



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 450**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01942383 .9**

96 Fecha de presentación : **10.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1248849**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54

Título: **Cabeza globular de OBG3 y sus usos para reducir la masa corporal.**

30

Prioridad: **14.01.2000 US 176228 P**
13.04.2000 US 198087 P
01.09.2000 US 229881 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73

Titular/es: **Serono Genetics Institute S.A.**
route Nationale 7
91000 Evry, FR

72

Inventor/es: **Bihain, Bernard;**
Erickson, Mary, Ruth;
Fruebis, Joachim y
Yen-Potin, Frances

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 450 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

Cabeza globular de OBG3 y usos de la misma para reducir la masa corporal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la investigación metabólica, en particular al descubrimiento de compuestos eficaces para reducir la masa corporal y útiles para tratar enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad. Las enfermedades o trastornos relacionados con la obesidad previstos para ser tratados por los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes, e hipertensión.

Antecedentes de la invención

La siguiente exposición pretende facilitar el entendimiento de la invención, pero ni se pretende ni se admite que sea la técnica anterior a la invención.

La obesidad es un problema de salud pública que es grave, que está muy extendido, y que va en aumento. En los Estados Unidos, el 20 por ciento de la población es obesa; en Europa, un porcentaje ligeramente más bajo es obeso (Friedman (2000) Nature 404: 632-634). La obesidad se asocia con un aumento del riesgo de hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, y cáncer así como complicaciones respiratorias y osteoartritis (Kopelman (2000) Nature 404: 635-643). Incluso una pérdida de peso moderada mejora estas condiciones asociadas.

Aunque todavía se reconoce que los factores del estilo de vida que incluyen el entorno, la dieta, la edad y el ejercicio desempeñan un papel en la obesidad, los estudios de gemelos, los análisis de agregación familiar, y los estudios de adopción indican todos que la obesidad es en gran medida el resultado de factores genéticos (Barsh *et al* (2000) Nature 404:644-651). De acuerdo con estos estudios, está el hecho de que está siendo identificado un número creciente de genes relacionados con la obesidad. Algunos de los genes más ampliamente estudiados incluyen los que codifican la leptina (*ob*) y su receptor (*db*), pro-opiomelanocortina (*Pomc*), receptor 4 de melanocortina (*Mc4r*), proteína agouti (*A^y*), carboxipeptidasa E (*fat*), receptor 2C de 5-hidroxitriptamina (*Htr2c*), nescient helix-loop-helix 2 (*Nhlh2*) básico, prohormona-convertasa 1 (*IPCSK1*), y proteína tubby (*tubby*) (revisado en Barsh *et al* (2000) Nature 404:644-651).

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que porciones del polipéptido OBG3 de longitud completa, denominadas fragmentos de polipéptido OBG3 o fragmentos de polipéptido gOBG3, tienen efectos inesperados *in vitro* e *in vivo*, incluyendo su uso para la reducción de peso y prevención de la ganancia de peso en los seres humanos y otros mamíferos. Estos efectos inesperados de la administración del fragmento de polipéptido OBG3 o gOBG3 a los mamíferos incluyen también la reducción de los niveles elevados de ácidos grasos libres causados por la administración de epinefrina, inyección i.v. de "intralipid", o administración de un alimento de ensayo rico en grasas, así como el aumento de la oxidación de los ácidos grasos en las células del músculo, y la reducción de peso en los mamíferos que consumen una dieta rica en grasas/rica en sacarosa. Estos efectos son inesperados y sorprendentes dado que la administración del polipéptido OBG3 de longitud completa generalmente no tiene ningún efecto ni *in vivo* ni *in vitro*. Dado que no se observa ningún efecto después de la administración del polipéptido OBG3 de longitud completa, los niveles de polipéptido OBG3 de longitud completa requeridos para obtener un efecto lo hacen inviable como un tratamiento potencial para los seres humanos en este momento. Por contraste, los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, son radicalmente más eficaces y por tanto se pueden proporcionar a niveles que son factibles para tratamientos a los seres humanos.

