



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 139**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04812804 .5**
96 Fecha de presentación : **02.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1701978**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Uso de T-cadherina soluble para el tratamiento de trastornos metabólicos.**

30 Prioridad: **03.12.2003 US 526956 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2009

73 Titular/es: **WHITEHEAD INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH
Nine Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es: **Hug, Christopher y
Lodish, Harvey, F.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 320 139 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

Uso de T-cadherina soluble para el tratamiento de trastornos metabólicos.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al uso de polipéptidos de T-cadherina para tratar un trastorno metabólico. Los trastornos metabólicos que pueden tratarse usando un agente modulador según la presente invención incluyen, por ejemplo, la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia.

Antecedentes de la invención1. *T-cadherina*

Las cadherinas comprenden una gran familia de proteínas de la superficie celular involucradas en interacciones célula-célula y en la transmisión de señales mediadas por el calcio. Las cadherinas exhiben especificidad evolucionista y frente al tipo de célula en la expresión y están anormalmente reguladas en varias enfermedades del ser humano (véase, por ejemplo, Conacci-Sorrell *et al*, 2002).

La T-cadherina, también conocida como H-cadherina o cadherina-13, está unida a la membrana vía un anclaje GPI en el terminal C (Tanihara *et al*, 1994). Comparada con otros miembros de la familia de las cadherinas, la T-cadherina carece del dominio transmembrana y se libera de la superficie celular tras el tratamiento de las células con fosfatidilinositol fosfolipasa-C. La T-cadherina fue inicialmente descrita en el sistema nervioso, pero su distribución en los tejidos está más extendida, con la mayor expresión en el sistema cardiovascular y las concentraciones más bajas en el músculo. En el sistema vascular, está localizada en las capas íntima y media y es expresada en las células del músculo endotelial y liso (Ivanov *et al*, 2001).

En la superficie celular se encuentran dos formas de T-cadherina. Una de ellas, un polipéptido de 135 kDa, se escinde cerca del terminal N para generar una segunda forma de 105 kDa (Tkachuk *et al*, 1998). Ambas formas de la proteína se encuentran en la superficie celular, en la que son capaces de enlazarse a partículas de LDL por medio de la asociación del anclaje GPI con lipoproteínas (Niermann *et al*, 2000).

Aunque no se conoce ninguna ruta de transmisión de señales que implique a la T-cadherina, se ha sugerido que la T-cadherina puede participar en la transmisión de señales por medio de su asociación con otras proteínas de la membrana y su incorporación en dominios lipídicos específicos de la membrana celular (Doyle *et al*, 1998). Se ha mostrado que la T-cadherina puede regular el crecimiento de células en el sistema nervioso (Takeuchi *et al*, 2000). Además, la T-cadherina suprime el crecimiento de astrocitos y es reducida en una línea de células de glioblastoma (Huang *et al*, 2003). También se ha sugerido que la T-cadherina puede estar implicada en el control de la arquitectura vascular normal y en su remodelación durante la aterogénesis (Ivanov *et al*, 2001).

El documento US 6358920 describe un enorme número de péptidos cortos derivados de más de 20 cadherinas diferentes. Sólo se refiere vagamente al tratamiento de los trastornos metabólicos, de la diabetes y de la obesidad modulando agentes que comprenden un octapéptido que representa una secuencia de aminoácidos de reconocimiento de la adhesión celular.

El documento WO99/19477 enseña que los péptidos, que son escindidos de las Pro-cadherinas aunque son procesados por las correspondientes cadherinas, representan las denominadas “regiones del factor de crecimiento derivado de las cadherinas” (CGFRs) y que las actividades de estas CGFRs pueden explotarse terapéuticamente. En este contexto, describe la CGFR de T-cadherina para el tratamiento de un trastorno metabólico. Esta CGFR consiste en los aminoácidos 23-138 de la SEQ ID NO: 1.

El documento WO2004/096272 describe formas solubles de T-cadherina, en el que dichas formas solubles son polipéptidos que consisten en fragmentos de hasta 118 aminoácidos de un polipéptido que consiste en los aminoácidos 23 a 692 de la SEQ ID NO: 1. También describe usos médicos para los trastornos metabólicos de estas formas solubles.

2. *Obesidad*2.1. *Síntomas*

La obesidad es la acumulación de grasa corporal excesiva. La gravedad de la obesidad se determina midiendo la altura y el peso. Con frecuencia, estas medidas se convierten en el índice de masa corporal (IMC): el peso en kilogramos dividido entre la altura en metros elevada al cuadrado. Un valor de 25 a 29,9 indica sobrepeso u obesidad suave, y un valor de 30 ó mayor indica obesidad y la necesidad de tratamiento. En los Estados Unidos, el sobrepeso y la obesidad afectan ahora a más del 50% de los adultos, reflejando un aumento rápido en su extensión.

La obesidad se produce consumiendo más calorías que las que usa el cuerpo. En el peso corporal influyen factores genéticos y medioambientales, pero precisamente todavía no está claro cómo interactúan para determinar el peso

de una persona. Una investigación reciente sugiere que, en promedio, la influencia genética contribuye en aproximadamente un 33 por ciento al peso corporal. Un incremento del tamaño o del número de células grasas o de ambos aumenta la cantidad de grasa almacenada en el cuerpo. Las personas obesas, particularmente las que llegan a ser obesas durante la infancia, pueden tener hasta cinco veces más de células grasas que las personas de peso normal. Debido a que no puede reducirse el número de células, sólo puede perderse peso reduciendo la cantidad de grasa en cada célula.

La acumulación de grasa en exceso debajo del diafragma y en la pared del pecho puede ejercer presión sobre los pulmones, provocando dificultad en respirar y brevedad de la respiración, incluso con un mínimo esfuerzo. La dificultad en respirar puede interferir seriamente con el sueño, provocando el cese momentáneo de la respiración (apnea del sueño), lo que conduce a somnolencia durante el día y otras complicaciones. La obesidad también puede provocar problemas ortopédicos, trastornos de la piel e hinchamiento de pies y tobillos. Las complicaciones graves de la obesidad incluyen un riesgo mucho mayor de trastorno de la arteria coronaria y de sus factores principales de riesgo diabetes tipo II, hiperlipidemia e hipertensión. Gran parte de la morbilidad asociada con la obesidad está asociada con la diabetes del tipo II, ya que la diabetes y la obesidad malamente controladas conducen a una constelación de síntomas que son conjuntamente conocidos como síndrome X, o síndrome metabólico (véase, por ejemplo, Roth *et al*, 2002).

2.2. Tratamiento

La mayoría de los programas de gestión del peso están basados en una modificación del comportamiento. Hacer dieta se considera usualmente menos importante que realizar cambios permanentes en los hábitos alimentarios y de ejercicio. Los médicos están crecientemente prescribiendo fármacos tales como orlistat o sibutramina para reducir el peso corporal. Tal fármaco puede reducir el peso en aproximadamente 10 por ciento antes de 6 meses y mantiene la pérdida en tanto y cuanto se continúe con el fármaco. Sin embargo, cuando se cesa, el peso se recupera rápidamente, y los efectos a largo plazo de los tratamientos actuales de la obesidad son decepcionantes. Aunque se ha hecho un considerable progreso para ayudar a las personas a perder peso, usualmente lo recuperan antes de 3 años. Las muchas complicaciones serias de la obesidad hacen importante el tratamiento, y el tratamiento quirúrgico está llegando a ser más y más común en el caso de obesidad grave.

3. Diabetes

3.1. Síntomas

La diabetes es un trastorno en el que las concentraciones de glucosa en sangre son anormalmente altas porque el cuerpo no libera o usa insulina adecuadamente. La diabetes se produce cuando el cuerpo no produce suficiente insulina para mantener normales las concentraciones de azúcar en sangre o cuando las células no responden apropiadamente a la insulina.

Las personas con diabetes del tipo I (diabetes dependiente de la insulina) producen poca o ninguna insulina en absoluto. Aunque aproximadamente el 6 por ciento de la población de los Estados Unidos tiene alguna forma de diabetes, sólo aproximadamente el 10 por ciento de todos los diabéticos tienen el trastorno del tipo I. La mayoría de las personas que tienen diabetes tipo I desarrollan el trastorno antes de los 30 años de edad. En la diabetes del tipo I más del 90 por ciento de las células que producen insulina (células beta) del páncreas están permanentemente destruidas. La deficiencia resultante de insulina es grave, y para sobrevivir, una persona con diabetes del tipo I tiene que inyectarse regularmente insulina.

En la diabetes del tipo II (diabetes no dependiente de la insulina), el páncreas continúa fabricando insulina, algunas veces incluso en concentraciones mayores que las normales. Sin embargo, el cuerpo desarrolla resistencia a sus efectos, dando lugar a una deficiencia relativa de insulina. La diabetes del tipo II puede ocurrir en niños y adolescentes pero usualmente comienza después de los 30 años de edad y llega a ser progresivamente más común con la edad: aproximadamente el 15 por ciento de las personas con una edad superior a 70 años tienen la diabetes del tipo II. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes del tipo II, y de 80 a 90 por ciento de las personas con este trastorno son obesas.

Otras causas menos comunes de la diabetes son concentraciones anormalmente altas de corticosteroides, embarazo (diabetes gestacional), fármacos, y venenos que interfieren con la producción o los efectos de la insulina, dando lugar a altas concentraciones de azúcar en la sangre.

Las personas con la diabetes del tipo II puede que no tengan ningún síntoma durante años o décadas. Cuando la deficiencia de insulina progresa pueden desarrollarse síntomas. Las ganas de orinar y la sed crecientes son suaves al principio y empeoran gradualmente durante semanas o meses. Si la concentración de azúcar en la sangre llega a ser muy alta (superando con frecuencia 1.000 mg/dL), la persona puede desarrollar una deshidratación grave, la cual puede conducir a confusión mental, somnolencia, ataques y coma hiperglucémico-hiperosmolar no cetósico.

Con el tiempo, las concentraciones elevadas de azúcar en la sangre dañan los vasos sanguíneos, los nervios y otras estructuras internas. Las sustancias complejas basadas en azúcares se acumulan en las paredes de los vasos sanguíneos provocando que engrosen y tengan pérdidas. Cuando engrosan, suministran menos y menos sangre, especialmente a

la piel y los nervios. Las concentraciones de azúcar en la sangre malamente controladas también tienden a provocar que aumenten las concentraciones en la sangre de las sustancias grasas, dando lugar a aterosclerosis acelerada (la acumulación de placa en los vasos sanguíneos). La aterosclerosis es entre dos y seis veces más común en los diabéticos que en los no diabéticos y se produce tanto en hombres como en mujeres. La mala circulación a través tanto de los vasos sanguíneos grandes como pequeños daña el corazón, el cerebro, las piernas, los ojos, los riñones, los nervios y la piel y hace que la cicatrización de las lesiones sea lenta.

Por todas estas razones, las personas con diabetes pueden experimentar muchas complicaciones graves a largo plazo. Los ataques al corazón y las apoplejías son más comunes. El daño a los vasos sanguíneos del ojo puede provocar pérdida de visión (retinopatía diabética). Los riñones pueden funcionar mal, dando lugar al fallo renal que requiere diálisis. El daño de los nervios puede manifestarse de varias maneras. Si un sólo nervio funciona mal (mononeuropatía), un brazo o una pierna puede debilitarse de repente. Si los nervios de las manos, piernas y pies llegan a ser dañados (polineuropatía diabética), la sensación puede llegar a ser anormal y puede desarrollarse una sensación de hormigueo o dolor ardiente en los brazos y en las piernas. El daño a los nervios de la piel provoca lesiones repetidas más probablemente debido a que la persona no puede sentir los cambios de la presión o de la temperatura. El mal suministro de sangre a la piel también puede conducir a úlceras, y todas las heridas cicatrizan lentamente. Las úlceras de los pies pueden llegar a ser por tanto profundas e infectarse y cicatrizar tan malamente que puede ser necesario amputar parte de la pierna.

3.2. Tratamiento

El fin principal del tratamiento de la diabetes es mantener las concentraciones de azúcar en la sangre dentro del intervalo normal tanto como sea posible. Las concentraciones completamente normales son difíciles de mantener, pero cuanto más próximamente puedan mantenerse dentro del intervalo normal, menos probablemente se desarrollarán complicaciones temporales o a largo plazo. El principal problema con tratar de controlar estrechamente las concentraciones de azúcar en la sangre es un riesgo acrecentado de excederse, dando lugar a bajas concentraciones de azúcar en la sangre (hipoglucemia).

El tratamiento de la diabetes requiere atención para controlar el peso, hacer ejercicio y llevar una dieta. Muchas personas obesas con diabetes del tipo II no necesitarían medicación si perdieran peso y realizaran ejercicio regularmente. Sin embargo, como se discutió anteriormente, la reducción de peso es difícil. Por lo tanto, con frecuencia es necesaria una terapia de reemplazamiento de la insulina o una medicación hipoglucémica oral.

Los fármacos hipoglucémicos orales tales como glipizida, gliburida, tolbutamida, y clorpropamida pueden disminuir las concentraciones de azúcar en la sangre adecuadamente en personas con diabetes del tipo II estimulando al páncreas a liberar insulina y aumentando su efectividad. Otro tipo de fármaco oral, la metformina, aumenta la respuesta del cuerpo a su propia insulina. Aún otro fármaco, la acarbosa, funciona retrasando la absorción de glucosa en el intestino. Si estos fármacos hipoglucémicos orales no pueden controlar el azúcar en la sangre bastante bien, se necesita una terapia de reemplazamiento de la insulina.

Una terapia de reemplazamiento de la insulina puede conseguirse sólo mediante inyecciones diarias, siendo así un tratamiento pesado. Se están ensayando nuevas formas de insulina, tales como una pulverización nasal. Hasta la fecha, estas nuevas formas no han funcionado bien debido a que la variabilidad en la tasa de absorción conduce a problemas para la determinación de la dosis.

4. Acrp30

El tejido adiposo, aunque largamente conocido por su capacidad para almacenar grasa, tiene un papel importante como fuente de varias hormonas y agentes mediadores paracrinos, que incluyen la resistina, la adiposina, la leptina, y el TNF- α . Colectivamente, estas moléculas se denominan adipoquinas, para enfatizar su papel como hormonas y sitio de síntesis. La Acrp30, también denominada adiponectina o ApM-1, es una de tales adipoquinas y es exclusivamente producida por el tejido adiposo.

La Acrp30 de ratón se identificó en primer lugar en 1995 (Scherer *et al*, 1995), y se mostró que era regulada por encima de 100 veces durante la diferenciación de los adipocitos. El homólogo en ser humano se identificó en 1996 (Maeda *et al*, 1996). La Acrp30 contiene una secuencia señal amino terminal, seguida por una región central que comprende repeticiones de colágeno, y un dominio carboxi-terminal con homología con el factor globular C1q del complemento. Cuando se usa en la presente memoria, el término "Acrp30" se refiere tanto a proteínas de ser humano como murina, y a sus homólogos en cualquier otra especie.

4.1. El papel de Acrp30 en la obesidad y la diabetes del tipo II

Varios estudios han demostrado que Acrp30 está unida a la obesidad y a la diabetes del tipo II. Los datos genéticos han demostrado el encadenamiento de la diabetes del tipo II con polimorfismos no codificantes de un único nucleótido (SNPs) localizados dentro del gen de Acrp30 en una cohorte japonesa de pacientes (Hara *et al.*, 2002). Además, se demostró que las mutaciones de sentido erróneo que afectan a la cabeza globular están correlacionadas con la concentración de Acrp30 en el suero (Kondo *et al*, 2002).

Además, la concentración en el suero de Acrp30 disminuye en varios modelos de obesidad, que incluyen ratones deficientes en leptina, ratones deficientes en el receptor de la leptina, y modelos de monos (véase, por ejemplo, Hu *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 2001). En estudios en seres humanos, la concentración de Acrp30 está inversamente correlacionada tanto con la diabetes como con la obesidad, y además se reduce en pacientes con trastorno de la arteria coronaria (Arita *et al.*, 1999). Más evidencia de una relación causal entre las concentraciones reducidas de Acrp30 y el desarrollo de resistencia a la insulina y de diabetes del tipo II fue obtenida por Lindsay *et al.* (2002), quienes demostraron que los individuos de la población India de Pima que tenían menores concentraciones de Acrp30 en el suero tenían mayor probabilidad de desarrollar la diabetes del tipo II que aquellos con mayores concentraciones.

