM), se administra una comida estándar de alto contenido de grasa por medio de una sonda (vol.=1% de peso corporal) a todos los animales. Inmediatamente después de la comida de alto contenido de grasa, a 4 ratones se les inyectan 25 µg de un polipéptido GSSP4 i.p. en 100 µl de solución salina. Se inyecta de nuevo la misma dosis (25 µg en 100 µl) a 45 min y a 1 h 45 min. Un segundo grupo de tratamiento recibe 3 veces 50 µg de polipéptido GSSP4 a los mismos intervalos. A los animales de control se les inyecta solución salina (3x100 µl). Los animales no tratados y tratados se manipulan de forma alterna.

Las muestras de sangre se ponen inmediatamente en hielo. Se prepara plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. El plasma se mantiene a -20°C y se determinan los niveles de ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos (TG) y glucosa en un periodo de 24 horas usando kits de ensayo estándar (Sigma y Wako).

Ejemplo 8

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre FFA después de la inyección de epinefrina

En ratones, los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres aumentan después de la administración intragástrica de una comida de ensayo de alto contenido de grasa/carbohidratos. Estos ácidos grasos libres se producen principalmente por la actividad de enzimas lipolíticas, es decir, lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa hepática (HL). En esta especie, estas enzimas se encuentran en cantidades significativas tanto unidas al endotelio como circulando libremente en el plasma. Otra fuente de ácidos grasos libres plasmáticos es la lipasa sensible a hormonas (HSL) que libera ácidos grasos libres del tejido adiposo después de la estimulación β-adrenérgica. Para ensayar si los polipéptidos GSSP4 también regulan el metabolismo de los ácidos grasos libres liberados por HSL, se inyecta epinefrina en los ratones.

ES 2 312 594 T3

Los grupos de ratones reciben epinefrina (5 μg) por medio de inyección intraperitoneal. En un grupo tratado se inyecta polipéptido GSSP4 (25 μg) una hora antes y de nuevo junto con epinefrina, mientras que los animales de control reciben solución salina. Se aísla el plasma y se miden los ácidos grasos libres y la glucosa como se ha descrito anteriormente.

5 Ejemplo 9

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre la oxidación de FFA en músculo

10 Para investigar el efecto de polipéptidos GSSP4 sobre la oxidación de ácidos grasos libres en músculo, se aíslan músculos intactos de las patas traseras de ratones C57BL/6J y se mide la oxidación de FFA usando oleato como sustrato (Clee *et al* (2000) *J Lipid Res* 41:521-531; Muoio *et al* (1999) *Am J Physiol* 276:E913-921). La oxidación de oleato en músculo aislado se mide como se ha descrito previamente (Cuendet *et al* (1976) *J Clin Invest* 58:1078-1088; Le Marchand-Brustel (1978) *Am J Physiol* 234:E348-E358). En resumen, se sacrifican ratones por dislocación cervical y se aíslan rápidamente los músculos soleus y EDL de las patas traseras. El tendón distal de cada músculo se fija a una pieza de sutura para facilitar la transferencia entre diferentes medios. Todas las incubaciones se realizan a 30°C en 1,5 ml de tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit (NaCl 118,6 mM, KCl 4,76 mM, KH_2PO_4 1,19 mM, MgSO_4 1,19 mM, CaCl_2 2,54 mM, NaHCO_3 25 mM, hepes 10 mM, pH 7,4) suplementado con albúmina de suero bovino sin FFA al 4% (fracción V, calidad RIA, Sigma) y glucosa 5 mM (Sigma). La concentración total de oleato (Sigma) a lo largo del experimento es 0,25 mM. Todos los medios se oxigenan (95% de O_2 ; 5% de CO_2) antes de la incubación. La mezcla de gas se hidrata a lo largo de todo el experimento burbujeando a su través un lavador de gases (Kontes Inc., Vineland, NJ).

25 Los músculos se aclaran durante 30 min en medio de incubación con oxigenación. Los músculos después se transfieren a medio nuevo (1,5 ml) y se incuban a 30°C en presencia de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-ácido oleico (American Radiolabeled Chemicals). Los viales de incubación que contienen este medio se cierran herméticamente con un tabique de goma del cual se suspende un pocillo central que lleva una pieza de papel Whatman (1,5 cm x 11,5 cm).