Por tanto, un primer aspecto de la invención es el uso de un fragmento globular de OBG3, en el que el fragmento globular de OBG3 se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6, o
- (ii) una variante de cualquiera de los fragmentos globulares de OBG3 que tienen una o más sustituciones permisivas de aminoácidos, en la que cada una de dichas sustituciones permisivas de aminoácidos es una sustitución conservadora de aminoácidos, en la que la variante tiene al menos una pero no más de 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos; o
- (iii) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6; ligados a polietilenglicol o en forma de un péptido de fusión IgG Fc;

causando el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) un cambio en al menos uno de los parámetros seleccionados entre lipemia post-prandial, nivel de ácidos grasos libres, nivel de triglicéridos, nivel de glucosa, oxidación de los

ácidos grasos libres, o peso, siendo el cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) comparable a un cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (i), para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno relacionado con la obesidad, o para la preparación de un medicamento para la reducción de la masa corporal o prevención de ganancia de peso.

En una realización preferida, un fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria, es capaz de reducir los niveles (concentración) circulantes (en sangre, suero o plasma) de: (i) ácidos grasos libres, (ii) glucosa, y/o (iii) triglicéridos. Los fragmentos de polipéptido más preferidos que demuestran actividad para reducir el nivel de los ácidos grasos libres, actividad para reducir el nivel de glucosa, y/o actividad para reducir el nivel de triglicéridos, tienen una actividad que es significativamente mayor que la de OBG3 de longitud completa a la misma concentración molar, tienen una actividad mayor que la actividad transitoria y/o tienen una actividad sostenida.

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 más preferidos son aquellos que estimulan de forma significativa la oxidación de los lípidos o de los ácidos grasos libres en el músculo en comparación con los polipéptidos OBG3 de longitud completa a la misma concentración molar. Los fragmentos gOBG3 más preferidos son aquellos que hacen que las células C2C12 diferenciadas en presencia de dichos fragmentos sufran al menos un 10%, 20%, 30%, 35%, o 40% más de oxidación de oleato en comparación con las células no tratadas o las células tratadas con OBG3 de longitud completa.

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 más preferidos son aquellos que son al menos un 30% más eficaces que el OBG3 de longitud completa para aumentar la absorción de leptina en una línea celular hepática (preferiblemente células hepáticas de ratón BPRCL (ATCC CRL-2217)).

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 más preferidos son aquellos que reducen de forma significativa el aumento postprandial de los ácidos grasos libres en el plasma debido a una comida rica en grasas.

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 más preferidos son aquellos que reducen de forma significativa o eliminan la producción de cuerpos cetónicos como resultado de una comida rica en grasas.

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 más preferidos son aquellos que forman multímeros (por ejemplo, heteromultímeros u homomultímeros) *in vitro* y/o *in vivo*. Los multímeros preferidos son los homodímeros u homotrímeros. Otros multímeros preferidos son los homomultímeros que comprenden al menos 4, 6, 8, 9, 10 o 12 subunidades de fragmento de polipéptido OBG3 o gOBG3. Otros multímeros preferidos son los heteromultímeros que comprenden un fragmento de polipéptido gOBG3 descrito aquí.

Un vector recombinante puede comprender un promotor ligado operativamente a una región codificadora capaz de expresar:

(a) un fragmento globular de OBG3 o una variante como se describe aquí; o

(b) una fusión de dicho fragmento globular de OBG3 en la que el fragmento está en la forma de un péptido de fusión IgG Fc.

Una célula recombinante puede comprender dicho vector recombinante. Una célula hospedante puede ser recombinante para un polinucleótido descrito en esta memoria.

Una composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable puede comprender, consiste esencialmente en, o consiste en, un fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria, y, alternativamente, un diluyente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

Un método para reducir la masa corporal puede comprender proporcionar o administrar a los individuos que necesiten reducir la masa corporal dicha composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

La identificación de dichos individuos que necesiten reducir la masa corporal a ser tratados con dicha composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable puede comprender la caracterización del genotipo de los polimorfismos de los nucleótidos individuales (SNPs) de OBG3 o la medida de los niveles de los polipéptidos OBG3 o gOBG3 o de mRNA en muestras clínicas de dichos individuos. Preferiblemente, dichas muestras clínicas se seleccionan del grupo que consiste en plasma, orina, y saliva. Preferiblemente, un fragmento de polipéptido gOBG3 se administra a un individuo con al menos una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en los niveles en sangre, suero o plasma de OBG3 de longitud completa o del fragmento de OBG3 dividido de forma natural proteolíticamente en comparación con los pacientes sanos no obesos.