Los experimentos de disrupción de genes dieron una evidencia que soportaba la implicación de Acrp30 en la obesidad y en la diabetes del tipo II. Maeda *et al.* (2002) encontraron que los ratones homocigotos deficientes en Acrp30 no fueron hiperglucémicos cuando se mantuvieron con una dieta normal, pero que exhibieron un aclaramiento reducido de ácidos grasos libres en el suero. Cuando se cambiaron a una dieta rica en grasas y en sacarosa, exhibieron una grave resistencia a la insulina y demostraron una ganancia de peso acrecentada con relación a animales testigo.

Además de su papel pivotal en la obesidad y en la diabetes, se ha mostrado que Acrp30 juega un papel en otros trastornos tales como, por ejemplo, el síndrome de los ovarios poliquísticos (Panidis *et al.*, 2003), el cáncer endometrial (Petridou *et al.*, 2003), la preeclampsia (Ramsay *et al.*, 2003), el hígado graso (Xu *et al.*, 2003) y síndrome nefrótico (Zoccali *et al.*, 2003). También se ha mostrado que Acrp30 exhibe propiedades anti-inflamatorias (Yolcota *et al.*, 2000).

A la vista de los estudios anteriores, la Acrp30 exógena es un factor terapéutico prometedor para tratar varios trastornos que incluyen trastornos metabólicos tales como la obesidad y la diabetes del tipo II, trastornos ginecológicos, trastornos del hígado y trastornos inflamatorios crónicos.

4.2. Las diferentes especies de Acrp30

La Acrp30 está presente en el suero en alta concentración (5-10 $\mu\text{g/mL}$) y existe como múltiples asociaciones de diferentes pesos moleculares aparentes (Scherer *et al.*, 1995).

La estructura de estas especies de diferente peso molecular aparente fue investigada por Tsao *et al.* (2002, 2003). Cuando se expresó en bacterias como una proteína de fusión de longitud completa y se separó por cromatografía de exclusión molecular, se identificaron tres especies de Acrp30: hexámeros y dos especies de trímeros. Los estudios de expresión en células eucariotas generaron tres especies de Acrp30: una especie de alto peso molecular (HMW), que no se ve en la proteína producida en bacterias, y especies que corresponden a hexámeros y a una especie de trímeros.

Varios estudios se han centrado en polipéptidos que comprenden la cabeza globular de Acrp30, de aquí en adelante denominada gAcrp30. Hay diferencias entre las actividades *in vivo* de Acrp30 y gAcrp30, aunque los dos polipéptidos comparten varias similitudes. Tras un tratamiento a largo plazo con proteína recombinante, hay una mayor reducción en el peso con la inyección de gAcrp30 en comparación con Acrp30, a pesar de una falta de diferencia en la ingesta de comida (Fruebis *et al.*, 2001). Por otra parte, Acrp30 redujo la producción de glucosa sinérgicamente con la insulina, mientras que gAcrp30 no tuvo ninguna actividad en este ensayo (Berg *et al.*, 2001).

Para determinar la actividad potencial de estas especies diferentes, se ensayaron varios elementos de respuestas transcripcionales que impulsan la expresión de un gen reportero de luciferasa en miocitos C2C12, células que se sabe responden a Acrp30 (Tsao *et al.*, 2003). El promotor de la E-selectiva que responde al factor de transcripción NF- κ B demostró una actividad acrecentada en respuesta a la adición de Acrp30. Sólo las especies de hexámero fraccionado y de HMW fueron activas, mientras que tanto gAcrp30 como el trímero fueron inactivos en este ensayo. IL-6, cuya expresión es acrecentada por NF- κ B en miotubos C2C12, es producida en altas concentraciones por el músculo esquelético durante el ejercicio, y se piensa que activa la producción acrecentada de ácidos grasos y de glucosa en el tejido adiposo y en el hígado, proporcionando así un aumento del combustible circulante para el uso por el músculo (Febraio *et al.*, 2002; Kosmidou *et al.*, 2002). Por tanto, las especies de hexámeros y de HMW de Acrp30 pueden estimular indirectamente la lipólisis del tejido graso por medio de la liberación de IL-6 inducida por el factor de transcripción NF- κ B en el músculo esquelético (Tsao *et al.*, 2003).

Estando Acrp30 implicada en la obesidad y en la diabetes del tipo II, la modulación de proteínas de la ruta de transmisión de señales de Acrp30 es una opción para el tratamiento de trastornos metabólicos tales como la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia. Sin embargo, el aislamiento de los receptores de Acrp30 se ha mostrado esquivo. Se ha descrito *in vitro* el enlace de Acrp30 a colágenos y a células endoteliales aórticas de ser humano (HAECs) (Okamoto *et al.*, 2000). Recientemente, se han descrito dos receptores de Acrp30 globular y de longitud completa, denominados AdipoR1 y AdipoR2, de función desconocida (Yamauchi *et al.*, 2003). Se predice que estos dos receptores de Acrp30 contienen siete dominios transmembrana, pero que son estructural y funcionalmente distintos de los receptores acoplados a proteínas G. Sin embargo, los receptores de las especies de hexámeros y de HMW de Acrp30 no han sido descritos en la bibliografía científica.

Breve resumen de la invención

La presente invención es consecuencia del hallazgo de un nuevo receptor de Acrp30. Específicamente, se ha mos-
 5 trado en el marco de la presente invención que la T-cadherina es un receptor de las especies de hexámeros y de alto
 peso molecular (HMW) de Acrp30.

Por lo tanto, un primer aspecto de la memoria descriptiva se refiere al uso de un polipéptido de T-cadherina
 como una diana para seleccionar agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de
 10 un trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno
 inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la
 T-cadherina.

Un segundo aspecto se refiere al uso de un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina para la preparación
 de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico,
 15 un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal.

Un tercer aspecto se refiere al uso de un polipéptido de T-cadherina como diana para la selección de socios de
 enlace naturales, en el que dicho socio de enlace natural es un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno
 20 seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio
 crónico y un trastorno hepático o renal.

Un cuarto aspecto se refiere al uso como medicamento de una forma soluble de T-cadherina.

Un quinto aspecto, el cual representa la presente invención, se refiere al uso de una forma soluble de T-cadherina
 25 para la preparación de un trastorno metabólico.

Un sexto aspecto se refiere a un método para evaluar la eficiencia de un agente modulador de un polipéptido de T-
 cadherina para el tratamiento de la obesidad, comprendiendo dicho método administrar dicho agente modulador a un
 modelo animal para la obesidad, en el que una determinación de que dicho agente modulador mejora una característica
 30 representativa de la obesidad en dicho modelo animal indica que dicho agente modulador es un fármaco para el
 tratamiento de la obesidad.

Un séptimo aspecto se refiere a un método para evaluar la eficiencia de un agente modulador de un polipéptido
 de T-cadherina para el tratamiento de la diabetes del tipo II, comprendiendo dicho método administrar dicho agente
 35 modulador a un modelo animal para la diabetes del tipo II, en el que una determinación de que dicho agente modulador
 mejora una característica representativa de la diabetes del tipo II en dicho modelo animal indica que dicho agente
 modulador es un fármaco para el tratamiento de la diabetes del tipo II.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 muestra el resultado de los ensayos de enlace clasificadores de células activados por fluorescencia de
 células C2C12, CHO y Ba/F3, como se explica en el ejemplo 2.

La figura 2 muestra el resultado del ensayo de enlace clasificador de células activado por fluorescencia de células
 45 testigo Ba/F3 y de células Ba/F3 que expresan T-cadherina, como se explica en el ejemplo 4.2.

La figura 3A muestra el análisis ELISA de enlace de diferentes especies de Acrp30 a células CHO-GFP, como se
 explica en el ejemplo 4.3.

50 La figura 3B muestra el análisis ELISA de enlace de diferentes especies de Acrp30 a células CHO que expresan
 T-cadherina, como se explica en el ejemplo 4.3.

La figura 4 muestra la activación de NF- κ B en células C2C12, como se explica en el ejemplo 5.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 corresponde al precursor de longitud completa de T-cadherina de ser humano.

SEQ ID NO: 2 corresponde al precursor de longitud completa de Acrp30 de ser humano.

60 SEQ ID NO: 3 corresponde al precursor de longitud completa de Acrp30 murina.

SEQ ID NO: 4 corresponde al precursor de longitud completa de T-cadherina murina.

65 SEQ ID NOS: 5-18 corresponden a las secuencias cebadoras.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es consecuencia del hallazgo de un nuevo receptor de Acrp30. Específicamente, se ha mostrado en el marco de la presente invención que la T-cadherina es un receptor de las especies de hexámeros y de alto peso molecular (HMW) de Acrp30. Se proporcionan datos adicionales que muestran que la sobreexpresión de T-cadherina suprime la transcripción mediada por NF- κ B inducida por Acrp30. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva proporciona medios para identificar compuestos útiles en el tratamiento de trastornos metabólicos tales como, por ejemplo, la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia. Específicamente, la memoria descriptiva se refiere al uso de polipéptidos de T-cadherina como dianas para la selección de sus agentes moduladores. El uso de dichos agentes moduladores para tratar trastornos metabólicos es otro aspecto de la presente memoria descriptiva.

Un primer aspecto de la presente memoria descriptiva se dirige al uso de un polipéptido de T-cadherina como una diana para seleccionar agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la T-cadherina.

Cuando se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión “*polipéptido de T-cadherina*” se refiere tanto a proteínas de T-cadherina de longitud completa como a sus fragmentos biológicamente activos. Los polipéptidos de T-cadherina pueden ser de origen humano o animal. Preferiblemente, los polipéptidos de T-cadherina son de origen humano.

Mucho más preferiblemente, los polipéptidos de T-cadherina de origen humano se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1;
- b) un polipéptido que comprende los aminoácidos 23 a 713 de la SEQ ID NO: 1;
- c) un polipéptido que comprende los aminoácidos 23 a 693 de la SEQ ID NO: 1;
- d) un polipéptido que comprende los aminoácidos 140 a 713 de la SEQ ID NO: 1;
- e) un polipéptido que comprende los aminoácidos 140 a 693 de la SEQ ID NO: 1;
- f) una muteína de cualquiera de (a) a (e), en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos una identidad de 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% con al menos una de las secuencias en (a) a (e);
- g) una muteína de cualquiera de (a) a (e) la cual es codificada por un ácido nucleico que se hibrida con el complemento de una secuencia de DNA que codifica a cualquiera de (a) a (e) en condiciones muy rigurosas; y
- h) una muteína de cualquiera de (a) a (e) en la que cualquiera de los cambios en la secuencia de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos en (a) a (e).

La expresión “polipéptido de T-cadherina” abarca polipéptidos naturales, recombinantes, quimera, sintéticos y químicamente sintetizados. La expresión “polipéptido de T-cadherina” abarca además fragmentos de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 ó 650 aminoácidos de T-cadherina. La expresión “polipéptido de T-cadherina” abarca además muteínas de T-cadherina. Cuando se usa en la presente memoria, el término “muteínas” se refiere a compuestos análogos de T-cadherina, en los cuales uno o más de los residuos aminoácidos de una T-cadherina natural son reemplazados por residuos aminoácidos diferentes, o se eliminan, o se añaden uno o más residuos aminoácidos a la secuencia natural de T-cadherina, sin disminuir considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la T-cadherina del tipo silvestre. Estas muteínas se preparan por técnicas de síntesis y/o de mutagénesis dirigidas al sitio conocidas, o, por lo tanto, por cualquier otra técnica conocida adecuada.

Las muteínas de T-cadherina que pueden usarse según la presente memoria descriptiva incluyen una serie finita de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que un experto en la técnica puede obtener rutinariamente, sin experimentación indebida, sobre la base de las enseñanzas y la guía presentada en la presente memoria y conocida en la técnica.

Los polipéptidos de T-cadherina según la presente memoria descriptiva incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, las cuales hibridan un DNA o RNA, el cual codifica T-cadherina, según la presente invención, en condiciones moderada o altamente rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones de hibridación y de lavado subsiguiente, a las que los expertos en la técnica se refieren convencionalmente como “rigurosas” (véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, 1989).

Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido bajo estudio en, por ejemplo, 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1%

ES 2 320 139 T3

5 durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37°C durante 30-60 minutos y a continuación, 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica entenderán que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de DNA, las sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o las sondas mixtas de oligonucleótidos. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC.

10 Los polipéptidos de T-cadherina que pueden usarse según la presente memoria descriptiva incluyen muteínas que tienen una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica, más preferiblemente al menos 60% idéntica, y aún más preferiblemente 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una T-cadherina de la SEQ ID NO: 1 o de la SEC ID N°: 2 4 o a uno de sus fragmentos. Mediante un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos interrogante de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia interrogante excepto que la secuencia del polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos interrogante. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos interrogante, pueden insertarse, eliminarse o sustituirse con otro aminoácido hasta el 5% (5 de 100) de los residuos aminoácidos de la secuencia objeto.

20 Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta puede determinarse un "% de identidad". En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o en ambas secuencias, para aumentar el grado de alineación. Puede determinarse un % de identidad respecto a la longitud completa de cada una de las secuencias que se comparan (denominada alineación global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma o muy similar longitud, o sobre longitudes definidas más cortas (denominada alineación local), que es más adecuado para secuencias de diferente longitud.

25 Los cambios preferidos para las muteínas que pueden usarse según la presente memoria descriptiva son los que son conocidos como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos de T-cadherina pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Esta claro que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos también pueden hacerse en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o eliminaciones sólo implican a unos pocos aminoácidos, por ejemplo por debajo de treinta, y preferiblemente por debajo de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo los residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales eliminaciones y/o inserciones entran dentro de la mira de la presente memoria descriptiva.

35 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla II; y mucho más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

TABLA I

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Asn	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met,
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly,
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile,
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val,
Phe	Trp, Met, Tyr, He, Val,
Tyr	Trp, Met, Phe, He, Val,
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr,

ES 2 320 139 T3

Gln	Glu, Lys, Asn, His,
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln,
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA II

Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Asn	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

ES 2 320 139 T3

TABLA III

Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Asn	Asn
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, He, Leu
Trp	Trp

50

55

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de T-cadherina, polipéptidos para usar en la presente invención incluyen cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, tales como se presentan en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark *et al*; 5.116.943 de Koths *et al*, 4.965.195 de Namen *et al*; 4.879.111 de Chong *et al*; y 5.017.691 de Lee *et al*; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. No. 4.904.584 (Shaw *et al*).

60

65

Preferiblemente, las muteínas de la presente memoria descriptiva exhiben sustancialmente la misma actividad biológica que el polipéptido de T-cadherina al que corresponden. Mucho más preferiblemente, las muteínas de la presente invención exhiben una actividad biológica acrecentada que el polipéptido de T-cadherina al que corresponden.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*agente modulador*” se refiere a un compuesto que aumenta o disminuye la actividad de un polipéptido de T-cadherina. Cuando se usa en la presente memoria, un “*agente modulador de T-cadherina*” se refiere a un compuesto que aumenta o disminuye la actividad de un polipéptido de T-cadherina y/o a un compuesto que aumenta o disminuye el nivel de transcripción del mRNA de T-cadherina. La expresión “*agente modulador*” engloba tanto a los agentes agonistas como a los agentes antagonistas.

Cuando se usa en la presente memoria, un “*agente agonista de T-cadherina*” se refiere a un compuesto que tiene un efecto en la misma dirección sobre actividad de T-cadherina que Acrp30. Un compuesto que tiene “*un efec-*

to en la misma dirección” sobre la actividad de T-cadherina que Acrp30 se refiere a un compuesto que: (i) cuando se ensaya en un ensayo en el que Acrp30 aumenta la actividad de T-cadherina, dicho compuesto aumenta la actividad de T-cadherina; y/o (ii) cuando se ensaya en un ensayo en el que Acrp30 disminuye la actividad de T-cadherina, dicho compuesto disminuye la actividad de T-cadherina. Se considera que las expresiones “agente agonista” y “agente activante” son sinónimas y pueden usarse intercambiamente a lo largo de la presente descripción.