30 Después de un periodo de incubación inicial de 10 min con oxigenación constante, se retira la circulación de gas para cerrar el sistema al medio exterior y los músculos se incuban durante 90 min a 30°C. Al final de este periodo, se inyectan 0,45 ml de Solvable (Packard Instruments, Meriden, CT) en el papel Whatman en el pocillo central y se detiene la oxidación de oleato por el músculo transfiriendo el vial a hielo.

35 Después de 5 min, se retira el músculo del medio y también se retira una alícuota de 0,5 ml de medio. Los viales se cierran de nuevo y se inyecta 1 ml de ácido perclórico al 35% con una jeringa en el medio perforando a través del tabique de goma. El CO_2 liberado del medio acidificado se recoge por el Solvable en el pocillo central. Después de un periodo de recolección de 90 min a 30°C, se retira el papel Whatman del pocillo central y se pone en viales de centelleo que contienen 15 ml de fluido de centelleo (HionicFlour, Packard Instruments, Meriden, CT). La cantidad de radiactividad ^{14}C se cuantifica por recuento de centelleo de líquidos. La velocidad de oxidación de oleato se expresa como nmol de oleato producido en 90 min/g de músculo.

40 Para ensayar el efecto de gACRP30 o ACRP30 sobre la oxidación de oleato, estas proteínas se añaden al medio a una concentración final de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y se mantienen en el medio a lo largo de todo el procedimiento.

45 Ejemplo 10

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre los triglicéridos en músculo e hígado aislado de ratones

50 Para determinar si el aumento de la oxidación de FFA inducida por polipéptidos GSSP4 también va acompañado de un aumento de la liberación de FFA en el músculo o hígado, se mide el contenido de triglicéridos en músculo de pata trasera o en hígado después del tratamiento de ratones con polipéptido GSSP4. Se extraen muestras de músculo de las patas traseras así como muestras de hígado a partir de animales tratados y no tratados y se determina la concentración de triglicéridos y de ácidos grasos libres siguiendo un método convencional de extracción de lípidos (Shimabukuro *et al* (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4637-4641) seguido de un análisis de TG y FFA usando kits de ensayo convencionales.

Ejemplo 11

Efecto de polipéptidos GSSP4 sobre FFA después de la inyección de Intralipid

60 En dos grupos de ratones se inyectan en embolada por vía intravenosa (a través de la vena de la cola) 30 μl de Intralipid-20% (Clintec) para generar una elevación repentina de los niveles plasmáticos de FFA, evitando de esta manera la absorción intestinal. (Intralipid es una emulsión grasa intravenosa usada en terapia nutricional). En un grupo tratado (tratado con polipéptido GSSP4) se inyecta polipéptido GSSP4 (25 μg) a 30 y 60 minutos antes de administrar Intralipid, mientras que los animales de control (\blacktriangle control) recibieron solución salina. Se aísla el plasma y se miden los FFA como se ha descrito previamente. Después se controla el efecto de los polipéptidos GSSP4 sobre la reducción de los niveles plasmáticos de FFA después del pico inducido por la inyección de Intralipid.

ES 2 312 594 T3

Ejemplo 12

Ensayos de actividad relacionada con la obesidad en seres humanos

- 5 Los ensayos de la eficacia en seres humanos se realizan de acuerdo con las recomendaciones de un médico y con pautas establecidas. Los parámetros ensayados en ratones también se ensayan en seres humanos (por ejemplo, la ingesta de alimentos, peso, TG, TC, glucosa, insulina, leptina y FFA). Es de esperar que los factores fisiológicos muestren cambios a corto plazo. Los cambios en el aumento de peso requerirían un periodo de tiempo más prolongado. Además, la dieta se controla cuidadosamente. GSSP4 se administra en dosis diarias de aproximadamente 6 mg de
- 10 proteína por persona de 70 kg o aproximadamente 10 mg al día. También se ensayan otras dosis, por ejemplo 1 mg o 5 mg al día hasta 20 mg, 50 mg o 100 mg al día.