Un método de prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad puede comprender proporcionar o administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable como se describe en esta memoria. En las realizaciones preferidas, la identificación de dichos individuos que necesitan tal tratamiento para ser tratados con dicha composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable comprende la caracterización del genotipo de los polimorfismos de los nucleótidos individuales (SNPs) de OBG3 o la medida de los niveles de los polipéptidos OBG3 o gOBG3 o de mRNA en muestras clínicas de dichos

individuos. Preferiblemente, dichas muestras clínicas se seleccionan del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, orina, y saliva. Preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad se selecciona del grupo que consiste en obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina y diabetes tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos de la invención incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales de la invención relacionados con la obesidad, incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, anorexia, y bulimia. En las realizaciones preferidas, dicho individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

Un método para causar o inducir una respuesta biológica deseada en un individuo puede comprender las etapas de: proporcionar o administrar a un individuo una composición que comprende un fragmento de polipéptido gOBG3, en el que dicha respuesta biológica se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) reducir los niveles (concentración) circulantes (en sangre, suero, o plasma) de ácidos grasos libres;
- (b) reducir los niveles (concentración) circulantes (en sangre, suero o plasma) de glucosa;
- (c) reducir los niveles (concentración) circulantes (en sangre, suero o plasma) de triglicéridos;
- (d) estimular la oxidación de lípidos o ácidos grasos libres en el músculo;
- (e) aumentar la absorción de leptina en el hígado o células hepáticas;
- (f) reducir el aumento postprandial de los ácidos grasos libres en el plasma debido a una comida rica en grasas; y
- (g) reducir o eliminar la producción de cuerpos cetónicos como resultado de una comida rica en grasas; y

además en el que dicha respuesta biológica es significativamente mayor que, o al menos 10%, 20%, 30%, 35%, o 40% más grande que, la respuesta biológica causada o inducida por un polipéptido OBG3 de longitud completa con la misma concentración molar; o alternativamente en el que dicha respuesta biológica es mayor que una respuesta transitoria; o alternativamente en el que dicha respuesta biológica es sostenida.

Un método para preparar el fragmento globular del polipéptido OBG3 para uso en el primer aspecto puede comprender las etapas de (a) cultivar una célula hospedante en condiciones adecuadas para expresar el fragmento, y (b) aislar el fragmento.

Un método para preparar un fragmento recombinante del polipéptido gOBG3 o un polipéptido OBG3 de longitud completa puede comprender proporcionar un mamífero no humano transgénico, cuya leche contiene el fragmento recombinante del polipéptido gOBG3 o la proteína de longitud completa, y purificar dicho fragmento recombinante del polipéptido gOBG3 o dicho polipéptido OBG3 de longitud completa procedente de la leche de dicho mamífero no humano. En una realización, dicho mamífero no humano es una vaca, cabra, oveja, conejo, o ratón. En otra realización, el método puede comprender purificar un polipéptido OBG3 recombinante de longitud completa procedente de dicha leche, y dividir dicha proteína *in vitro* para obtener el fragmento de polipéptido gOBG3 deseado.

Preferiblemente, las enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad se seleccionan del grupo que consiste en obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina y diabetes tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales relacionados con la obesidad incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, anorexia, y bulimia.

Los métodos para reducir el peso corporal con fines estéticos pueden comprender proporcionar a un individuo una composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable descrita en esta memoria, o el fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria. Preferiblemente, para reducir el peso corporal dicho individuo tiene un BMI de al menos 20 y no más de 25. Alternativamente, para aumentar el peso corporal dicho individuo tiene preferiblemente un BMI de al menos 15 y no más de 20.

Una composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable descrita en esta memoria, se puede usar para reducir el peso corporal por razones estéticas.

Los métodos para tratar la resistencia a la insulina pueden comprender proporcionar a un individuo dicha composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, o el fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria.