Cuando se usa en la presente memoria, un “agente antagonista de T-cadherina” se refiere a un compuesto que tiene un efecto opuesto sobre la actividad de T-cadherina en comparación con Acrp30. Un compuesto que tiene “un efecto opuesto” sobre la actividad de T-cadherina que Acrp30 se refiere a un compuesto que: (i) cuando se ensaya en un ensayo en el que Acrp30 aumenta la actividad de T-cadherina, dicho compuesto disminuye la actividad de T-cadherina; y/o (ii) cuando se ensaya en un ensayo en el que Acrp30 disminuye la actividad de T-cadherina, dicho compuesto aumenta la actividad de T-cadherina. Se considera que las expresiones “agente antagonista” y “agente inhibidor” son sinónimas y pueden usarse intercambiamente a lo largo de la descripción.

Más adelante se detallan adicionalmente los métodos para determinar si un agente modulador tiene un efecto en la misma dirección o un efecto opuesto sobre la actividad de T-cadherina que Acrp30.

Los métodos que pueden usarse para ensayar la capacidad de los agentes moduladores para aumentar o disminuir la actividad de un polipéptido de T-cadherina o para aumentar o disminuir la expresión de un mRNA de T-cadherina son bien conocidos en la técnica y se detallan adicionalmente más adelante. Estos ensayos pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*.

Agentes moduladores candidatos según la presente memoria descriptiva incluyen compuestos naturales y sintéticos. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, ligandos naturales, pequeñas moléculas, aptámeros, mRNAs antisentido, pequeños RNAs de interferencia, formas solubles de T-cadherina y anticuerpos. En la presente memoria descriptiva, tales compuestos se denominan “compuestos candidatos” o “agentes moduladores candidatos”. Los agentes agonistas candidatos preferidos incluyen ligandos naturales, pequeñas moléculas y aptámeros. Los agentes antagonistas candidatos preferidos incluyen ligandos naturales, pequeñas moléculas, aptámeros, mRNAs antisentido, pequeños RNAs de interferencia, formas solubles de T-cadherina y anticuerpos. Los agentes antagonistas candidatos más preferidos son formas solubles de T-cadherina.

Cuando se usa en la presente memoria, La expresión “ligando natural” se refiere a cualquier molécula de transmisión de señales que se enlaza a una T-cadherina *in vivo* e incluye moléculas tales como, por ejemplo, lípidos, nucleótidos, polinucleótidos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos y moléculas inorgánicas.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “pequeña molécula” se refiere a un molécula orgánica de peso molecular relativamente bajo. Preferiblemente, una pequeña molécula comprende menos que 200 átomos. Mucho más preferiblemente, una pequeña molécula comprende entre aproximadamente 50 átomos y 80 átomos.

Cuando se usa en la presente memoria, La expresión “anticuerpo” se refiere a una proteína producida por células del sistema inmune o a uno de sus fragmentos que se enlaza a un antígeno. Los anticuerpos según la memoria descriptiva pueden ser policlonales o monoclonales, quimera, humanizados, o incluso completamente de ser humano. Los anticuerpos recombinantes y sus fragmentos se caracterizan por una alta afinidad de enlace a polipéptidos de T-cadherina *in vivo* y por una baja toxicidad. Los anticuerpos que pueden usarse en la memoria descriptiva se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante un período suficiente para tener una regresión o alivio de buena a excelente de la enfermedad patógena, o de cualquier síntoma o grupo de síntomas relacionados con una enfermedad patógena, y por una baja toxicidad. Los anticuerpos neutralizantes se cultivan fácilmente en animales tales como conejos, cabras o ratones por inmunización con polipéptidos de T-cadherina. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, los cuales a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales anti-T-cadherina. Los anticuerpos quimera son moléculas de inmunoglobulinas caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivadas de especies animales diferentes. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimera se obtiene a partir de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como un anticuerpo monoclonal murina y la región constante de la inmunoglobulina se obtiene a partir de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, ambas regiones y la combinación tienen una inmunogenicidad baja que se determina rutinariamente (Elliott *et al*, 1994). Los anticuerpos humanizados son moléculas de inmunoglobulinas creadas por técnicas de ingeniería genética en las que las regiones constantes murina son reemplazadas por contrapartidas de ser humano mientras que retienen las regiones murina de enlace a los antígenos. El anticuerpo quimera resultante de ratón-humano tiene preferiblemente una inmunogenicidad reducida y una farmacocinética mejorada en seres humanos (Knight *et al* 1993). El anticuerpo puede ser completamente de ser humano. La tecnología para producir anticuerpos de ser humano se describe en detalle por ejemplo en los documentos WO 00/76310, WO 99/53049, US 6.162.963 y AU 5.336.100. Un método para la preparación de anticuerpos completamente de ser humano consiste en la “humanización” del sistema inmune humoral del ratón, es decir en la producción de cepas de ratón capaces de producir Ig de ser humano (Xenorratones), mediante la introducción de lugares de inmunoglobulina (Ig) de ser humano en ratones en los cuales se han inactivado los genes Ig endógenos. Los lugares de Ig son complejos en términos tanto de su estructura física como de los procesos de expresión y reordenamiento de genes requeridos para producir finalmente una amplia respuesta inmune. La diversidad de anticuerpos es principalmente generada por un reordenamiento combinatorial entre genes V, D, y J diferentes presentes en los lugares de Ig. Estos lugares también

contienen los elementos reguladores interespaciados, los cuales controlan la expresión de los anticuerpos, la exclusión alélica, el cambio de clases y la maduración de afinidad. La introducción de transgenes de Ig de ser humano no reordenados en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación en ratones es compatible con genes de ser humano. Además, pueden obtenerse hibridomas que secretan hu-mAbs de antígenos específicos de varios isotipos por inmunización de Xenorratones con un antígeno. Los anticuerpos completamente de ser humano y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 98/24893).

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*mRNA antisentido*” se refiere a una molécula de RNA complementaria a la hebra normalmente procesada en mRNA y trasladada, o a una molécula de RNA complementaria de una de sus regiones.

Cuando se usa en la presente memoria, el término “*aptámero*” se refiere a un ligando artificial de un ácido nucleico (véase, por ejemplo, Ellington y Szostak, 1990).

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*pequeño RNA de interferencia*” se refiere a un RNA de doble hebra que induce un gen silencioso post-transcripcional específico de la secuencia (véase, por ejemplo, Elbashir *et al* 2001).

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*forma soluble de T-cadherina*” se refiere a un polipéptido de T-cadherina que no está unido a la membrana. Los polipéptidos de T-cadherina que no están unidos a la membrana pueden ser generados fácilmente por los expertos en la técnica mutando el sitio de anclaje de GPI de un polipéptido de T-cadherina. Por ejemplo, la glicina en la posición 693 de la SEQ ID NO: 1 puede cambiarse por otro aminoácido. Alternativamente, la forma soluble puede ser un fragmento de T-cadherina que carece del sitio de anclaje de GPI. La *forma soluble de T-cadherina* según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que consiste en los aminoácidos 23 a 692 de la SEQ ID NO: 1;
- b) un polipéptido que consiste en un fragmento de al menos 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 ó 650 aminoácidos de (a);
- c) una muteína de cualquiera de (a) o (b), en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) o (b);
- d) una muteína de cualquiera de (a) o (b) la cual es codificada por un ácido nucleico que se hibrida al complemento de una secuencia de DNA que codifica a cualquiera de (a) o (b) en condiciones muy rigurosas; y
- e) una muteína de cualquiera de (a) o (b) en la que cualquiera de los cambios en la secuencia de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos en (a) o (b).

Preferiblemente, dicha forma soluble de T-cadherina enlaza a Acrp30. Preferiblemente, dicha forma soluble de T-cadherina se enlaza a especies de hexámeros y/o de HMW de Acrp30.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*especie de HMW de Acrp30*” se refiere a un complejo de polipéptidos de Acrp30 que comprende más de seis polipéptidos de Acrp30. La masa molecular aparente de especies murina de HMW de Acrp30 es de aproximadamente 630 kDa. Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “*especie de hexámeros de Acrp30*” se refiere a un complejo de seis polipéptidos de Acrp30. La masa molecular aparente de la especie de hexámeros murina es de aproximadamente 410 kDa. Tales complejos de multímeros o de hexámeros pueden purificarse y/o separarse por, por ejemplo, exclusión molecular como es descrito por Tsao *et al.* (2002).

Las formas solubles de T-cadherina según la presente memoria descriptiva incluyen además un polipéptido quimera de T-cadherina que comprende T-cadherina o uno de sus fragmentos fusionado con un polipéptido heterólogo.

Según la presente memoria descriptiva, dicha forma soluble de T-cadherina comprende T-cadherina o uno de sus fragmentos fusionados con todos o una porción de una inmunoglobulina. Los métodos para fabricar proteínas de fusión con inmunoglobulinas son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. El experto en la técnica comprenderá que la proteína de fusión resultante de la invención retiene la actividad biológica de T-cadherina, en particular el enlace a especies de hexámeros y/o de HMW de Acrp30. La fusión puede ser directa o a través de un péptido corto que actúa como agente de enlace, que puede tener una longitud tan corta como 1 a 3 residuos de aminoácidos o más larga, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho agente de enlace puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia enlazante de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de T-cadherina y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene unas propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia más largo en los fluidos corporales (semi-vida), una actividad específica incrementada, un nivel de expresión acrecentado o se facilita la purificación de la proteína de fusión. Preferiblemente, la T-cadherina o uno de sus fragmentos se fusionan a la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona a regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 de ser humano, por ejemplo. Otras

ES 2 320 139 T3

isoformas de moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente memoria descriptiva, tales como isoformas de IgG2 o IgG4, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero u homomultímeras.

5 La forma soluble de T-cadherina puede ser una molécula quimera que une una región soluble de T-cadherina y toda o una porción de Acrp30. Tales moléculas quimera se han descrito para IL-6 y su receptor IL-6R (Chebath *et al.*, 1997, documento WO 99/02552 y documento WO 97/32891). La quimera IL-6R/IL-6 se enlaza con una mayor eficiencia a su receptor celular *in vitro* que la mezcla de IL-6 con un IL-6R soluble (Kollet *et al.*, 1999). La T-cadherina puede, por ejemplo, fundirse con una Acrp30 de longitud completa. Alternativamente, la T-cadherina puede fundirse
10 con la región central de Acrp30 que comprende unidades repetidas de colágeno. Se espera que tales quimeras formen moléculas quimera solubles de hexámeros y de HMW.

Los fármacos candidatos pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos combinatoriales de bibliotecas conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, métodos de bibliotecas biológicas, de
15 bibliotecas espacialmente direccionables en paralelo en fase sólida o en disolución, y de bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. En general, el enfoque de biblioteca biológica se usa con bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos tipo péptidos, oligómeros no péptidos, aptámeros o pequeñas moléculas.

20 Un ejemplo de un método que puede usarse para la selección de compuestos candidatos para un agente modulador es un método que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un polipéptido de T-cadherina con el compuesto candidato; y
- 25 b) ensayar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de dicho compuesto candidato;

en el que una diferencia o cambio en la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de dicho compuesto indica que el compuesto es un agente modulador de dicho polipéptido de T-cadherina. Preferiblemente, tal método comprende adicionalmente la etapa de comparar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de
30 dicho compuesto con la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en ausencia de dicho compuesto. También preferiblemente, tal método también comprende la etapa de ensayar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en ausencia de dicho compuesto candidato.

Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo basado en células que comprende las etapas de:

- 35 a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con el compuesto candidato; y
- b) ensayar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de dicho compuesto candidato;

40 en el que una diferencia o un cambio en la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de dicho compuesto indica que el compuesto es un agente modulador de dicho polipéptido de T-cadherina. Preferiblemente, tal método comprende adicionalmente la etapa de comparar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en presencia de dicho compuesto con la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina en ausencia de dicho compuesto. También preferiblemente, tal método también comprende la etapa de ensayar la actividad de dicho polipéptido de T-cadherina
45 en ausencia de dicho compuesto candidato.

El agente modulador puede ser un agente inhibidor o un agente activante. Un agente inhibidor puede disminuir la actividad de T-cadherina en, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% comparada con la actividad de T-cadherina en ausencia de dicho agente inhibidor. Un agente activante puede aumentar la actividad
50 de T-cadherina en, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% comparada con la actividad de T-cadherina en ausencia de dicho agente activante.

El agente modulador puede modular cualquier actividad de dicho polipéptido de T-cadherina. El agente modulador puede, por ejemplo, modular la expresión del mRNA de T-cadherina dentro de una célula, modular el enlace del polipéptido de T-cadherina a un socio de enlace natural tal como, por ejemplo, Acrp30, o modular el crecimiento celular.
55

La actividad de un polipéptido de T-cadherina puede evaluarse midiendo en enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para medir el enlace de un polipéptido de T-cadherina a Acrp30. Por ejemplo, pueden usarse el ensayo FACS descrito en el ejemplo 4.2. o el ensayo ELISA descrito en el ejemplo 4.3. de la presente memoria descriptiva. Tal ensayo puede comprender por ejemplo las etapas de:

- 65 a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con el compuesto candidato y con Acrp30; y
- b) ensayar el enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30 en presencia de dicho compuesto candidato;

en el que una diferencia o cambio en el enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30 en presencia de dicho compuesto indica que el compuesto es un agente modulador de dicho polipéptido de T-cadherina. Preferiblemente, tal método comprende adicionalmente la etapa de comparar el enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30 en presencia de dicho compuesto con el enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30 en ausencia de dicho compuesto. También preferiblemente, tal método también comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una célula que expresa una polipéptido de T-cadherina con Acrp30; y
- b) ensayar el enlace de dicho polipéptido de T-cadherina a Acrp30 en ausencia de dicho compuesto candidato.

Acrp30 puede ser una especie de hexámero de Acrp30. Alternativamente, Acrp30 puede ser una especie de HMW de Acrp30.

La actividad de un polipéptido de T-cadherina también puede evaluarse midiendo las concentraciones de mRNA de T-cadherina dentro de una célula. Por ejemplo, la actividad puede medirse usando manchas de Northern, RT-PCR, RT-PCR cuantitativo con cebadores y sondas específicas para mRNAs de T-cadherina. Alternativamente, la expresión del mRNA de T-cadherina se mide al nivel de polipéptidos, usando anticuerpos marcados que se enlacen específicamente al polipéptido de T-cadherina en inmunoensayos tales como ensayos ELISA, o ensayos RIA, ensayos de manchas Western o ensayos inmunohistoquímicos.

Alternativamente, la actividad de un polipéptido de T-cadherina puede evaluarse midiendo la regulación del crecimiento celular. Las células preferidas son células del sistema nervioso tales como astrocitos. Otras células preferidas son miotubos C2C12. Tales ensayos pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Takeuchi *et al.* (2000) o en Huang *et al.* (2003).

Cuando se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno metabólico*” incluye la obesidad, diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la aterosclerosis, la anorexia y la caquexia. Los términos “*obesidad*”, “*diabetes del tipo II*”, “*resistencia a la insulina*”, “*hipercolesterolemia*”, “*hiperlipidemia*”, “*dislipidemia*” y “*aterosclerosis*” se refieren a enfermedades definidas en “The Merck Manual-Second Home Edition” (Publisher: Merck & Co). La expresión “*síndrome X*” se refiere a una constelación de factores de riesgo ateroscleróticos, que incluyen la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia, la dislipidemia, la hipertensión y la obesidad (véase, por ejemplo, Roth *et al.*, 2002). El término “*caquexia*” se refiere a una enfermedad caracterizada por pérdida de grasa. Cuando se usa en la presente memoria, el término “*caquexia*” incluye el desgaste relacionado con el SIDA y el cáncer. El término “*anorexia*” se refiere a una enfermedad caracterizada por una imagen distorsionada del cuerpo, miedo de obesidad e incapacidad para mantener un peso corporal mínimamente normal.