Ejemplo 13

- 15 *Ensayos de actividad relacionada con la obesidad en un modelo de diabetes lipoatrófica murino*

- Se ha notificado que la leptina invierte la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus en ratones con lipodistrofia congénita (Shimomura *et al.* Nature 401: 73-76 (1999)). Se ha descubierto que la leptina es menos eficaz en un modelo de ratón lipodistrófico diferente de diabetes lipoatrófica (Gavrilova *et al.* Nature 403: 850 (2000); incorporado en la presente memoria en su totalidad incluyendo cualquier dibujo, figura o tabla). La presente invención incluye el uso de GSSP4 o fragmentos polipeptídicos para reducir la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en este modelo sola o en combinación con leptina, el péptido de leptina (solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/155.506), u otros compuestos. Los ensayos incluyen lo descrito previamente en Gavrilova *et al.* ((2000) Diabetes Nov;49(11): 1910-6; (2000) Nature Feb 24;403(6772):850) usando ratones A-ZIP/F-1, con la excepción de que se administra usando los
- 20 métodos descritos previamente en el ejemplo 5 (o ejemplos 8-10). Se ensayan los niveles de glucosa e insulina de los ratones, y se controlan la ingesta de alimento y el peso del hígado, así como otros factores, tales como los niveles de leptina, FFA y TG, medidos típicamente en nuestros experimentos (véase el ejemplo 5, anterior, o los ejemplos 8-10).

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 312 594 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una secuencia de polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3 con actividad relacionada con el metabolismo para la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de ácidos grasos libres en circulación en un individuo, y opcionalmente reducir la masa corporal.

10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medicamento es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un vehículo y dicha secuencia de polipéptido.

10 3. Uso de una secuencia de polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3 con actividad relacionada con el metabolismo para la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de glucosa en circulación en un individuo, y opcionalmente reducir la masa corporal.

15 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho medicamento es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un vehículo y dicha secuencia de polipéptido.

20 5. Uso de una secuencia de polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3 con actividad relacionada con el metabolismo para la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de triglicéridos en circulación en un individuo, y opcionalmente reducir la masa corporal.

25 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho medicamento es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un vehículo y dicha secuencia de polipéptido.

25 7. Uso de una secuencia de polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3 con actividad relacionada con el metabolismo para la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de colesterol en circulación en un individuo, y opcionalmente reducir la masa corporal.

30 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho medicamento es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un vehículo y dicha secuencia de polipéptido.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 312 594 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENSET
5
<120> Polinucleótidos y Polipéptidos GSSP4 y usos de los mismos

<130> 103.WO1
10
<141> 2002-02-09

<150> PCT/IB01/00914
<151> 2001-04-18
15
<150> 60/295.722
<151> 2001-06-04

<150> 60/267.624
<151> 2001-02-09
20

<160> 18
25
<170> Patent.pm

<210> 1
30
<211> 6954
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35
<220>
<221> misc_feature
<222> 1..1237
40
<223> región reguladora 5'

<220>
<221> exon
45
<222> 1238..1377
<223> exon 1

<220>
50
<221> exon
<222> 4050..4175
<223> exon 2

55
<220>
<221> exon
<222> 6322..6702
60
<223> exon 3

<220>
<221> misc_feature
65
<222> 6703..6954
<223> región reguladora 3'

ES 2 312 594 T3

- <220>
<221> alelo
<222> 148
5 <223> VLP-148_A_G : base polimórfica A o G
- <220>
<221> alelo
10 <222> 816
<223> VLP-816_G_A : base polimórfica G o A
- <220>
15 <221> alelo
<222> 924
<223> VLP-924_G_A : base polimórfica G o A
- <220>
20 <221> alelo
<222> 1206
25 <223> VLP-1206_C_A : base polimórfica C o A
- <220>
<221> alelo
30 <222> 1851
<223> VLP-1851_T_C : base polimórfica T o C
- <220>
35 <221> alelo
<222> 2551
<223> VLP-2551_G_A : base polimórfica G o A
- <220>
40 <221> alelo
<222> 3124
45 <223> VLP-3124_C_T : base polimórfica C o T
- <220>
<221> alelo
50 <222> 3563
<223> VLP-3563_G_A : base polimórfica G o A
- <220>
55 <221> alelo
<222> 3792
<223> VLP-3792_G_A : base polimórfica G o A
- <220>
60 <221> alelo
<222> 4417
65 <223> VLP-4417_A_C : base polimórfica A o C