En un aspecto preferido de los métodos anteriores y los descritos aquí, la cantidad de fragmento de polipéptido gOBG3 administrada a un individuo es suficiente para llevar los niveles (concentración) circulantes (en sangre, suero, o plasma) de los polipéptidos OBG3 a sus niveles normales (niveles de individuos no obesos). Los “niveles normales” pueden ser especificados como la concentración total de todos los polipéptidos OBG3 (OBG3 de longitud completa y sus fragmentos) circulantes o solamente la concentración de todos los polipéptidos OBG3 circulantes divididos proteolíticamente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de los polipéptidos OBG3 humanos (APM1), y de ratón (AdipoQ y ACRP30).

La Figura 2 muestra la secuencia de ácido nucleico de AdipoQ clonada en los sitios BamHI y XhoI de pTrcHisB. AdipoQ empieza en 510 y termina en 1214 (insertado en negritas). Esta construcción (o estructura artificial) no contiene la secuencia señal con N-terminal (MLLLQALLFLILP).

La Figura 3 muestra un dibujo esquemático de la estructura proteínica de APM1. Se muestran la supuesta secuencia señal en el N-terminal (AA 1-17), la región única (AA 18-41), la región de colágeno (AA 42-107), y la región globular (AA 108-244) en el carboxi terminal. Se muestran también dos sitios de escisión por la proteasa después de AA 100 y AA 131.

La Figura 4 muestra la secuencia de ácido nucleico de la región globular de AdipoQ clonada en pTrcHisB. La región globular de AdipoQ empieza en 510 y termina en 927 bp. El inserto está en negritas.

La Figura 5 es un gráfico que muestra una comparación del efecto de AdipoQ (AQ) y la cabeza globular de AdipoQ (AQ-GH) sobre la 125 I-leptina asociada a las células en la línea celular hepática de ratón BPRCL. Los resultados se muestran como porcentaje de los valores de control en presencia de cantidades crecientes de compuesto (AQ o AQ-GH), y son la media de determinaciones triplicadas.

Las Figuras 6A, 6B, y 6C muestran gráficos de la unión, absorción, y degradación, respectivamente, de 125 I-LDL en la línea celular hepática de ratón BPRCL en presencia de cantidades crecientes de gOBG3.

La Figura 7 muestra un alineamiento de la secuencia proteínica del clon obg3 (clon obg3; el inserto de la Fig. 2) con las secuencias publicadas de obg3 humano (apm1) y de ratón (AdipoQ y acrp30). En el alineamiento, los aminoácidos (AAs) 45 a 110 contienen la región tipo colágeno; los AAs 111-247 contienen la región globular. Los sitios de corte de la lisina-tripsina bloqueada están después de los AAs 58, 61, 95, 103, 115, 125, y 134. Como se determina por la secuenciación amino-terminal del producto gOBG3, el sitio de comienzo de gOBG3 está en el AA 104 (101 para el gOBG3 humano o APM1).

La Figura 8 muestra una representación gráfica del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g i.p.) sobre los ácidos grasos libres (FFA) en el plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas (* p < 0,02).

Las Figuras 9A y 9B muestran representaciones gráficas del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g i.p.) sobre los triglicéridos (TG) en el plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas (p < 0,05 a las 2, 3 y 4 horas). La Figura 9A muestra los TG en mg/dl; la Figura 9B muestra los TG como porcentaje del valor de partida.

La Figura 10 muestra una representación gráfica del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g i.p.) sobre la glucosa del plasma en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas.

Las Figuras 11A y 11B muestran representaciones gráficas del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g i.p.) sobre los FFA del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. La Figura 11A muestra los FFA como mM; la Figura 11B muestra los FFA como tanto por ciento del valor de partida.

Las Figuras 12A y 12B muestran representaciones gráficas del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g) sobre la leptina del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. La Figura 12A muestra la leptina como ng/ml; la Figura 12B muestra la leptina como tanto por ciento del valor de partida.

Las Figuras 13A y 13B muestran representaciones gráficas del efecto de gOBG3 (3 x 25 μ g) sobre la insulina del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. La Figura 13A muestra los niveles de insulina en ng/ml; la Figura 13B muestra la insulina como tanto por ciento del valor de partida.