Cuando se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno ginecológico*” se refiere a trastornos que afectan al sistema reproductor femenino y/o a trastornos ligados al embarazo. Tales trastornos incluyen, por ejemplo, síndrome de los ovarios poliquísticos, cáncer de endometrio, cáncer de mama, preeclampsia y eclampsia. Cuando se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno hepático o renal*” incluye, por ejemplo, hígado graso, síndrome nefrótico y síndrome renal crónico. Cuando se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno inflamatorio crónico*” se refiere a una inflamación patológica crónica de un tejido o de un órgano de un individuo. Las enfermedades inflamatorias crónicas incluyen, por ejemplo, la psoriasis, la artritis psoriática, la artritis reumatoide, el asma, el trastorno inflamatorio de los intestinos y la esclerosis múltiple. Todos los trastornos mencionados anteriormente se refieren a trastornos definidos en “The Merck Manual-Second Home Edition” (Publisher: Merck & Co). Otros trastornos que pueden tratarse usando los agentes moduladores y las formas solubles de T-cadherina de la presente memoria descriptiva incluyen cualquier cáncer asociado con la obesidad y/o la resistencia a la insulina tal como, por ejemplo, el cáncer de endometrio.

Según la presente invención, el trastorno es un trastorno metabólico.

En una realización preferida, el trastorno es un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia y el síndrome X. Un polipéptido de T-cadherina puede usarse como diana para la selección de agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de la obesidad, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la T-cadherina. Alternativamente, un polipéptido de T-cadherina puede usarse como diana para la selección de agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de la diabetes del tipo II, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la T-cadherina. Además, un polipéptido de T-cadherina puede usarse como diana para la selección de agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento del síndrome X, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la T-cadherina.

Los fármacos candidatos preferidos para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia y el síndrome X son agentes agonistas de T-cadherina. Así, un polipéptido de T-cadherina puede usarse como diana para la selección de compuestos candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia y el síndrome X, en el que dicho fármaco candidato es un agente agonista de T-

ES 2 320 139 T3

cadherina. Preferiblemente, dichos compuestos candidatos se seleccionan del grupo que consiste en ligandos naturales, pequeñas moléculas y aptámeros.

5 La determinación de si un agente modulador de la T-cadherina es un agente agonista de la T-cadherina o un agente antagonista de la T-cadherina puede, por ejemplo, evaluarse usando el ensayo descrito en el ejemplo 5. Tal ensayo puede comprender por ejemplo las etapas de:

- a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con un agente modulador; y
- 10 b) ensayar la transcripción mediada por NF- κ B en presencia de dicho agente modulador;

en el que una determinación de que dicho agente modulador tiene un efecto en la misma dirección sobre la transcripción mediada por NF- κ B que Acrp30 indica que el compuesto es un agente agonista de dicho polipéptido de T-cadherina, y en el que una determinación de que dicho agente modulador has un efecto opuesto sobre la transcripción mediada por NF- κ B comparado con Acrp30 indica que el compuesto es un agente antagonista de dicho polipéptido de T-cadherina. Preferiblemente, tal método comprende adicionalmente las etapas de:

- a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con Acrp30; y
- 20 b) ensayar la transcripción mediada por NF- κ B en presencia de Acrp30 y en ausencia de dicho agente modulador.

En tal ensayo, Acrp30 es preferiblemente una especie de hexámero o una especie de HMW de Acrp30. En tal ensayo, la célula que expresa un polipéptido de T-cadherina puede ser, por ejemplo, una línea de células C2C12 o una célula C2C12 que sobreexpresa T-cadherina. Tal ensayo también puede realizarse con compuestos candidatos con el fin de seleccionar agentes agonistas de T-cadherina o agentes antagonistas de T-cadherina.

IL-6, que es producida en altas concentraciones por el músculo esquelético durante el ejercicio, activa la producción acrecentada de ácidos grasos y de glucosa en el tejido adiposo. Se piensa que Acrp30 juega un papel en la liberación de IL-6 en el músculo esquelético a través de la activación de NF- κ B (véase, por ejemplo, Tsao *et al*, 2003). Por consiguiente, la determinación de si un agente modulador de la T-cadherina es un agente agonista de la T-cadherina o un agente antagonista de la T-cadherina puede evaluarse midiendo la expresión del gen de IL-6 y/o la liberación de IL-6 en las células del músculo esquelético. Tal ensayo puede comprender por ejemplo las etapas de:

- 35 a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con un agente modulador; y
- b) ensayar la expresión del gen de IL-6 y/o la liberación de IL-6 en las células del músculo esquelético en presencia de dicho agente modulador;

40 en el que una determinación de que dicho agente modulador tiene un efecto en la misma dirección que Acrp30 sobre la expresión del gen de IL-6 y/o la liberación de IL-6 en células del músculo esquelético indica que el compuesto es un agente agonista de dicho polipéptido de T-cadherina, y en el que una determinación de que dicho agente modulador tiene un efecto opuesto sobre la expresión del gen IL-6 y/o la liberación de IL-6 en células del músculo esquelético comparado con Acrp30 indica que el compuesto es un agente antagonista de dicho polipéptido de T-cadherina. Preferiblemente, tal método comprende adicionalmente las etapas de:

- a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de T-cadherina con Acrp30; y
- 50 b) ensayar la expresión del gen de IL-6 y/o la liberación de IL-6 en células de músculo esquelético en presencia de Acrp30 y en ausencia de dicho agente modulador.

En tal ensayo, Acrp30 es preferiblemente una especie de hexámero o una especie de HMW de Acrp30.

55 Alternativamente, la determinación de si un agente modulador de la T-cadherina es un agente agonista de la T-cadherina o un agente antagonista de la T-cadherina puede evaluarse por cualquiera de los ensayos *in vivo* conocidos para evaluar la actividad de Acrp30.

El trastorno puede ser anorexia o caquexia. Así, un polipéptido de T-cadherina puede usarse como diana para la selección de agentes moduladores candidatos para fármacos candidatos para el tratamiento de la anorexia o la caquexia, en el que dicho fármaco candidato es un agente modulador de la T-cadherina. Los fármacos candidatos preferidos para el tratamiento de la caquexia o la anorexia son agentes antagonistas de la T-cadherina.

65 Alternativamente, el trastorno puede ser un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico o un trastorno hepático o renal. Los fármacos candidatos preferidos para el tratamiento de la caquexia o la anorexia son agentes agonistas de la T-cadherina.

Otro aspecto de la presente memoria descriptiva se dirige al uso de un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que

consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal. Preferiblemente, dicho trastorno es un trastorno metabólico. Tal medicamento comprende dicho agente modulador de un polipéptido de la T-cadherina en combinación con cualquier vehículo fisiológicamente aceptable. Vehículos fisiológicamente aceptables pueden prepararse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

5 Los vehículos fisiológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985). Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina y un vehículo fisiológicamente aceptable pueden, por ejemplo, ser de uso intravenoso, tópico, rectal, local, inhalante, subcutáneo, intradérmico, intramuscular, oral, intracerebral e intratecal. Las composiciones pueden estar en forma líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones), sólida (por ejemplo, píldoras, comprimidos, supositorios) o semisólida (por ejemplo, cremas, geles). Las dosificaciones a administrar dependen de las necesidades individuales, del efecto deseado y de la ruta de administración escogida.

Tal medicamento que comprende un agente modulador de la T-cadherina puede usarse en combinación con cualquier fármaco conocido para el tratamiento de dicho trastorno. Por ejemplo, cuando se trata la obesidad, el agente modulador puede administrarse en combinación con Orlistat, Sibutramina, Rimonabant, Axoquina, Fluasterona y/o Famoxin. Cuando se trata la diabetes del tipo II, el agente modulador puede, por ejemplo, administrarse en combinación con Acarbosa, Acetohexamida, Clorpropamida, Glimpirida, Glipizida, Gliburida, Metformina, Tolazamida, Tolbutamida, Nateglinida, Insulina, Insulina Asparto, Insulina glargina, Miglitol, V-411, Repaglinida, Rosiglitazona y/o Pioglitazona. Los medicamentos que comprenden un agente modulador de la T-cadherina también pueden administrarse en el marco de una dieta.

Un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina puede usarse para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia y el síndrome X. Dicho agente modulador es preferiblemente un agente agonista.

Alternativamente, un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina puede usarse para preparar un medicamento para el tratamiento de la caquexia o la anorexia. Dicho agente modulador es preferiblemente un agente antagonista.

Además, un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina puede usarse para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico o un trastorno hepático o renal. Dicho agente modulador es preferiblemente un agente agonista.

Otro aspecto de la presente memoria descriptiva se dirige al uso de un polipéptido de T-cadherina como diana para la selección de socios de enlace naturales, en el que dicho socio de enlace natural es un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal. Preferiblemente, dicho trastorno es un trastorno metabólico. Dicho trastorno metabólico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia. El uso de un polipéptido de T-cadherina como diana tiene una gran utilidad para la identificación de proteínas implicadas en un trastorno metabólico, y para proporcionar nuevos puntos de intervención en el tratamiento de tal trastorno. Tales métodos para la selección de socios de enlace naturales de un polipéptido de T-cadherina son bien conocidos en la técnica.

Un método para la selección de un polipéptido candidato que interacciona con un polipéptido de T-cadherina comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un polipéptido que consiste en un polipéptido de T-cadherina;
- b) obtener un polipéptido candidato;
- c) poner en contacto dicho polipéptido con dicho polipéptido candidato; y
- d) detectar los complejos formados entre dicho polipéptido y dicho polipéptido candidato.

En el método de selección anteriormente definido, los complejos formados entre el polipéptido y el polipéptido candidato pueden además incubarse en presencia de un anticuerpo poli o monoclonal que se enlace específicamente al polipéptido de T-cadherina. Alternativamente, los complejos formados entre el polipéptido y el polipéptido candidato se detectan realizando un ensayo de enlace FACS.

En el método de selección, el candidato puede ser el producto de expresión de un inserto de DNA contenido en un vector. Por ejemplo, tal método de selección puede realizarse como se describe en los ejemplos 1 y 2 de la presente memoria descriptiva.

En el método de selección, los socios de enlace pueden identificarse a través de un ensayo de selección doble híbrido. El sistema de levaduras doble híbrido está diseñado para estudiar las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Fields y Song, 1989), y se atiene a la fusión de una proteína cebo al dominio enlazante del DNA de la proteína Gal4

de levadura. Esta técnica también se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.667.973 y 5.283.173. El procedimiento de selección por biblioteca mediante el ensayo doble híbrido puede realizarse, por ejemplo, como describen Fromont-Racine *et al* (1997), consistiendo el polipéptido cebo en un polipéptido de T-cadherina. Más precisamente, un polinucleótido de T-cadherina se fusiona en UN marco a UN polinucleótido que codifica el dominio enlazante del DNA de la proteína GAL4, insertándose la secuencia fusionada de nucleótidos en un vector de expresión adecuado, por ejemplo pAS2 o pM3.

En el método de selección, los socios de enlace también pueden identificarse por medio de cromatografía de afinidad. El polipéptido de T-cadherina puede unirse a La columna usando técnicas convencionales que incluyen el acoplamiento químico a una matriz de La columna adecuada (por ejemplo agarosa, AFFI GEL, etc.). En algunas realizaciones de este método, La columna de afinidad contiene proteínas quimera en las cuales el polipéptido de T-cadherina, o uno de sus fragmentos, está fusionado con glutatión S transferasa (GST). Una mezcla de proteínas celulares o una agrupación de proteínas expresadas como se describió anteriormente se aplica a La columna de afinidad. Los polipéptidos que interaccionan con el polipéptido de T-cadherina unido a La columna pueden aislarse y analizarse a continuación, por ejemplo, en un gel de electroforesis 2-D como se describe en Rasmussen *et al.* (1997). Alternativamente, las proteínas retenidas en La columna de afinidad pueden purificarse por métodos basados en electroforesis y secuenciarse.

En el método de selección, los socios de enlace también pueden identificarse por medio de métodos basados en biosensores ópticos (véase, por ejemplo, Edwards y Leatherbarrow, 1997). Esta técnica permite la detección de interacciones entre moléculas en tiempo real, sin necesidad de moléculas marcadas.

Preferiblemente, todos ensayos que comprenden la etapa de ensayar el enlace de un polipéptido de T-cadherina a un compuesto candidato, un agente modulador candidato o un socio natural de enlace candidato se realizan en presencia de un catión divalente. Mucho más preferiblemente, tales ensayos se realizan en presencia de Ca^{2+} .

La presente invención se dirige al uso de una forma soluble de T-cadherina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico. Las formas solubles de T-cadherina pueden generarse fácilmente como se indicó anteriormente. La forma soluble de T-cadherina puede actuar como un agente agonista de T-cadherina.

Otro aspecto de la presente memoria descriptiva se dirige a un método para evaluar la eficiencia de un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno metabólico, un trastorno ginecológico, un trastorno inflamatorio crónico y un trastorno hepático o renal, comprendiendo dicho método administrar dicho agente modulador a un modelo animal de dicho trastorno, en el que una determinación de que dicho agente modulador mejora una característica representativa de dicho trastorno en dicho modelo animal indica que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de dicho trastorno. Preferiblemente, dicho trastorno es un trastorno metabólico. Dicho trastorno metabólico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia.

Preferiblemente, el trastorno es la obesidad. Un ejemplo de un método que puede usarse para la selección de fármacos para el tratamiento de la obesidad y/o para evaluar la eficiencia de un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina para el tratamiento de la obesidad es un método que comprende la etapa de administrar dicho agente modulador a un modelo animal para la obesidad, en el que una determinación de que dicho agente modulador mejora una característica representativa de la obesidad en dicho modelo animal indica que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la obesidad.

Los modelos animales para la obesidad y los ensayos para la determinación de si un compuesto mejora una característica representativa de la obesidad en tales modelos animales son conocidos por los expertos en la técnica. Los modelos animales preferidos para la obesidad incluyen ratas fa/fa, ratones ob/ob, ratones db/db, ratones deficientes en leptinas y ratones deficientes en receptores de las leptinas (véase, por ejemplo, Pellemounter *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1996; Piercy *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001).

Cuando se estudia la obesidad, la característica representativa puede ser, por ejemplo, el índice de masa corporal (IMC), el peso corporal, y/o el porcentaje de grasa corporal. Preferiblemente, la característica representativa es el índice de masa corporal. Los métodos para medir estas características son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Una determinación de que un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina reduce el peso corporal de un modelo animal para la obesidad puede indicar que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la obesidad. Preferiblemente, una reducción del peso corporal de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o mayor indica que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la psoriasis. Mucho más preferiblemente, una reducción de 10% o más del peso corporal indica que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la obesidad.

Preferiblemente, el trastorno es la diabetes del tipo II. Un ejemplo de un método que puede usarse para la selección de fármacos para el tratamiento de la diabetes del tipo II y/o para evaluar la eficiencia de un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina para el tratamiento de la diabetes del tipo II es un método que comprende la etapa de

administrar dicho agente modulador a un modelo animal de la diabetes del tipo II, en el que una determinación de que dicho agente modulador mejora una característica representativa de la diabetes del tipo II en dicho modelo animal indica que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la diabetes del tipo II.

5 Los modelos animales para la diabetes del tipo II y los ensayos para la determinación de si un compuesto mejora una característica representativa de la diabetes del tipo II in tales modelos animales son conocidos por los expertos en la técnica. Los modelos animales preferidos para la diabetes del tipo II incluyen el ratón diabético C57/BLKsJ, el ratón KKA(y), el ratón Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), y el ratón diabético obeso (db/db) (véase, por ejemplo, Castle *et al*, 1993; Piercy *et al*, 1998; Piercy *et al*, 2000; Ueda *et al*, 2000).

10 La determinación de si el agente modulador mejora una característica representativa de la diabetes puede realizarse usando varios métodos disponibles en la técnica. Por ejemplo, la característica representativa puede ser las concentraciones de glucosa en el plasma, el suero o la sangre. En una realización, la característica representativa es la concentración de glucosa en plasma en ayunas (FPG). Alternativamente, la característica representativa es la concentración de glucosa postprandial. La característica representativa también puede ser la concentración de fructosamina y hemoglobina glicada (HbA1c). Tanto las concentraciones de HbA1c como de FPG son una medida comúnmente usada en ensayos clínicos de tratamientos para la diabetes del tipo II (véase, por ejemplo, Holman *et al* 1999). Alternativamente, la característica representativa puede ser la concentración de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y/o triglicéridos (véase, por ejemplo, Feinglos *et al*, 1997). Los métodos para medir la característica representativa anterior son bien conocidos en la técnica.