ES 2 312 594 T3

<220>
<221> alelo
<222> 5757
5 <223> VLP-5757_T_C : base polimórfica T o C

<220>
<221> alelo
10 <222> 6322
<223> VLP-6322_A_G : base polimórfica A o G

<220>
15 <221> primer_bind
<222> 82..103
<223> VLP_82_103F

20 <220>
<221> primer_bind
<222> 522..542
25 <223> VLP_522_542F

<220>
<221> primer_bind
30 <222> 1004..1024
<223> VLP_1004_1024R complemento

<220>
35 <221> primer_bind
<222> 999..1020
<223> VLP_999_1021F

40 <220>
<221> primer_bind
<222> 1381..1402
45 <223> VLP_1381_1402P

<220>
<221> primer_bind
50 <222> 1479..1500
<223> VLP_1479_1500R

<220>
55 <221> primer_bind
<222> 1892..1914
<223> VLP 1892 1914P complemento

60 <220>
<221> primer_bind
<222> 1922..1943
65 <223> VLP 1922 1944R complemento

ES 2 312 594 T3

<220>
<221> primer_bind
<222> 2689..2711
5 <223> VLP 2689 2711R complemento

<220>
<221> primer_bind
10 <222> 2937..2958
<223> VLP 2937 2958P

<220>
15 <221> primer_bind
<222> 3260..3281
<223> VLP 3260 3281R complemento

20 <220>
<221> primer_bind
<222> 3475..3497
25 <223> VLP 3475 3498F

<220>
<221> primer_bind
30 <222> 3934..3956
<223> VLP 3934 3956R complemento

<220>
35 <221> primer_bind
<222> 4565..4587
<223> VLP 4565 4587R complemento

40 <220>
<221> primer_bind
<222> 5536..5557
45 <223> VLP 5536 5557F

<220>
<221> primer_bind
50 <222> 6133..6154
<223> VLP 6133 6154P

<220>
55 <221> primer_bind
<222> 6647..6667
<223> VLP_6647_6667R complemento

60 <220>
<221> primer_bind
<222> 6808..6829
65 <223> VLP_6808_6829R complemento

ES 2 312 594 T3

<220>
<221> primer_bind
<222> 128..147
5 <223> VLP_128_148A_F

<220>
<221> primer_bind
10 <222> 128..148
<223> VLP_128_148G_F

<220>
15 <221> primer_bind
<222> 240..261
<223> VLP_240_261R complemento

20 <220>
<221> primer_bind
<222> 2534..2550
25 <223> VLP_2534_2551A_F

<220>
<221> primer_bind
30 <222> 2745..2765
<223> VLP_2745_2765R

<220>
35 <221> primer_bind
<222> 3346..3356
<223> VLP_240_261R

40 <220>
<221> primer_bind
<222> 4401..4416
45 <223> VLP_4401_4417A_F

<220>
<221> primer_bind
50 <222> 4620..4640
<223> VLP_4620_4640R complemento

<220>
55 <221> primer_bind
<222> 6298..6321
<223> VLP_6298_6322G_F

60 <220>
<221> primer_bind
<222> 6298..6322
65 <223> VLP 6298 6322A F complemento