Las Figuras 14A y 14B muestran representaciones gráficas del efecto de OBG3 sobre los FFA del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. A t = 2 horas se vio una reducción significativa en los FFA para ambos grupos de tratamiento (p < 0,05). La Figura 14A muestra los niveles de FFA en mM; la Figura 14B muestra los FFA como tanto por ciento del valor de partida.

Las Figuras 15A y 15B muestran representaciones gráficas del efecto de OBG3 sobre los TG del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. La Figura 15A muestra los niveles de TG en mg/dl; la Figura 15B muestra los TG como tanto por ciento del valor de partida.

Las Figuras 16A y 16B muestran representaciones gráficas del efecto de OBG3 sobre la glucosa del plasma, en ratones C57BL6/J después de una comida rica en grasas. La Figura 16A muestra los niveles de glucosa como mg/dl; la Figura 16B muestra los niveles de glucosa como tanto por ciento del valor de partida.

La Figura 17 muestra una tabla que identifica los SNP adicionales de APM1. Se muestra información sobre los cambios de bases conocidos, localización, marcadores previos, Amplicon, y cebadores directos e inversos para la microsecuenciación.

Las Figuras 18A y 18B muestran representaciones gráficas del efecto de la inyección de gACRP30 en ratones sobre los aumentos de FFA (Fig. 18A) y glucosa (Fig. 18B) resultantes de la inyección de epinefrina.

La Figura 19 muestra una representación gráfica del efecto del tratamiento con gACRP30 sobre el metabolismo de los ácidos grasos en el músculo aislado de ratones.

Las Figuras 20A y 20B muestran una representación gráfica del efecto del tratamiento con gACRP30 sobre el contenido en triglicéridos del músculo e hígado aislados de ratones.

Las Figuras 21A, 21B, 21C, y 21D muestran representaciones gráficas del efecto del tratamiento con gACRP30 sobre la ganancia y pérdida de peso en ratones. Los tratamientos mostrados son solución salina (rombo), ACRP30 (cuadrado), y gACRP30 (triángulo). La Fig. 21A muestra los resultados del tratamiento de ratones después de 19 días con una dieta rica en grasas. La Fig. 21B muestra los resultados del tratamiento de ratones después de 6 meses con una dieta rica en grasas.

La Figura 22 muestra una tabla de los valores químicos del análisis de sangre con inyecciones de solución salina, inyecciones de ACRP30, o inyecciones de gACRP30.

Las Figuras 23A y 23B muestran una separación por SDS-PAGE de la purificación de ACRP30 y gACRP30 (23A) y un producto de escisión de apm1 (23B). La Fig. 23A, pista II, muestra la forma completa de ACRP30 purificado por FPLC. La pista I muestra el producto de la escisión proteolítica gACRP30. La Fig. 23B muestra un producto de escisión de apm-1 después de inmunoprecipitación seguida por transferencia Western. El peso molecular aparente de esta forma truncada es 27 kDa, que corresponde a aproximadamente 70% de la forma completa de apm-1 (pista IV). Esta forma truncada no fue detectable cuando se usó para la inmunoprecipitación (pista V) un segundo anti-suero, específico para la región de la proteína no homóloga con la humana (HDQETTTQGGVLLPLPKGA) y el mismo antisuero anti-cabeza globular para la detección. Un suero preinmune del mismo animal no detectó ninguna proteína; se observó un dímero de apm-1 con ambos anticuerpos específicos (MW aparente 74 kDa).

La Figura 24 muestra un gráfico que representa la separación de los FFA del plasma después de la inyección de Intralipid siguiendo el tratamiento con gACRP30 (rombos) o una solución salina control (cuadrados).

Descripción detallada de la invención

Antes de describir la invención con mayor detalle, se indican las siguientes definiciones para ilustrar y definir el significado y alcance de los términos usados para describir aquí la invención.

Como se usan en esta memoria, de forma intercambiable, los términos “oligonucleótidos”, y “polinucleótidos” y ácido nucleico incluyen las secuencias de RNA, DNA, o híbridas RNA/DNA de más de un nucleótido ya sea en cadena sencilla o en forma dúplex. Los términos engloban los “nucleótidos modificados” que comprenden al menos una modificación, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación: (a) un grupo alternativo de enlace, (b) una forma análoga de purina, (c) una forma análoga de pirimidina, o (d) un análogo de azúcar. Para ejemplos de grupos análogos de enlace, purinas, pirimidinas, y azúcares, véase por ejemplo la publicación PCT No. WO 95/04064. Las secuencias de polinucleótidos descritas en esta memoria, pueden ser preparadas por cualquier método conocido, incluyendo la generación sintética, recombinante, *ex vivo*, o una combinación de las mismas, así como utilizando cualquier método de purificación conocido en la técnica.