20 Una determinación de que un agente modulador de un polipéptido de T-cadherina reduce las concentraciones de HbA1c en al menos 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20% o más con relación a un placebo puede indicar que dicho agente modulador es un fármaco para el tratamiento de la diabetes del tipo II. Cuando se usa en la presente memoria, el término “*placebo*” se refiere a un modelo animal al cual no se ha administrado dicho agente modulador de un polipéptido de T-cadherina.

30 La referencia a etapas conocidas de métodos, a etapas convencionales de métodos, a métodos o métodos convencionales conocidos no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se describe, enseña o sugiere en la técnica relevante.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Construcción y expresión de Acrp30 etiquetado

40 La secuencia codificante entera de Acrp30 murina (SEQ ID NO: 3) se insertó en el vector pCDNA3.1. El vector pCDNA3.1 se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA). El vector pCDNA3.1 incluye el agente promotor CMV que regula la expresión del gen clonado.

45 La secuencia codificante del epítipo Flag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) se insertó mediante mutagénesis dirigida por PCR entre el sitio de escisión predicho de la secuencia señal de Acrp30 (aminoácido en la posición 17 de la SEQ ID NO: 3) y la región amino terminal. Esta construcción se denota 5'FlagAcrp30. La mutagénesis dirigida por PCR se realizó usando cebadores de las SEQ ID NOs: 5 a 8. Los cebadores de las SEQ ID NOs: 6 y 7 contienen la secuencia que codifica las secuencias del epítipo Flag y de Acrp30, y se usaron en PCR de extensión por solapamiento para introducir la etiqueta después de la secuencia señal. Las SEQ ID Nos. 5 y 8 contienen secuencias de Acrp30 en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente, y también contienen un sitio EcoRI usado para subclonar en pCDNA3.1.

50 También se construyó una segunda construcción, denotada 3'Flag-Acrp30, insertando por mutagénesis PCR la secuencia codificante del epítipo Flag inmediatamente antes del codón de parada del cDNA de Acrp30 para generar una proteína etiquetada en el terminal carboxilo. La mutagénesis dirigida por PCR se realizó usando cebadores de la SEQ ID NO: 9, la cual contiene secuencias Acrp30-5' precedidas por un sitio EcoRI, y de la SEQ ID NO: 10, la cual contiene las secuencias Acrp30-3' que carecen del codón de parada, siendo el codón de parada reemplazado por una secuencia que codifica al epítipo Flag inmediatamente seguida por un codón de parada y un sitio EcoRI.

60 Estas dos construcciones Flag-Acrp30 se secuenciaron para confirmar que no se había producido ningún error introducido por PCR.

65 Para generar proteínas recombinantes Flag-Acrp30, se transfectaron transitoriamente células HEK con estas construcciones. Después de transferir las células a un medio exento de suero se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteína se determinó por comparación con cantidades conocidas de proteína de fusión de Acrp30 etiquetada con Flag y expresada en bacterias mediante el ensayo de manchas Western. Los sobrenadantes contenían aproximadamente 5 µg/ml de Acrp30 etiquetada secretada.

Estos sobrenadantes se purificaron adicionalmente por precipitación en sulfato de amonio seguido por cromatografía de intercambio de aniones FPLC (HiQ, Bio-Rad) de las proteínas resuspendidas. Después de la cromatografía

ES 2 320 139 T3

de aniones, los ensayos de electroforesis en gel nativo y de inmunomanchas para el epítipo Flag mostraron la resolución de la proteína expresada en dos especies: la primera contenía predominantemente 5'Flag-Acrp30 trímero, mientras que la segunda contenía 5'Flag-Acrp30 hexámero y de mayor peso molecular. Se juzgó que la pureza de estas preparaciones era aproximadamente 50 por ciento por SDS-PAGE y tinción Coomassie.

5

Ejemplo 2

Enlace de polipéptidos Flag-Acrp30 a miocitos C2C12, células CHO y células Ba/F3

10

La capacidad de los polipéptidos de Flag-Acrp30 comprendidos en los sobrenadantes anteriores para enlazarse a miocitos C2C12 no diferenciados, a células CHO y a células Ba/F3 se ensayó mediante ensayos de enlace para clasificar células, activados por fluorescencia (FACS).

15

Se transfirieron a medios exentos de suero células adherentes (C2C12 y CHO) o células en suspensión (Ba/F3) durante dos horas y a continuación se incubaron a 4°C durante treinta minutos para bloquear la endocitosis. Las células se incubaron en BSA al 1% en PBS que contenía CaCl₂ 0,9 mM y MgCl₂ 0,5mM (PBS++) a 4°C durante treinta minutos para bloquear sitios de enlace no específicos. Todas las etapas subsiguientes se hicieron a 4°C. Las células se incubaron en una disolución 1:1 de medio acondicionado de células HEK y disolución bloqueante durante dos horas, se lavaron dos veces en PBS++, y se incubaron durante una hora con un anticuerpo monoclonal que reconocía el epítipo Flag conjugado al colorante APC fluorescente (Phico Link). Los anticuerpos que reconocían el epítipo Flag se compraron a Sigma (St. Louis, MO). Después de lavar dos veces in PBS++, las células adherentes se extrajeron por raspado y se resuspendieron en PBS que contenía FBS al 10% y 0,5 µg/mL de yoduro de propidio (PI), un marcador de la permeabilidad celular, y se analizaron por FACS. SE determinó la fluorescencia media de células vivas PI-negativas.

25

La figura 1 muestra el resultado del ensayo de enlace FACS. Se muestra la fluorescencia celular media de cada tipo de célula. Las calles 1-3 corresponden a un ensayo de enlace realizado con testigos tampón. Las calles 4-6 corresponden a un ensayo de enlace realizado con medios acondicionados en células HEK transfectadas con el vector pcDNA3.1 solo, que carecían de cualquier inserto de cDNA (células testigo). Las calles 7-9 corresponden a un ensayo de enlace realizado con medios acondicionados en células HEK transfectadas con 5'Flag-Acrp30. Las calles 10-12 corresponden a un ensayo de enlace realizado con medios acondicionados en células HEK transfectadas con 3'Flag-Acrp30. Se realizaron dos experimentos independientes. Medios acondicionados se refiere a sobrenadantes sin purificar generados como se describe en el ejemplo 1.

35

Como se muestra en la figura 1, las células Ba/F3 no se enlazaron sustancialmente a 5'FlagAcrp30 (calle 9) ó 3'FlagAcrp30 (calle12). La señal obtenida fue similar a la obtenida con sobrenadantes testigo transfectados (calle 6) o cuando sólo se añadió disolución bloqueante (calle 3). Las células CHO dieron una señal ligeramente mayor cuando se incubaron en medios acondicionados que contenían Acrp30 etiquetado con 5'Flag (calle 8) o con medios que contenían Acrp30 etiquetado con 3'Flag (calle 11), en comparación con el testigo de sólo proteína bloqueante (calle 3) o sobrenadante testigo transfectado (calle 5). Sin embargo, las células C2C12 demostraron un aumento de la señal dos veces cuando las células se incubaron en medios acondicionados que contenían 5'Flag-Acrp30 (calle 7) ó 3'Flag-Acrp30 (calle 10), en comparación con la disolución bloqueante (calle 1) o el sobrenadante testigo transfectado (calle 4).

45

Estos resultados indican que las células C2C12, pero no las células Ba/F3, se enlazan específicamente a Acrp30.

Ejemplo 3

50

Clonado de un nuevo receptor de Acrp30

3.1. Construcción de la biblioteca de cDNA de C2C12

55

Para la construcción de una biblioteca de expresión de cDNA de C2C12 se escogió la línea de células C2C12 ya que se enlaza a polipéptidos de Flag-Acrp30 sin purificar y como se ha mostrado previamente aumenta la oxidación de ácidos grasos en respuesta a Acrp30 (Fruebis *et al.*, 2001).

60

Se hizo una biblioteca de expresión de cDNA de C2C12 no diferenciada en un vector retrovívico bicistrónico pBI-GFP. Este vector contiene la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo en testigo de un sitio interno de entrada a los ribosomas (IRES) (Bogan *et al.*, 2001). La expresión del gen clonado o del inserto de cDNA es proporcional a la expresión de GFP en células individuales.

65

La calidad del mRNA se verificó mediante análisis de manchas Northern para el gen de beta-actina. Después del ligamento del cDNA inverso transcrito en el vector retrovívico, la caracterización de la biblioteca sin amplificar reveló aproximadamente 0,5-1x10⁷ transformantes independientes. Por digestión de restricción de plásmidos preparados a partir de clones individuales de la biblioteca primaria, el 95 por ciento contenía insertos con un tamaño medio de 1,5 kb. Se produjeron partículas infecciosas de cDNA vírico por transfección del plásmido en una línea de células envase

ES 2 320 139 T3

(Naviaux *et al.*, 1996). El sobrenadante resultante que contenía el virus se usó para infectar aproximadamente el 5 por ciento de una población de 2×10^8 células Ba/F3.¹ ingenuas

3.2. Preparación de bolas magnéticas

Se incubaron bolas magnéticas que contenían grupos reactivos con el grupo tosilo (M280 Dynal, Dynal) con anticuerpo anti-Flag (M2, Sigma) para acoplar el anticuerpo a las bolas. Después del acoplamiento, las bolas se bloquearon en una disolución de PBS++ que contenía BSA al 1% durante una hora, se añadieron a 40 mL de medios acondicionados en células HEK transfectadas con 5'Flag-Acrp30, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se incubaron bolas testigo con los sobrenadantes de células HEK transfectadas con el vector pCDNA3.1 vacío. Después del enlace a los sobrenadantes, las bolas se lavaron dos veces en PBS++ que contenía BSA al 0,11% y se almacenaron en condiciones estériles en el mismo tampón.

3.3. Tamizado de las bolas magnéticas

Las células Ba/F3 infectadas mediante la biblioteca de expresión de cDNA de C2C12 se expandieron durante dos días antes de someterse al enlace sobre las bolas magnéticas. Las células se prepararon y bloquearon como se describe en el ejemplo 2, excepto que en la etapa de bloqueo se incluyeron 0,1 mg/mL de IgG de ratón (Sigma). Todas las etapas subsiguientes se realizaron a 4°C para impedir la internalización de las bolas.

Las células se prelimpiaron para separar las células no específicamente enlazadas incubando 30 mL de células ($2,4 \times 10^7$ /mL) con 30 μ L de bolas magnéticas testigo durante una hora. Las células enlazadas se separaron mediante el uso de un imán, y las células no adherentes se sometieron de nuevo a dos rondas adicionales de enlace a las bolas testigo. Las células no adherentes se incubaron con 75 μ L de bolas 5'Flag-Acrp30 durante una hora, después de los cual las células adherentes se separaron con un imán y se lavaron tres veces (cinco minutos en 10 mL de PBS++ con BSA al 0,1%.) Las células enlazadas se expandieron en un cultivo; en rondas subsiguientes de enlace se realizó una prelimpieza dos veces con 15 μ L de bolas testigo antes de añadir 30 μ L de bolas de 5'Flag-Acrp30. Después de cada ronda de enlace y expansión, se analizaron partes alícuotas de células por FACS respecto a la expresión de GFP para seguir el enriquecimiento de células que contenían un retrovirus integrado.

Puesto que la expresión de GFP a partir del IRES del vector retrovírico integrado es proporcional a la expresión del inserto de cDNA clonado en células individuales (Liu *et al.*, 2000), el enriquecimiento de la expresión de GFP en una población celular después del enlace a 5'Flag-Acrp30 está ligado al enriquecimiento de un cDNA clonado que confiere capacidad enlazante.

3.4. Análisis FACS de agrupaciones de células enriquecidas

Después de una ronda de enlace a las bolas, el 2,4% de las células purificadas sobre las bolas testigo, y el 1,6% de las células purificadas sobre bolas de 5'Flag-Acrp30 fueron GFP-positivas con relación a las células no infectadas.

Después de una segunda ronda de enlace, el 1,7% de las células purificadas sobre las bolas testigo y el 7,8% de las células purificadas sobre bolas de 5'Flag-Acrp30 fueron GFP-positivas.

Mediante la tercera clasificación, las células que se enlazaron a bolas testigo no se habían enriquecido en comparación con la primera clasificación, ya que el 2,3% fueron GFP-positivas. Por otra parte, el 73% de las células que se enlazaron a bolas de 5'Flag-Acrp30 fueron GFP-positivas, indicando que la población se había enriquecido en células que contenían un clon integrado de cDNA retrovírico.

Las células enlazadas a las bolas testigo no se enriquecieron en GFP durante la tercera clasificación, se excluyen los efectos epigenéticos debidos al enriquecimiento de células enlazadas a las bolas de 5'Flag-Acrp30. Así, la población de célula enriquecidas probablemente contiene un cDNA que codifica a un receptor de Acrp30.

3.5. Amplificación de un inserto enriquecido de cDNA

Se preparó DNA genómico a partir de diferentes agrupaciones de células obtenidas después de una tercera clasificación y sometidas a amplificación por PCR usando cebadores retrovíricos específicos que flanquean el sitio de clonación de cDNA del vector retrovírico pBI-GFP. Estas diferentes agrupaciones celulares correspondieron a células Ba/F3 ingenuas o a células Ba/F3 infectadas con la biblioteca de cDNA y enlazadas a bolas magnéticas que habían sido incubadas con el sobrenadante de (i) células HEK transfectadas con el vector pCDNA3.1 solo; (ii) células HEK que expresan 5'FlagAcrp30; o (iii) células HEK que expresan 5'FlagAcrp30. En células incubadas con las bolas que contenían 5'Flag-Acrp30 se vio una única banda específica de 2,5 kb, pero no en células testigo o en células Ba/F3 ingenuas.

Esta banda se subclonó en el vector pCRII-Topo y los extremos se secuenciaron usando cebadores específicos del vector. La secuencia fue idéntica a la T-cadherina murina (número de acceso al GenBank BC021628). Con el fin de obtener la secuencia completa del inserto, se diseñaron cebadores de las SEQ ID NOs: 11 a 18 de la secuencia de T-cadherina conocida para permitir la secuenciación del inserto completo. Esto confirmó la identidad del clon enriquecido como T-cadherina de longitud completa.

ES 2 320 139 T3

Por consiguiente, la T-cadherina es un receptor potencial de Acrp30. El hecho de que la T-cadherina es un receptor de Acrp30 se confirmó como se detalla más adelante.

5 Ejemplo 4

Enlace de Acrp30 a T-cadherina

4.1. *Sobreexpresión de T-cadherina en células*

Se obtuvo cDNA de T-cadherina murina de longitud completa como una etiqueta secuencia expresada (clon IMAGE ID 3987627) y se clonó en el vector pCDNA3.1 par generar la construcción pCDNA-Tcad. Se generaron tres líneas de células que sobreexpresaban T-cadherina

Se transfectaron transitoriamente con pCDNA-Tcad células CHO. Estas células CHO transfectadas transitoriamente demostraron una capacidad enlazante acrecentada con 5'Flag-Acrp30 en comparación con sobrenadantes testigo de cultivos tisulares usando el ensayo de enlace FACS previamente descrito.

La secuencia completa que codifica la T-cadherina se clonó en el vector retrovívico pBI-GFP para generar la construcción pBI-GFP-Tcad. Tanto las células Ba/F3 ingenuas como las CHO-ER se transfectaron con pBI-GFP-Tcad. La línea de células CHO-ER expresa establemente el receptor del vector retrovívico y puede ser infectada por virus ecotrópicos (regalo del Dr. M. Krieger, MIT).