<220>

ES 2 312 594 T3

<221> primer_bind
 <222> 6478..6499
 <223> VLP_6478_6499R complemento

5
 <400> 1

	tcaatgtgga	aacctagac	cctgtgaca	tttgataaga	aaggtttgt	ggatgaatct	60
	gcttgtgaaa	tactacaac	tgcatttccc	acttgggtgtt	tcaaacactt	attagcatat	120
10	gaaaggccct	gaaaagtct	gcaaaaarca	agccggtttg	tgtttcccaa	atthttgact	180
	gtagaagtct	tttatttggt	tatttggtga	ttaacatatt	gcaacacata	ccttgggaaa	240
	tgttggcttt	tattactgtg	gagagaaggc	agatcatctg	acaaagcact	gggagctctc	300
	tctgggtcgt	atgacacaga	gagggctggg	gtcaggggct	tcctcacag	geggaggggc	360
15	catcccghaa	gtcaacttcc	caccagactg	gcatctgaga	ccacogtgtt	tatacactca	420
	oggataaggc	cactctcatg	ctcaccctca	aaactggaag	gccagtgggt	tggtcttggg	480
	acctttcagc	cacagcccat	accagctcgg	ctctgcaggg	tactgagaga	gtgtgtgccc	540
	tgtatgtttg	ctggctttct	gcccctgggt	cattgtacca	agggacactt	getggtgttc	600
	atcctgagcc	catgagagag	caaatectta	tgtgtgtgtc	acttaggaac	atcagcccca	660
20	caagtctggg	ctttttttcc	tcactgtctt	atggctctct	actataattt	taacctttta	720
	gagaaataag	gataccacct	caccctcttc	tgtcttctca	gctacctctg	tggtgagccc	780
	atggtaaatg	cctagataag	tcttgggtgtg	agtgaraggg	aaccaataat	cttgtatggt	840
	gcatagtttg	gtgcagggaa	gcataaatgg	tgatgttgea	aatcccttaa	ttcattacca	900
	gaggctttcc	tctgccccaa	gtargataga	aggataccca	gaggcagaaa	agaacattga	960
25	gtgaaatata	cataactgtc	tgaatcactg	cgttcttggg	agagttagag	caaccgtcaa	1020
	agcccccaa	gtatccattt	ttattgggtt	tgatgttgat	ttgatgttgt	tagagattca	1080
	ggctctcatct	tcgcttctga	gtatcatctga	gtaacatcgg	tgttgagaaa	gggaagagca	1140
	gagatgaggc	atccacaggg	agccctggat	cctgagtgta	aacatctggg	aggaggcggg	1200
	ggatgmagga	gagcctggcc	tccccagctt	gccaggcaca	aggtgagcgg	ggaggaagcg	1260
30	agaggcatct	aagcaggcag	tgttttgcct	tcaccccag	tgaccatgag	aggtgccacg	1320
	cgagtctcaa	tcagtctcct	cctagtaact	gtgtctgact	gtgtgtgat	cacaggggta	1380
	agtcgcctaa	cattctctgt	gccttgggtt	ttgggaagat	gtcagggctc	gcacgggttg	1440
	tgagcccagg	aacctgagc	gaggctctgt	tggctcaaca	cagtgtgaac	caaagggaa	1500
	ggggaattat	gcattaaagg	gattgcatgc	gattttcaga	ctagttagac	ctcactctac	1560
35	taaatgggat	ctgcttttga	gaagctgttc	atgaatcaaa	tcctgttttc	aatgtgttag	1620
	cagagcattg	aacattttga	agttcagtaa	tttggtaaa	tgaagattcc	tattagttaa	1680
	taaggaattc	ctttataaag	tggattggca	aaccttaact	tatcttttgt	gtgaatttta	1740
	atthtttatt	atggctctgat	tcacatatta	atattaatat	taatttacat	agcatgttga	1800
40	cttaattaaa	ggcagtaagc	ttaattaaag	gtggtaagct	tataaacttc	yattgtataa	1860
	acttaacctc	cgcttagaaa	ggatatcttt	gaaactcttt	cactctgtgc	ctgcctagtt	1920
	agttctgaga	ggaatatggg	tgccactaac	attcagctga	gtgtacccca	aagcaagcat	1980
	ccagataaca	agtagatata	cagtctcgaa	gcagagaagc	aaaggttcag	catatgggca	2040
	ctgtacaatt	ggttcaaaat	attcagatca	tggttttctc	tcggaggttt	gcttttacct	2100
45	caaaccacct	tcaaataggg	gcacatgatg	tgatatggta	gcaggacctt	tcttactgaa	2160
	gcagaaagca	atgctgtacc	tgagagcttt	ccatataaaa	tccactggaa	gaaaaggttc	2220
	ggggaagcag	ggaaaactaac	ttttagttca	gcctccacca	gctttttaca	tggatagtg	2280
	aaatgtagag	aaatgccaaa	caattcctgg	aatgggttga	atthttaccat	tcacagaaag	2340
	gacaaattct	ttctttttct	ttttaaagga	aaaaactga	gttcaaaaga	acaaatatta	2400
50	aaggcgagtc	aaatgctttt	gagatccaaa	gcaaaaataa	aaataattgt	gaaggcagaa	2460
	ttatacctaa	tgaagtgttt	acactgtagg	ctgcccctct	atggggtagc	ttgaaaatct	2520
	gggagggcaa	gaacaatgga	gagaagcccc	rgctgctgcg	cggtaggggc	aggagcagcg	2580
	tggttggcct	ggatgccagg	cttgcctcac	caccctgccc	agctccagca	ctggcccaga	2640
55	gtgacagcag	ggcaggcaga	tctgagagcg	gcaggcaaac	atthttcagg	tgaaaagcac	2700
	aatagagagc	actthttccct	aggtgagga	aaccagga	agacaggtga	gtggtgagaa	2760
	cagggcagta	aggggaagtc	aggaaccccc	aggtccccc	catcctccat	gtcctgtgg	2820
	tgtcccaact	ctgattttca	gcaggagccc	aggtccacc	acctctacac	tcccctgctc	2880
	cctggactgt	aactgtcccc	acatccaagg	ctttatgatc	cttcttccaa	gagtgggaca	2940
60	gtgatgcccc	acctctatgg	gagaagaaga	gtcgactggg	gttctcttta	ccccaacccc	3000
	aagcttttgt	ggcctggctg	ggtgtgagac	gtgcccttgc	tgggctggag	acaggcacag	3060
	ctgggtgccc	accaccctga	actcctctgc	atgatctgtg	gagctgacat	ccactctttc	3120
	cctyttgggt	ctgagcaagt	aggaggcttc	caggctctgc	cacgtccca	acagcagcct	3180
	gaaggtgccc	ataggetttt	attggagaag	agtgatccaa	aaccagctt	tgcatttcag	3240
65	ctcagaaaag	ccacatagca	tctctgagaa	tggcaagtgt	ggatgcttct	tcagcaggtc	3300
	cccaactgag	tctggagcag	tttaagagttc	tgtcttcccc	ggctctggct	tttatttaac	3360
	gtgggctcat	gttaaatgtg	agcttatctta	atgtggcctt	ctttacaaat	ggtaccttcc	3420