Los términos estructura artificial de polinucleótido, polinucleótido recombinante y polipéptido recombinante se usan aquí de forma consistente con su uso en la técnica. Los términos “hacia arriba” y “hacia abajo” se usan también aquí de forma consistente con su uso en la técnica. Los términos “pares de bases” y “pares de bases Watson & Crick” se usan aquí de forma intercambiable y de forma consistente con su uso en la técnica. Similarmente, los términos “complementario”, “complemento del mismo”, “complemento”, “polinucleótido complementario”, “ácido nucleico complementario” y “secuencia de nucleótidos complementaria” se usan aquí de forma intercambiable y de forma consistente con su uso en la técnica.

El término “purificado” se usa aquí para describir un polinucleótido o vector polinucleótido descrito en esta memoria, que ha sido separado de otros compuestos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, otros ácidos nucleicos, car-

bohidratos, lípidos y proteínas (tales como las enzimas usadas en la síntesis del polinucleótido). Purificado se puede referir también a la separación de polinucleótidos cerrados covalentemente a partir de polinucleótidos lineales, o viceversa, por ejemplo. Un polinucleótido es sustancialmente puro cuando al menos aproximadamente 50%, 60%, 75%, o 90% de una muestra contiene una única secuencia polinucleotídica. En algunos casos esto implica una determinación entre conformaciones (lineal frente a cerrada covalentemente). Un polinucleótido sustancialmente puro comprende típicamente aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% peso/peso de una muestra de ácido nucleico. La pureza u homogeneidad de un polinucleótido se puede indicar por una serie de medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis de una muestra en gel de agarosa o de poliacrilamida, seguido por la visualización de una única banda de un polinucleótido después de la tinción del gel. Para ciertos propósitos se puede proporcionar una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica.

Similarmente, el término “purificado” se usa aquí para describir un polipéptido que ha sido separado de otros compuestos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, y otras proteínas. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido es sustancialmente puro cuando al menos aproximadamente 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 99,5% de las moléculas polipeptídicas de una muestra tienen una única secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido sustancialmente puro comprende típicamente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% peso/peso de una muestra de proteína. La pureza u homogeneidad de un polipéptido se indica por una serie de métodos bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis de una muestra en gel de agarosa o de poliacrilamida, seguido por la visualización de una única banda de un polipéptido después de la tinción del gel. Para ciertos propósitos se puede proporcionar una mayor resolución usando HPLC u otros métodos bien conocidos en la técnica.

Además, como se usa aquí, el término “purificado” no requiere la pureza absoluta; si no más bien, se usa como una definición relativa. Se contempla expresamente la purificación del material de partida o material natural hasta al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud. Alternativamente, la purificación se puede expresar como “al menos” un tanto por ciento de pureza relativa para los polinucleótidos (DNA, RNA o ambos) o los polipéptidos heterólogos. Preferiblemente, los polinucleótidos o polipéptidos descritos en esta memoria, tienen al menos; 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 98%, 99%, 99,5% o 100% de pureza en relación con los polinucleótidos o polipéptidos heterólogos. Son más preferidos los polinucleótidos o polipéptidos que tienen “al menos” una pureza que varía desde cualquier número, hasta la posición de las milésimas, entre 90% y 100% (por ejemplo, al menos 99,995% de pureza) en relación con los polinucleótidos o polipéptidos heterólogos. Adicionalmente, la pureza de los polinucleótidos o polipéptidos se puede expresar como un porcentaje (como se ha descrito antes) en relación con todos los materiales y compuestos aparte de la solución vehículo. Cada número, hasta la posición de las milésimas, puede ser reivindicado como especie individual de pureza.