4.2. *Análisis por FACS del enlace de Acrp30 a T-cadherina*

Como se muestra en la figura 2, las líneas de células anteriores se usaron subsiguientemente en los ensayos de enlace FACS. Los paneles 1 a 3 corresponden al ensayo de enlace FACS de células Ba/F3 testigo. Los paneles 4 a 9 corresponden al ensayo de enlace FACS de células Ba/F3 infectadas con retrovirus que expresan T-cadherina (pBI-GFP-Tcad). El enlace se estudió para:

- hexámero de 5'Flag-Acrp30 0 nM (paneles 1 y 4), 6 nM (paneles 2 y 5, 7-9), ó 60 nM (paneles 3 y 6);
- hexámero de Acrp30 60 nM (panel 7);
- EDTA 10 mM (panel 8); y
- Clq 10 µg/mL (panel 9).

Las células Ba/F3 testigo no infectadas exhibieron una baja capacidad de enlace al hexámero de 5'Flag-Acrp30 6 nM (panel 2) o 60 nM (panel 3), mientras que las células Ba/F3 que expresan T-cadherina demostraron una capacidad enlazante creciente con el hexámero de 5'Flag-Acrp30 6 nM (panel 5, y paneles 7-9) o 60 nM (panel 6) (concentración expresada como equivalentes de trímeros). La capacidad enlazante del fondo en ausencia de ligando fue baja (panel 4). La inclusión de 60 nM del hexámero de Acrp30 sin etiquetar producido por eucariotas inhibió la capacidad enlazante de 5'FlagAcrp30 6 nM (panel 7), indicando enlace específico entre Acrp30 y T-cadherina. Para examinar los requerimientos de cationes divalentes para el enlace, se añadió una disolución 10 mM de EDTA a la reacción de enlace. Esto bloqueó completamente la capacidad enlazante (panel 8), indicando que para que se produzca el enlace se requieren cationes divalentes. Clq, una molécula que comparte homología con Acrp30, no afectó a la capacidad enlazante en un exceso de 20 veces (en peso) cuando se incubó con el hexámero de 5'Flag-Acrp30 6 nM (panel 9), indicando que probablemente Clq no se enlaza al mismo receptor que Acrp30.

En experimentos paralelos, no se vio ningún enlace significativo de gAcrp30 expresada por bacterias ni a líneas de células que expresaban T-cadherina ni a una preparación de 5'Flag-Acrp30 trímero producida por células de mamíferos.

Este experimento confirma que T-cadherina no se enlaza al epítipo Flag, excluyendo así una explicación trivial del enlace a 5'Flag-Acrp30. Adicionalmente, este resultado sugiere que T-cadherina es un receptor específico de las especies de hexámeros y de HMW de longitud completa de Acrp30, pero no se enlaza a las especies globular o de trímeros de Acrp30.

4.3. *Análisis del enlace de Acrp30 a T-cadherina mediante ensayo ELISA*

Se realizaron además ensayos ELISA para mostrar el enlace directo de Acrp30 a células que expresan T-cadherina.

Se hicieron crecer, cada una, en placas de 96 pocillos líneas de células CHO-ER infectadas con la construcción retrovívica bicistrónica pBI-GFP-Tcad (denominadas CHO-T-cadherina) y células testigo infectadas con pBI-GFP (denominadas CHO-GFP). Un día después de la extensión en el plazo ($1,5 \times 10^4$ /pocillo), las células se incubaron en medios exentos de suero durante una hora, se colocaron a 4°C durante treinta minutos, y se bloquearon durante treinta minutos en PBS++ que contenía leche en polvo al 4%. Acrp30 globular etiquetada con Flag expresada en bacterias,

ES 2 320 139 T3

5'Flag-Acrp30 de longitud completa etiquetada con Flag expresada en bacterias o las especies de trímeros o de hexámeros y de HMW de 5'Flag-Acrp30 producidas en células HEK se incubaron con las células durante una hora en tampón bloqueante a las concentraciones indicadas. Los polipéptidos expresados en HEK se produjeron y purificaron por precipitación en sulfato de amonio y cromatografía de intercambio de aniones. Se identificaron agrupaciones que
5 contenían la especie de trímeros de 5'Flag-Acrp30 o una combinación de las especies de hexámeros y de HMW por electroforesis en gel nativo y ensayo de inmunomanchas con un anticuerpo Flag. Se juzgó que la pureza de estas preparaciones era aproximadamente 50% por análisis Coomassie PAGE. La concentración de proteínas se determinó por ensayo BCA (Pierce). La concentración de proteínas bacterianas purificadas expresadas se determinó por la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción calculado derivado de la secuencia de aminoácidos primaria (Protein;
10 DNASTar). Después de lavar dos veces en PBS ++, se añadió un anticuerpo monoclonal al epítipo Flag (M2; 4 µg/ml) durante una hora; se repitió el lavado, seguido por una incubación en el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (anti-ratón de burro; Jackson), y se desarrolló con sustrato TMB colorimétrico (Pierce). Se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de placas.

15 Los resultados se muestran en las figuras 3A y 3B. La figura 3A muestra el análisis ELISA de enlace de varias preparaciones de Acrp30 a CHO-GFP testigo. La figura 3B muestra las líneas de células que expresan CHO-T-cadherina. gAcrp se refiere a 3'Flag-gAcrp30 expresada en bacterias. Acrp de longitud completa se refiere a Flag-Acrp30 expresada en bacterias. TRI se refiere a 5'FlagAcrp30 trímero producido por células HEK. HEX & HMW se refiere a 5'FlagAcrp30 hexámero y de alto peso molecular producidos por células HEK. Se realizaron cuatro experimentos
20 independientes.

Como se ve en la figura 3A, las células testigo no se enlazaron a ninguna de las proteínas ensayadas. Como se ve en la figura 3B, las células CHO que expresan T-cadherina sólo demostraron capacidad enlazante a oligómeros de 5'FlagAcrp30 hexámeros y de HMW, pero no a trímeros. La concentración semi-máxima de enlace estimada es de 25-50 nM (concentración expresada como equivalentes de trímeros). No hubo ningún enlace a células CHO que expresan T-cadherina de proteína globular o de longitud completa producidas por bacterias, lo que implica que el reconocimiento de Acrp30 por T-cadherina puede requerir modificaciones post-transcripcionales de Acrp30 y que probablemente no implica al dominio globular. Por consiguiente, la T-cadherina puede enlazarse a las especies de hexámeros y de HMW de Acrp30, pero no a las especies globular o de trímeros.
30

Ejemplo 5

Efecto de T-cadherina sobre la transcripción mediada por NF-κB

35 Para determinar si las células que sobreexpresan T-cadherina tienen una respuesta a la estimulación de Acrp30 alterada por NF-κB, se examinó la transcripción mediada por NF-κB en células transitoriamente transfectadas con el plásmido testigo pCDNA3.1 o con el plásmido pCDNA-T-cadherina (pCDNA-Tcad) como se describe en Tsao *et al* (2002).
40

Para ensayar la actividad de NF-κB, se cotransfectó pCDNA-Tcad con un plásmido que contenía la secuencia que codifica la luciferasa bajo el control de un agente promotor E-selectina que codificaba un elemento respuesta a NF-κB. La construcción E-selectina luciferasa se generó insertando el agente promotor E-seleccionado en el gen de luciferasa que contenía el vector pGL2-básico (Promega) como describieron Schindler y Baichwal (1994). Se
45 cotransfectó un tercer plásmido que expresa beta-galactosidasa también bajo el control del agente promotor CMV y se usó para normalizar las concentraciones de expresión. Los plásmidos se transfectaron en células en placas de 24 pocillos. El día siguiente, las células se incubaron durante seis horas en medios que contenían los compuestos idénticos. La actividad enzimática de la luciferasa y de la p-galactosidasa de los lisados de células se determinaron con un ensayo basado en un luminómetro (Promega). La señal de la luciferasa se normalizó a la actividad de la beta-galactosidasa y se representó como el número de veces de estimulación con relación a las células no estimuladas
50 transfectadas con las construcciones idénticas.

La figura 4 muestra el número de veces de estimulación de la transcripción mediada por NF-κB en miocitos C2C12 no diferenciados. Se midió la actividad de la luciferasa. La columna 1 muestra el número de veces de estimulación que sigue al tratamiento de 6 h con medios solos. La columna 2 muestra el número de veces de estimulación con adición
55 de 2 µg/mL de la especie de hexámeros de Acrp30. La columna 3 muestra el número de veces de estimulación con adición de 300 ng/mL de LPS. La columna 4 muestra el número de veces de estimulación con adición de 50 ng/mL de TNF-α. Se realizaron tres experimentos independientes.

60 La columna 1 muestra que la expresión de T-cadherina suprime la transcripción basal mediada por NF-κB al 37% de la transcripción mediada por NF-κB en células testigo. La especie de hexámeros de Acrp30 (columna 2) a una concentración de 2 µg/ml estimula 1,8 veces la transcripción mediada por NF-κB. En células que expresan T-cadherina, esta estimulación está completamente suprimida ya que la transcripción mediada por NF-κB tiene el mismo nivel que en células no tratadas que expresan T-cadherina. Las columnas 3 y 4 muestran células C2C12 tratadas con
65 300 ng/mL de LPS (columna 3) ó 50 ng/mL de TNF-α (columna 4). En ambos casos hay una estimulación similar de cuatro veces en células testigo transfectadas, y en ambos casos la estimulación fue reducida mediante la expresión de T-cadherina. Sin embargo, la T-cadherina sólo redujo la estimulación al nivel base de células testigo transfectadas. No hubo más expresión como fue el caso en células tratadas con la especie de hexámeros de Acrp30. La expresión de beta-

galactosidasa permaneció inalterable entre líneas de células de pCDNA y transfectadas con T-cadherina, indicando que la sobreexpresión de T-cadherina no condujo a la supresión transcripcional no específica.

En conclusión, la sobreexpresión de T-cadherina suprime la transcripción mediada por NF- κ B iniciada por varios estímulos diferentes, incluyendo la transcripción mediada por NF- κ B iniciada por Acrp30.

Referencias

1. **Arita, Kihara et al.** (1999) "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity" *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83
2. **Berg, Combs et al.** (2001) "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action" *Nat Med* 7(8): 947-53
3. **Bogan, McKee et al.** (2001) "Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations" *Mol Cell Biol* 21(14): 4785-806
4. **Castle, Colca et al.** (1993) "Lipoprotein profile characterization of the KKA(y) mouse, a rodent model of type II diabetes, before and after treatment with the insulin-sensitizing agent pioglitazone" *Arterioscler Thromb* 13(2):302-9
5. **Chebath J, Fischer et al.** (1997) "Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities" *Eur Cytokine Netw.* 8(4):359- 65.
6. **Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al.** (2002) "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer" *J Clin Invest* 109(8): 987-91
7. **Doyle, Goings et al.** (1998) "T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma" *J Biol Chem* 273(12): 6937-43
8. **Edwards and Leatherbarrow** "Determination of association rate constants by an optical biosensor. using initial rate analysis" *Anal Biochem*, 1997 Mar 1;246(1):1-6
9. **Elbashir, Harborth et al.** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells *Nature*, 2001 May 24;411(6836):494-8
10. **Ellington and Szostak** (1990) "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands" *Nature* 346(6287):818-22
11. **Elliott and Pestronk** (1994) "Progression of multifocal motor neuropathy during apparently successful treatment with human immunoglobulin" *Neurology*. 44(5):967-8.
12. **Febbraio and Pedersen** (2002) "Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles" *FASEB J* 16(11):1335-47
13. **Feinglos, Thacker et al.** (1997) "Modification of postprandial hyperglycemia with insulin lispro improves glucose control in patients with type 2 diabetes" *Diabetes Care*, 20(10):1539-42
14. **Fields and Song** (1989) "A novel genetic system to detect protein-protein interactions" *Nature* 340(6230):245-6 *Nature* 340:245-6
15. **Fromont-Racine, Rain et al.** (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens *Nat Genet* 16(3):277-82
16. **Fruebis, Tsao et al.** (2001) "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):, 2005-10
17. **Grantham R** (1974) "Amino acid difference formula to help explain protein evolution" *Science* 185(4154):862-4
18. **Hara, Boutin et al.** (2002) "Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population" *Diabetes* 51(2): 536-40
19. **Holman, Cull et al.** (1999) "A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years" *Diabetes Care* 22(6):960-4
20. **Hu, Liang et al.** (1996) "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity" *J Biol Chem* 271(18): 10697-10703

21. **Huang, Wu et al.** (2003) "T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21(CIP1/WAF1) expression" *Mol Cell Biol* 23(2): 566-78
22. **Ivanov, Philippova et al.** (2001) "Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature" *Histochem Cell Biol* 115(3): 231-42
23. **Knight, Trinh et al.** (1993) "Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody" *Mol Immunol.* 30(16):1443-53.
24. **Kollet O, Aviram et al.** (1999) "The soluble interleucin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances *in vitro* maintenance and proliferation of human CD34(+)CD38(-/low) cells capable of repopulating severe combined immunodeficiency mice" *Blood.* 94(3):923-31.
25. **Kondo, Shimomura et al.** (2002) "Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome" *Diabetes* 51(7): 2325-8
26. **Kosmidou, Vassilakopoulos et al.** (2002) "Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species" *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(5):587-93
27. **Lindsay, Funahashi et al.** (2002) "Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population" *Lancet* 360(9326): 57-8
28. **Liu, Constantinescu et al.** (2000) "Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels" *Anal Biochem* 280(1):, 20-8
29. **Maeda, Okubo et al.** (1996) "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)" *Biochem Biophys Res Commun* 221(2): 286-9
30. **Maeda, Shimomura et al.** (2002) "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30" *Nat Med* 8(7): 731-7
31. **Naviaux, Costanzi et al.** (1996) "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses" *J Virol* 70(8): 5701-5.
32. **Niermann, Kern et al.** (2000) "The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins" *Biochem Biophys Res Commun* 276(3): 1240-7
33. **Ogawa, Masuzalci et al.** (1995) "Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (falfa) rats" *J Clin Invest* 96(3):1647-52
34. **Okamoto, Arita et al.** (2000) "An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls" *Horm Metab Res* 32(2): 47-50
35. **Panidis, Kourtis et al.** (2003) "Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome" *Hum Reprod.* 18(9):1790-6.
36. **Pelleymounter, Cullen et al.** (1995) "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice" *Science* 269(5223):540-3"
37. **Petridou, Mantzoros et al.** (2003) "Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece" *J Clin Endocrinol Metab.* 88(3):993-7.
38. **Piercy, Toseland et al.** (1998) "Potential benefit of inhibitors of advanced glycation end products in the progression of type II diabetes: a study with aminoguanidine in C57BLKsJ diabetic mice" *Metabolism* 47(12):1477-80
39. **Piercy, Toseland et al.** (2000) "Acceleration of the development of diabetes in obese diabetic (db/db) mice by nicotinamide: a comparison with its antidiabetic effects in non-obese diabetic mice" *Metabolism*, 2000 Dec;49(12):1548-54
40. **Ramsay, Jamieson et al.** (2003) "Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with pre-eclampsia". *Hypertension.* 42(5):891-4.
41. **Rasmussen, Ji et al.** (1997) "Two-dimensional electrophoretic analysis of human breast carcinoma proteins: mapping of proteins that bind to the SH3 domain of mixed lineage kinase MLK2" *Electrophoresis*, 1997 Mar-Apr;18(3-4):588-98

ES 2 320 139 T3

42. **Roth, Mobarhan et al. (2002)** "Syndrome X: where are we and where do we go?" *Nutr Rev* 60:335-7 Review
43. **Sambrook, Fritsch et al. (1989)** "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY
- 5 44. **Scherer, Williams et al. (1995)** "A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes" *J Biol Chem* 270(45): 26746-9
45. **Schindler and Baichwal (1994)** Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol.* 14(9):5820-31.
- 10 46. **Takeuchi, Misaki et al. (2000)** "Expression of T-cadherin (CDH13, H-Cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells" *J Neurochem* 74(4): 1489-97
- 15 47. **Tanihara, Sano et al. (1994)** "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin" *Cell Adhes Commun* 2(1): 15-26
- 20 48. **Tkachuk, Bochkov et al. (1998)** "Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin" *FEBS Lett* 421(3):, 208-12
49. **Tsao, Murrey et al. (2002)** "Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)" *J Biol Chem* 277(33): 29359-62
- 25 50. **Tsao, Tomas et al. (2003)** "Role of Disulfide Bonds in Acrp30/Adiponectin Structure and Signaling Specificity: Different Oligomers Activate Different Signal Transduction Pathways" *J Biol Chem In the press*
51. **Ueda, Ikegami et al. (2000)** "Age-dependent changes in phenotypes and candidate gene analysis in a polygenic animal model of Type II diabetes mellitus; NSY mouse" *Diabetologia* 43(7):932-8
- 30 52. **Xu, Wang et al. (2003)** "The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice" *J Clin Invest.* 2003 Jul; 112(1):91-100.
- 35 53. **Yamauchi, Kamon et al. (2003)** "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects" *Nature* 423(6941): 762-9
54. **Yamauchi, Kamon et al. (2001)** "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity" *Nat Med* 7(8): 941-6
- 40 55. **Yokota, Oritani et al. (2000)** "Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages" *Blood.* 96(5):1723-32
- 45 56. **Zoccali, Mallamaci et al. (2003)** "Adiponectin is markedly increased in patients with nephrotic syndrome and is related to metabolic risk factors" *Kidney Int Suppl.* 84:S98-102.
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 320 139 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Forma soluble de T-cadherina para el tratamiento de un trastorno metabólico, en la que dicha forma soluble se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 a) un polipéptido que consiste en los aminoácidos 23 a 692 de la SEQ ID NO: 1;
- b) un polipéptido que consiste en un fragmento de al menos 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 ó 650 aminoácidos de (a);
- 15 c) una muteína de (a) o (b), en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) o (b);
- d) una muteína de (a) o (b) la cual es codificada por un ácido nucleico que se hibrida con el complemento de una secuencia de DNA que codifica a (a) o (b) en condiciones muy rigurosas; y
- 20 e) una muteína de (a) o (b) en la que cualquiera de los cambios en la secuencia de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos en (a) o (b).