ES 2 312 594 T3

	ccaaaccagg	cagggccgct	cagctcctgt	tcgogatcc	tctctgggaa	tcatggaagt	3480
	cagtagagaa	accctgggag	aggcacctgt	tcactggggg	gctggccctt	ctgctgaggg	3540
	tgggccactt	gagggccagg	atrgggggtgc	ctccatgcag	aggggagggg	ctgaccacag	3600
5	tgcagagtca	gggctggaga	ctcctgggtcc	aaggcagctc	agtactgacc	accaaggaat	3660
	ttgggccatc	agggctccctc	ccacctctga	gaattctaant	taattcaatt	ccaccagcat	3720
	ccactgagca	tctacttagc	cctagaaaag	ctatgccttc	taacctccag	ccttgctcaga	3780
	aaaggaggac	trtcttctct	ctgagtggcc	tcaggagct	tggaggtttc	ctcagatcca	3840
	gatccaatgc	ccccctgagc	cctgagcctc	ccacagaggg	gagcaaggca	ataaagtgtg	3900
10	gcccagggtg	ttctgttagg	ctagggccgg	gggtgatact	ctcagcctct	tcttgctcca	3960
	tcttgataag	ggcttttttg	atctaccctt	ccctctgct	ttctcttggg	tgcaactaatg	4020
	aactgttccc	ttctctctcc	ctctacaggg	cctgtgagcg	ggatgtccag	tgtggggcag	4080
	gcacctgctg	ttccatcagc	ctgtggcttc	gatgtgcacc	ccgtctgggg	ccgtctgggg	4140
	gggaaggcga	ggagtgccac	ccggcagacc	acaaggctact	ctgcagacac	tgcataggtg	4200
15	cacatatgtg	gggtggccat	goggggagca	gaggggtgatg	tcctggggcc	ttgctctagc	4260
	taggaaggct	agagaggtcg	gctccagaga	ggcagctctag	ggaggtctgtg	gctccagagg	4320
	acttccacct	cctctgatag	ctgatccagc	cctgatccag	ccccgaatg	tccaagggga	4380
	agcagaaggc	tatgggggtg	ctgtgcccct	gccatcnaca	ggcatccacc	ttacttagtg	4440
	ccctgcagat	gacacatttg	tacatttatt	tgtacagggc	ctgacataat	tcatctacaa	4500
20	acttctagca	caggttggag	aaccactgat	ctttatttga	tcctcactgc	aacctggggc	4560
	aatgctgagg	aaactgacat	acagcaaagt	catgtgactt	gctcaaggca	cacaaccaat	4620
	gagacagagc	tgggactgga	actgcagttt	tcgatgccca	cctctagtca	tacctcactg	4680
	atgttgggca	ctgcctcctt	gtttttgggg	ggcagcctca	gggtggagggg	tgccactgat	4740
	cttataggct	gttaaacaag	ctgggcattc	ccagccccta	athtgctgtg	tggacttggg	4800
25	caaaactacct	cacctgctct	caggccacac	ttatatgatg	agtggagcaa	actcactacc	4860
	tctaatgtcc	cttatggatc	tgatgaatcc	agatttggga	aggatctcac	atgccctttg	4920
	ctctgtaaga	aettcocttc	agggaoacaa	aagtagaccc	acaaaategc	cttecaqacc	4980
	tggtcaggcc	tacagtgagg	caagtgaggt	gccacttta	agaagtcact	ctctctgtg	5040
	gcataagtac	atagctcctg	ccttgctccc	actccttgac	ctccagctcc	cagtcagag	5100
30	tcctctggag	ccacagcacc	cctgctgctc	tcctctctg	gagccacttt	accacacttt	5160
	accagttaac	cagtgaagct	cccaattccc	acagcttttt	cattaaaatg	caaatgggtg	5220
	tggttcaatc	tagtctgaca	ttgacatatt	agaaggcaat	tagggcattt	ccacaggtct	5280