25 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la obesidad, la diabetes del tipo II, la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la dislipidemia, el síndrome X, la anorexia y la caquexia.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

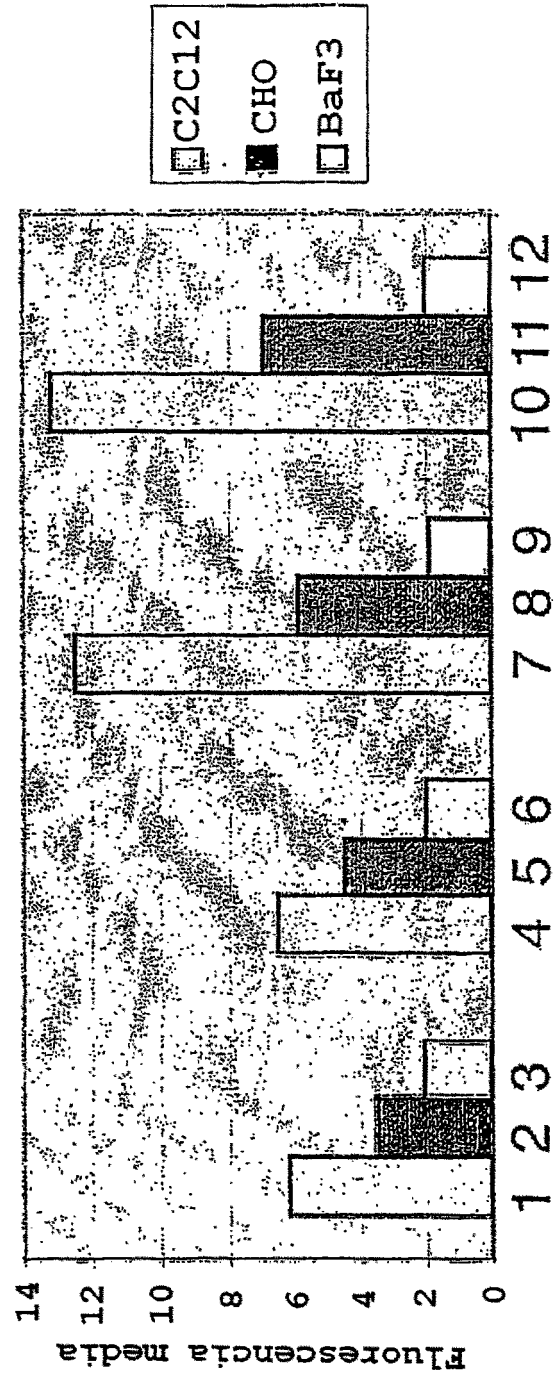
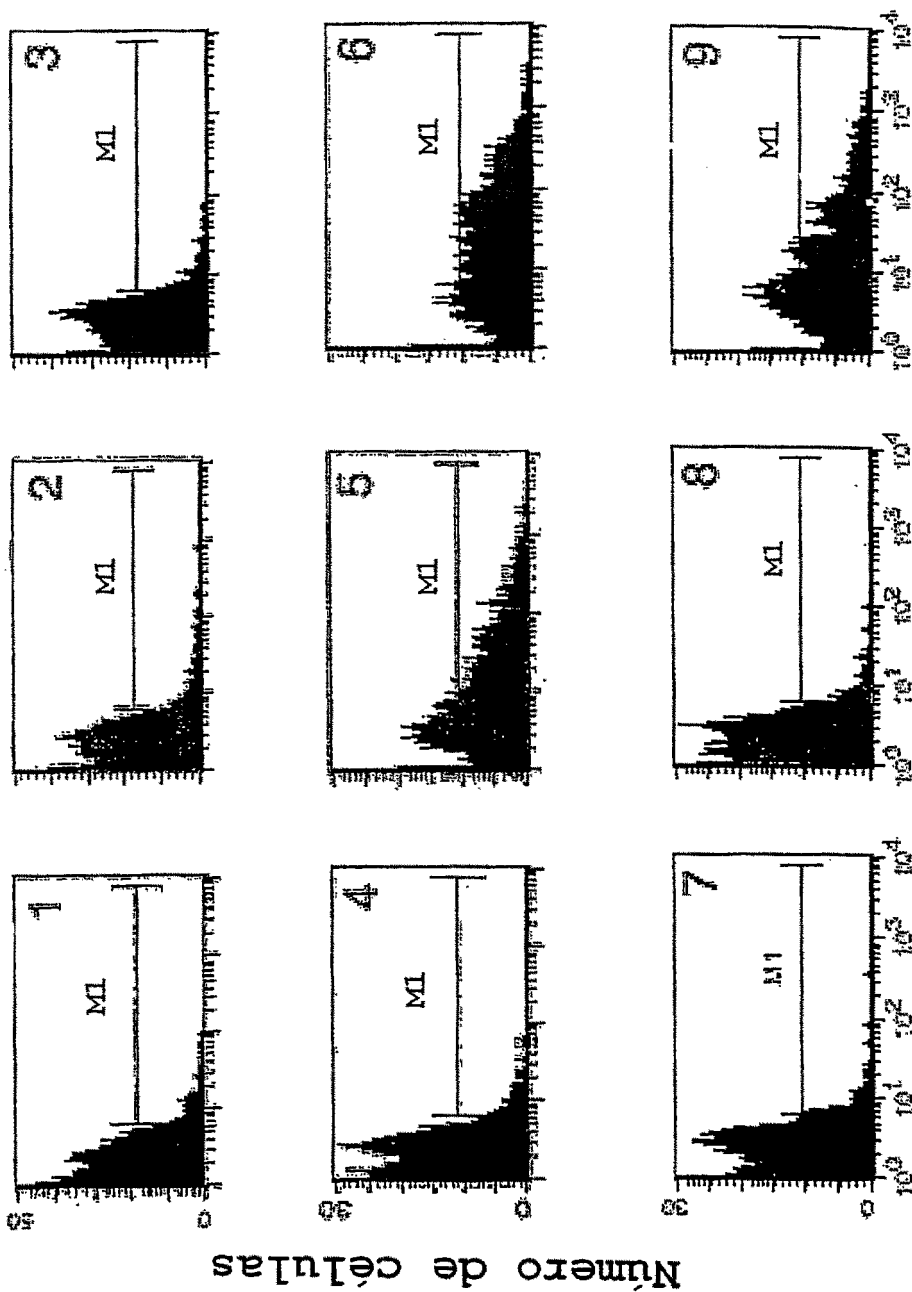


FIGURA 2



Enlace Flag-Acrp30

FIGURA 3A

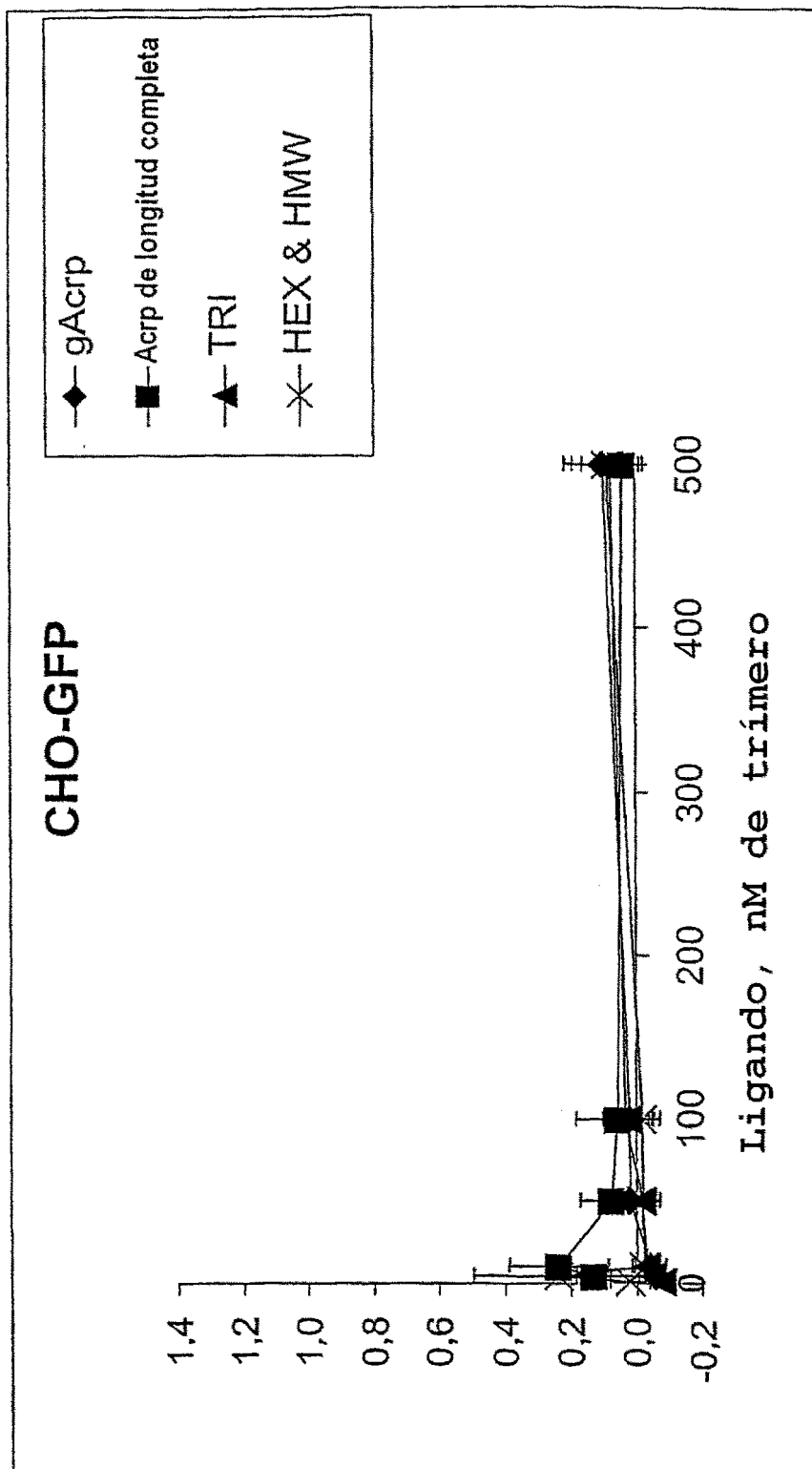


FIGURA 3B

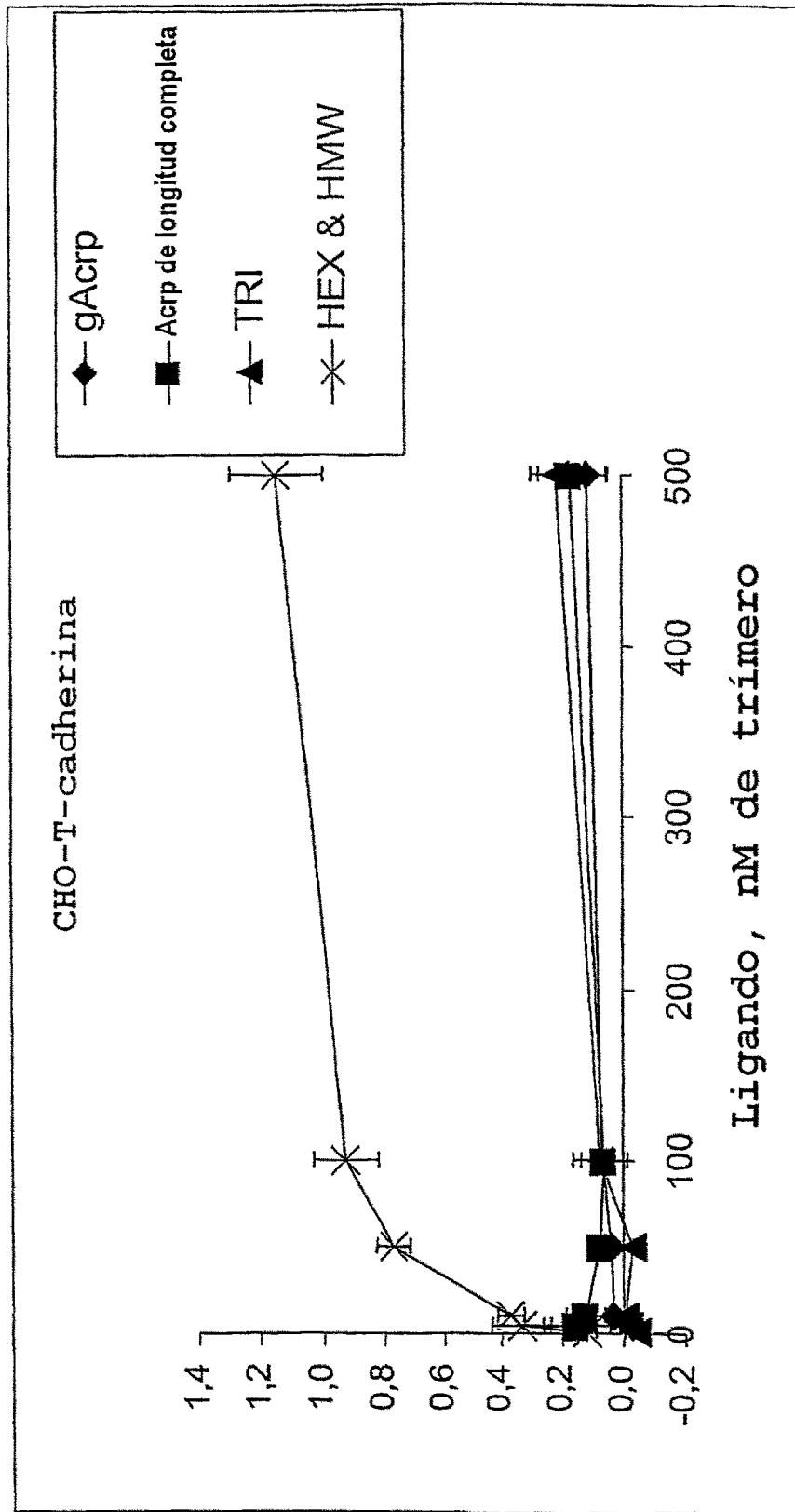
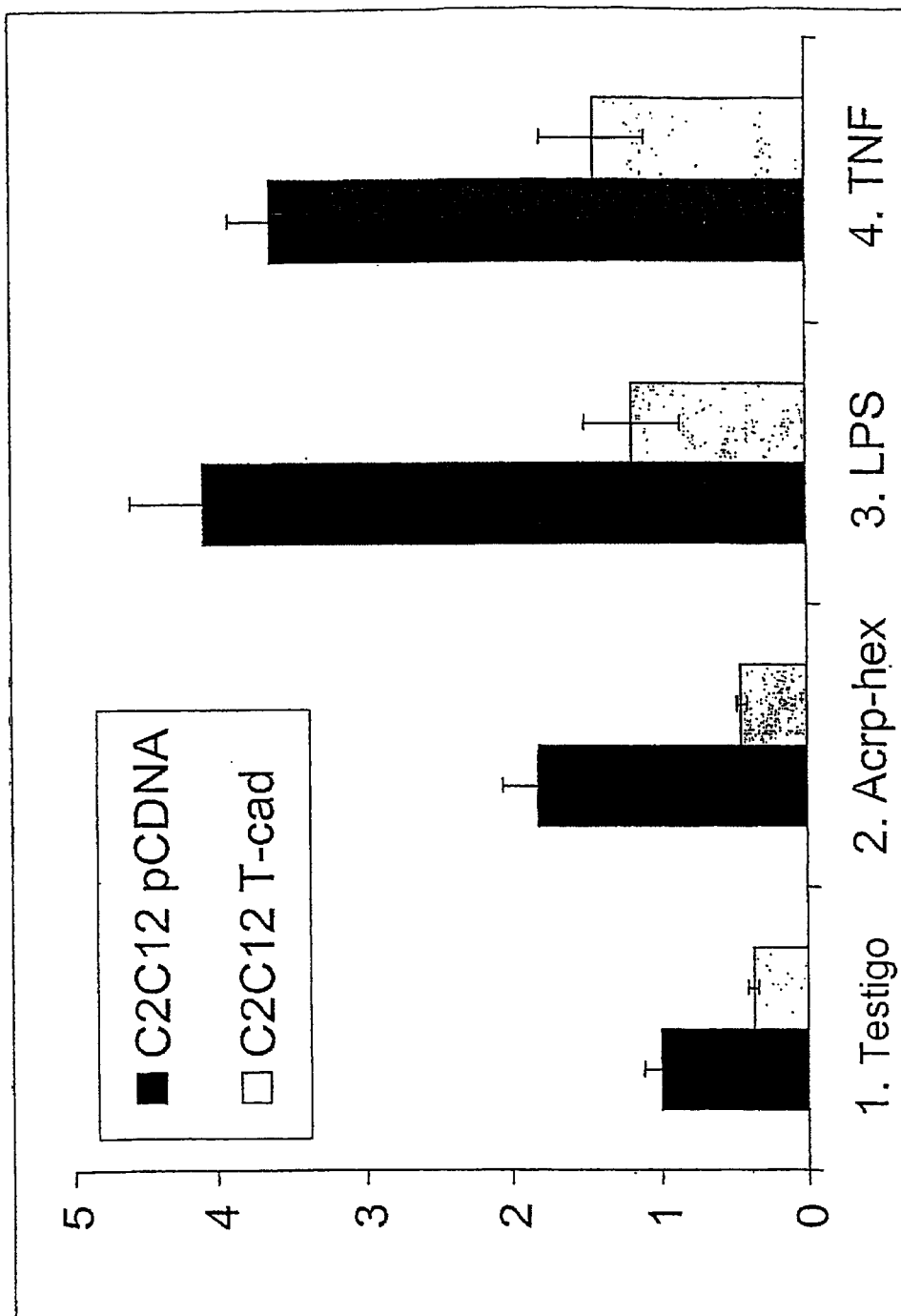