	tcaggtgact	tgctttcctc	cctgggcctt	gccctctcc	ctacatgtac	ccctctgtct	5340
35	gaattagaca	ttcctgaaca	caggcttcca	ggcttaccag	ctgtcttcca	cctggcactc	5400
	aggcatgttt	cctgctcttc	ggggacttgc	ctgcacccc	gctcgggtgt	catctctag	5460
	caoggaagct	cctccagcgg	ttctctccc	aatcacagcc	cctgtccaac	cctctgtccc	5520
	aggacgaaga	ggggctaggg	agtggtgaac	gagtcaggac	aatgtggcag	tccttgaac	5580
	cttgggggat	gtgaggtggt	tcagctccag	atccatattc	ccaatacaga	caacagtgat	5640
40	aaaaaaaaacta	atgctgagtg	cttctgtgat	gccacccttc	atactgggtg	ctttttgtta	5700
	ttttaacctc	tttataacca	catgtggtag	gtgctattat	taaaccattt	tacaaygat	5760
	aaagctgagg	cacagagagg	ccaaatgatt	tgetgattat	cacacagctg	ggaagcggta	5820
	gacctgggat	ttgaaccagg	gcagtctgac	aatgggccc	tgctcctaac	ttctccctga	5880
	ggatacccca	ttggtttagc	actcctctag	gggtgtgagtc	agggcagaga	tgggtgctgt	5940
45	cctattcacg	gctgcacttg	cagcaccac	catggttttg	agcccataat	ggatgagcaa	6000
	caaacatcca	atcaatggac	atgtgtgtgc	gtgtgtgtgt	gtgtgtgcac	gcacatgtgt	6060
	gctgagcttc	cagagccagg	tagcctgggt	gcaaatccta	gctcctccac	aaattagctg	6120
	tgtgatcttg	gcgtattgct	tagccacacc	gtacctgggt	ttcctcatct	ctaattgcta	6180
	ttattgttgt	gctaggtgca	gtggagaagt	gggttaggg	gtgggggtga	gacttttccc	6240
50	agtgtggggc	tgagcagaga	ctgtgtccag	gaggcccacc	tacctccctt	tgggtgaagg	6300
	gttgattttct	tctctcctta	grtccccttc	ttcaggaaac	gcaagcacca	cacctgtcct	6360
	tgettgccca	aectgctgtg	ctccaggttc	cgggacggca	ggtaccogctg	ctccatggac	6420
	ttgaagaaca	tcaattttta	ggcgcttgc	tggctccagg	ataccacca	tcctttctct	6480
	gagcacagcc	tggattttta	ttctgtccat	gaaaccagc	tcocatgact	ctccagctcc	6540
55	ctacactgac	tacctgate	tctctgtct	agtaogcaca	tatgcacaca	ggcagacata	6600
	cctcccatca	tgacatggtc	cccaggctgg	cctgaggatg	tcacagcttg	aggctgtggt	6660
	gtgaaagggtg	gccagcctgg	ttctctccc	tgtctaggct	gccagagagg	tggtaaatgg	6720
	cagaaaggac	attccccctc	ccctcccag	gtgacctgct	ctctttcctg	ggccctgccc	6780
	ctctccccac	atgtatccct	cggtctgaat	tagacattcc	tgggacaggg	ctcttgggtg	6840
60	cattgtctcag	agtcaccaggt	cctggcctga	ccctcagccc	cttcacgtga	ggctctgtgag	6900
	gtccaatttg	ggcgccctcc	tccttccctc	gattgggttaa	ctccttagtt	tcag	6954

<210> 2

65 <211> 666

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 312 594 T3

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> 1..20
 5 <223> matriz de Von Heijne, puntuación: 7,21 sec: VSIMLLLVTVSDC/AV

<220>
 <221> 5'UTR
 10 <222> 1..68

<220>
 <221> CDS
 15 <222> 69..386

<220>
 <221> 3'UTR
 20 <222> 387..666

<220>
 <221> alelo
 25 <222> 266
 <223> VLP_6322_A_G : base polimórfica A o G

30 <400> 2

```

acaaggctga gcgggaggaa gcgagaggca tctaagcagg cagtgttttg ccttcacccc      60
aagtgacc atg aga ggt gcc acg cga gtc tca atc atg ctc ctc cta gta      110
      Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val
      1           5           10
act gtg tct gac tgt gct gtg atc aca ggg gcc tgt gag cga gat gtc      158
Thr Val Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val
15           20           25           30
cag tgt ggg gca ggc acc tgc tgt gcc atc agc ctg tgg ctt cga ggg      206
Gln Cys Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly
      35           40           45
ctg cgg atg tgc acc ccg ctg ggg cgg gaa ggc gag gag tgc cac ccc      254
Leu Arg Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro
      50           55           60
ggc agc cac aag atc ccc ttc ttc agg aaa cgc aag cac cac acc tgt      302
Gly Ser His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys
      65           70           75
cct tgc ttg ccc aac ctg ctg tgc tcc agg ttc ccg gac ggc agg tac      350
Pro Cys Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr
      80           85           90
cgc tgc tcc atg gac ttg aag aac atc aat ttt taggcgcttg cctggtotca      403
Arg Cys Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      95           100          105
ggatacccac catccttttc ctgagcacag cctggatttt tatttctgcc atgaaacca      463
gctcccatga ctctccagct cctacaactg actaccctga tctctcttgt ctagtacgca      523
catatgcaca caggcagaca tacctcccat catgacatgg tcccaggct ggccctgagga      583
tgtcacagct tgaggctgtg gtgtgaaagg tggccagcct ggttctcttc cctgctcagg      643
60 ctgcaactgaa aaaaaaaaaa aaa      666
  
```

<210> 3
 <211> 105
 65 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 312 594 T3

<400> 3

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
 1 5 10 15
 5 Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
 20 25 30
 Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
 35 40 45
 10 Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
 50 55 60
 His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
 65 70 75 80
 15 Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 100 105

<210> 4

20 <211> 47
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

30 catctgggag gaggcggggg atgmaggaga gcctggcctc cccagct 47

<210> 5

<211> 47
 35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

40 ggccctgaaa agttctgcaa aarcaagcc ggtttgtgtt tcccaaa 47

<210> 6

45 <211> 47
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

55 aagggtgtaa gcttataaac ttcyattgta taaacttaac ctccgct 47

<210> 7

60 <211> 47
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

65 caagaacaat ggagagaagc cccrgctgct gcgcggtgag ggcagga 47

ES 2 312 594 T3

<210> 8
<211> 47
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

10 **gagctgacat ccactctttc cctyttgggt ctgagcaagt aggaggc** 47

<210> 9
15 <211> 47
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 9

ctgggccact tgagggccag gatrggggtg cctccatgca gagggga 47

25 <210> 10
<211> 47
<212> ADN
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

35 **agccttgta gaaaaggagg actrtcttcc ttctgagtgg cctccag** 47

<210> 11
40 <211> 47
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 11

ggggttgctg tgcccctgcc atcmacaggc atccacctta cttagtg 47

50 <210> 12
<211> 47
<212> ADN
55 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

60 **ctattattaa accattttac aaaygataaa gctgaggcac agagagg** 47

<210> 13
65 <211> 47
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 312 594 T3

<400> 13

5 **gtgttgattt ettctctcct tagrtcccct tcttcaggaa acgcaag** 47

<210> 14

<211> 47

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

15 **tagataagtc ttgggtgtgag tgaragggaa ccaataatct tgtatgt** 47

<210> 15

20 <211> 47

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 15

30 **gaggetttcc tctgccccea gtargataga aggatacca gaggcag** 47

<210> 16

<211> 47

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

40 **ctgtttctag tgtctggtgg agayatcaat ttaaagagct cttcaga** 47

<210> 17

45 <211> 47

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 17

55 **actgtgtttc ttttttcttt ttcstcttct tttttatggt tttaaaa** 47

<210> 18

<211> 47

<212> ADN

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

65 **tcaagctgaa gggatgcttt ggcytgactt ccaccacctg ggctcat** 47

103.US2.PRO