FIGURA 4



ES 2 320 139 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Whitehead Institute for Biomedical Research
Hug, Christopher
odish, Harvey F.

<120> USO DE T-CADHERINA COMO DIANA
<130> SER-100X

<150> US 60/526.956
<151> 2003-12-03

<160> 18

<170> Versión de la patente 3.1

<210> 1
<211> 713
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1).. (22)
<223>

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (693).. (693)
<223> ANCLAJE A GPI

<220>
<221> PROPEP
<222> (23)..(139)
<223>

<220>
<221> PROPEP
<222> (694).. (713)
<223>

<400> 1

Met	Gln	Pro	Arg	Thr	Pro	Leu	Val	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Val
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Thr	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	Gln
			20					25					30		
Gln	Lys	Val	Phe	His	Ile	Asn	Gln	Pro	Ala	Glu	Phe	Ile	Glu	Asp	Gln
		35					40					45			
Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	Asp	Cys	Lys	Gly	Asn	Asp	Lys	Leu
	50					55					60				
Arg	Tyr	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Tyr	Phe	Lys	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly

ES 2 320 139 T3

	65					70						75				80
5	Leu	Val	Ala	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Thr	Leu	Phe	Val
					85					90					95	
	His	Ala	Arg	Thr	Pro	His	Ala	Glu	Asp	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Val
				100					105					110		
10	Gly	Gly	Lys	Asp	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys	Phe	Ala
			115					120					125			
	Arg	Thr	Ser	Pro	Val	Pro	Arg	Gln	Lys	Arg	Ser	Ile	Val	Val	Ser	Pro
15		130					135					140				
	Ile	Leu	Ile	Pro	Glu	Asn	Gln	Arg	Gln	Pro	Phe	Pro	Arg	Asp	Val	Gly
	145					150					155					160
20	Lys	Val	Val	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Glu	Arg	Ser	Lys	Phe	Arg	Leu	Thr
				165						170					175	
	Gly	Lys	Gly	Val	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	Gly	Ile	Phe	Arg	Ile	Asn	Glu
25				180					185					190		
	Asn	Thr	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Arg	Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Val	Ile
			195					200					205			
30	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Phe	Val	Glu	Thr	Thr	Asp	Val	Asn	Gly	Lys	Thr
		210					215					220				
	Leu	Glu	Gly	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Val	Ile	Asp	Gln	Asn	Asp
35		225				230						235				240
	Asn	Arg	Pro	Ile	Phe	Arg	Glu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Gly	His	Val	Met	Glu
				245						250					255	
40	Gly	Ser	Pro	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Met	Arg	Met	Thr	Ala	Phe	Asp	Ala
				260					265					270		
	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Asp	Asn	Ala	Leu	Leu	Arg	Tyr	Asn	Ile	Arg	Gln
45			275					280					285			
	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	Asn	Met	Phe	Tyr	Ile	Asp	Pro	Glu
	290					295						300				
50	Lys	Gly	Asp	Ile	Val	Thr	Val	Val	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Asp	Arg	Glu
	305					310					315					320
	Thr	Leu	Glu	Asn	Pro	Lys	Tyr	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Gln	Asp	Met
55					325					330					335	
	Ala	Gly	Leu	Asp	Val	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ile	Met
				340					345					350		
60	Ile	Asp	Asp	Lys	Asn	Asp	His	Ser	Pro	Lys	Phe	Thr	Lys	Lys	Glu	Phe
			355					360						365		
	Gln	Ala	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Val	Gly	Val	Ile	Val	Asn	Leu	Thr
65		370					375					380				

ES 2 320 139 T3

Val Glu Asp Lys Asp Asp Pro Thr Thr Gly Ala Trp Arg Ala Ala Tyr
 385 390 395 400
 5 Thr Ile Ile Asn Gly Asn Pro Gly Gln Ser Phe Glu Ile His Thr Asn
 405 410 415
 Pro Gln Thr Asn Glu Gly Met Leu Ser Val Val Lys Pro Leu Asp Tyr
 10 420 425 430
 Glu Ile Ser Ala Phe His Thr Leu Leu Ile Lys Val Glu Asn Glu Asp
 435 440 445
 15 Pro Leu Val Pro Asp Val Ser Tyr Gly Pro Ser Ser Thr Ala Thr Val
 450 455 460
 His Ile Thr Val Leu Asp Val Asn Glu Gly Pro Val Phe Tyr Pro Asp
 20 465 470 475 480
 Pro Met Met Val Thr Arg Gln Glu Asp Leu Ser Val Gly Ser Val Leu
 485 490 495
 25 Leu Thr Val Asn Ala Thr Asp Pro Asp Ser Leu Gln His Gln Thr Ile
 500 505 510
 Arg Tyr Ser Val Tyr Lys Asp Pro Ala Gly Trp Leu Asn Ile Asn Pro
 515 520 525
 30 Ile Asn Gly Thr Val Asp Thr Thr Ala Val Leu Asp Arg Glu Ser Pro
 530 535 540
 Phe Val Asp Asn Ser Val Tyr Thr Ala Leu Phe Leu Ala Ile Asp Ser
 545 550 555 560
 Gly Asn Pro Pro Ala Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Ile Thr Leu Glu
 565 570 575
 40 Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro Phe Ile Tyr Pro Thr Val Ala Glu Val
 580 585 590
 Cys Asp Asp Ala Lys Asn Leu Ser Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asp
 595 600 605
 45 Lys Asp Leu His Pro Asn Thr Asp Pro Phe Lys Phe Glu Ile His Lys
 610 615 620
 50 Gln Ala Val Pro Asp Lys Val Trp Lys Ile Ser Lys Ile Asn Asn Thr
 625 630 635
 His Ala Leu Val Ser Leu Leu Gln Asn Leu Asn Lys Ala Asn Tyr Asn
 645 650 655
 55 Leu Pro Ile Met Val Thr Asp Ser Gly Lys Pro Pro Met Thr Asn Ile
 660 665 670
 Thr Asp Leu Arg Val Gln Val Cys Ser Cys Arg Asn Ser Lys Val Asp
 675 680 685
 65

ES 2 320 139 T3

Cys Asn Ala Ala Gly Ala Leu Arg Phe Ser Leu Pro Ser Val Leu Leu
 690 695 700

5 Leu Ser Leu Phe Ser Leu Ala Cys Leu
 705 710

10 <210> 2
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1).. (14)

20 <223>

<220>
 <221> DOMINIO
 25 <222> (42).. (107)
 <223> Dominio semejante al colágeno

<220>
 30 <221> DOMINIO
 <222> (108)..(244)
 <223> Dominio Clq

35 <400> 2

40	Met	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	His
	1			5					10						15	
45	Asp	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro
				20				25						30		
50	Lys	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	His	Pro	Gly
			35					40					45			
55	His	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Pro	Gly	Glu
	50						55					60				
60	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Ile
	65					70					75					80
65	Gly	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly
					85					90					95	
70	Ile	Gln	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg
				100					105					110		
75	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Thr	Tyr	Val	Thr	Ile	Pro	Asn	Met
				115				120					125			
80	Pro	Ile	Arg	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Asn	Gln	Gln	Asn	His	Tyr	Asp
		130					135					140				
85	Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	His	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Phe

ES 2 320 139 T3

Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr
 100 105 110
 5 Met Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val
 115 120 125
 Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn
 130 135 140
 10 His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu
 145 150 155 160
 15 Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val
 165 170 175
 Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
 180 185 190
 20 Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
 195 200 205
 25 Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
 210 215 220
 Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe
 225 230 235 240
 30 Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
 245

35 <210> 4
 <211> 714
 <212> PRT
 40 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SEÑAL
 45 <222> (1).. (22)
 <223>
 <220>
 50 <221> LÍPIDO
 <222> (693).. (693)
 <223> ANCLAJE a GPI
 55 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (23).. (139)
 60 <223>
 <220>
 <221> PROPEP
 65 <222> (694).. (714)
 <223>

ES 2 320 139 T3

<400> 4

5 Met Gln Pro Arg Thr Pro Leu Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Gln Val
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Thr Ser Ala Asp Asp Leu Glu Cys Thr Pro Gly Phe Gln
 20 25 30
 10 Arg Lys Val Leu His Ile His Gln Pro Ala Glu Phe Ile Glu Asp Gln
 35 40 45
 Pro Val Leu Asn Leu Thr Phe Asn Asp Cys Lys Gly Asn Glu Lys Leu
 50 55 60
 15 His Tyr Glu Val Ser Ser Pro His Phe Lys Val Asn Ser Asp Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Val Ala Leu Arg Asn Ile Thr Ala Val Gly Arg Thr Leu Phe Val
 85 90 95
 20 His Ala Arg Thr Pro His Ala Glu Asp Met Ala Glu Leu Val Ile Val
 100 105 110
 Gly Gly Lys Asp Ile Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Phe Lys Phe Ala
 115 120 125
 25 Arg Thr Ser Pro Val Pro Arg Gln Lys Arg Ser Ile Val Val Ser Pro
 130 135 140
 30 Ile Leu Ile Pro Glu Asn Gln Arg Gln Pro Phe Pro Arg Asp Val Gly
 145 150 155 160
 35 Lys Val Val Asp Ser Asp Arg Pro Glu Gly Ser Lys Phe Arg Leu Thr
 165 170 175
 Gly Lys Gly Val Asp Gln Asp Pro Lys Gly Thr Phe Arg Ile Asn Glu
 180 185 190
 40 Asn Thr Gly Ser Val Ser Val Thr Arg Thr Leu Asp Arg Glu Thr Ile
 195 200 205
 Ala Thr Tyr Gln Leu Tyr Val Glu Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Thr
 210 215 220
 45 Leu Glu Gly Pro Val Pro Leu Glu Val Ile Val Ile Asp Gln Asn Asp
 225 230 235 240
 50 Asn Arg Pro Ile Phe Arg Glu Gly Pro Tyr Ile Gly His Val Met Glu
 245 250 255
 Gly Ser Pro Thr Gly Thr Thr Val Met Arg Met Thr Ala Phe Asp Ala
 260 265 270
 55 Asp Asp Pro Ala Thr Asp Asn Ala Leu Trp Arg Tyr Asn Ile Arg Gln
 275 280 285
 60 Gln Thr Pro Asp Lys Pro Ser Pro Asn Met Phe Tyr Ile Asp Pro Glu
 290 295 300
 Lys Gly Asp Ile Val Thr Val Val Ser Pro Ala Leu Leu Asp Arg Glu

65

ES 2 320 139 T3

Gln Thr Val Pro Asp Lys Val Trp Lys Ile Ser Lys Ile Asn Asn Thr
 625 630 635 640
 5 His Ala Leu Val Ser Leu Leu Gln Asn Leu Asn Lys Ala Asn Tyr Asn
 645 650 655
 10 Leu Pro Ile Met Val Thr Asp Ser Gly Lys Pro Pro Met Thr Asn Ile
 660 665 670
 Thr Asp Leu Lys Val Gln Val Cys Ser Cys Lys Asn Ser Lys Val Asp
 675 680 685
 15 Cys Asn Gly Ala Gly Ala Leu His Leu Ser Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 690 695 700
 20 Phe Ser Leu Leu Ser Leu Leu Ser Gly Leu
 705 710

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 5

aagaattccg ccaccatgct actggtgcaa gctctc 36

35 <210> 6
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 6

gactacaagg acgacgatga caaggaaget gacgttaact caact 45

50 <210> 7
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 7

cttgcatcg togtccttgr agtcggcatg actgggcagg attaa 45

65 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA

ES 2 320 139 T3

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 8

tttgaattct cagttggtat catggtagag 30

10 <210> 9

<211> 36

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 9

sagaattcgg ccaccatgct actggtgcaa gctctc 36

25 <210> 10

<211> 60

<212> DNA

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

35 <400> 10

tttgaattct cacttgctgt catogtcttt gtagctgca cttgcatcgt tggatcatg 60

40 <210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

45 <220>

<223> cebador

50 <400> 11

gacatctcct gtcccaag 18

<210> 12

55 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

60 <220>

<223> cebador

<400> 12

65 **ctaacatggt ctacatcg** 18

ES 2 320 139 T3

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador
10

<400> 13
ctgtccacat cacagtcc **18**

15 <210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
20

<220>
<223> cebador

25 <400> 14
cagacagtcc ctgataaag **19**

30 <210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
35

<220>
<223> cebador

40 <400> 15
ctcgttgccc ttgcagtcac **20**

<210> 16
45 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador

55 <400> 16
gacttcacaga ggcactggc **19**

<210> 17
60 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

65 <220>
<223> cebador

ES 2 320 139 T3

<400> 17

ggctcctgtg gtggggtcg

19

5

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 18

ggttgccact gtcgatgg

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65