El término “aislado” requiere que el material sea separado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se presenta en la naturaleza). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que aparece en la naturaleza presente en un animal viviente no está aislado, pero el mismo polinucleótido o DNA o polipéptido, separado de alguno o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición, y aún así estar aislado porque el vector o composición no es parte de su entorno natural.

Están específicamente excluidos de la definición de “aislado”: los cromosomas presentes en la naturaleza (por ejemplo, cromosomas extendidos), las genotecas de cromosomas artificiales, las genotecas genómicas, y las genotecas de cDNA que existen o como una preparación de ácido nucleico *in vitro* o como una preparación de una célula hospedante transfectada/transformada, en la que las células hospedantes están o en una preparación heterogénea *in vitro* o extendidas en placas como una población heterogénea de colonias individuales. También están específicamente excluidas las genotecas anteriores en las que un 5' EST representa hasta menos del 5% (o alternativamente 1%, 2%, 3%, 4%, 10%, 25%, 50%, 75%, o 90%, 95%, o 99%) del número de insertos de ácido nucleico en las moléculas del vector. También están específicamente excluidos el DNA genómico de la célula completa o las preparaciones de RNA de la célula completa (incluyendo dichas preparaciones de la célula completa que están mecánicamente divididas o enzimáticamente digeridas). También están específicamente excluidas las preparaciones anteriores de la célula completa o como una preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis (incluyendo transferencias de las mismas a membranas de filtro) en la que los polinucleótidos descritos en esta memoria, no han sido después separados de los polinucleótidos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separando después por corte de una única banda de una población heterogénea de bandas en un gel de agarosa o membrana de nilón).

El término “cebador” indica una secuencia específica de oligonucleótidos que es complementaria a una secuencia objetivo de nucleótidos y que se usa para hibridarse con la secuencia objetivo de nucleótidos. Un cebador sirve como un punto de iniciación para la polimerización de los nucleótidos catalizada por la DNA-polimerasa, RNA-polimerasa, o transcriptasa inversa.

El término “sonda” indica un segmento definido de ácido nucleico (o segmento análogo de nucleótido, por ejemplo, PNA como se define aquí más adelante) que se puede usar para identificar una secuencia polinucleotídica específica presente en una muestra, comprendiendo dicho segmento de ácido nucleico una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia polinucleotídica específica a ser identificada.

El término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos sin tener en cuenta la longitud del polímero. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco especifica ni excluye las modificaciones post-expresión de los polipéptidos. Por ejemplo, los polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glucosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares, están expresamente englobados en el término polipéptido. También están incluidos dentro de la definición los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos que no están presentes en la naturaleza, aminoácidos que sólo se presentan en la naturaleza en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados procedentes de sistemas de mamíferos etc), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto presentes en la naturaleza como no presentes en la naturaleza. Como se usa aquí, el término “OBG3” se refiere genéricamente al OBG3 murino o humano, a menos que se especifique otra cosa. Los términos “ACRP30” y “AdipoQ” se refieren específicamente a la forma murina de OBG3 y el término “APM-1” se refiere específicamente a la forma humana del gen.

Sin estar limitados por la teoría, los compuestos/polipéptidos descritos en esta memoria, son capaces de modular el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos, y se consideran útiles por tanto para tratar “enfermedades que implican el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos.” El término “tejidos periféricos” incluye el tejido muscular y el tejido adiposo. En las realizaciones preferidas, los compuestos/polipéptidos descritos en esta memoria, reparten los lípidos de la dieta hacia el músculo. En realizaciones preferidas alternativas, los lípidos de la dieta se reparten hacia el tejido adiposo. En otras realizaciones preferidas, los lípidos de la dieta se reparten hacia el hígado. En otras realizaciones adicionales preferidas, los compuestos/polipéptidos descritos en esta memoria, aumentan o reducen la oxidación de los lípidos de la dieta, preferiblemente de los ácidos grasos libres (FFA) por el músculo. Los lípidos de la dieta incluyen, pero sin limitarse a ellos, triglicéridos y ácidos grasos libres.

Las enfermedades preferidas que se cree que implican el reparto de los lípidos de la dieta incluyen la obesidad y enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad tales como obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina y diabetes tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos descritos en esta memoria, incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales relacionados con la obesidad incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, anorexia, y bulimia.

El término “heterólogo”, cuando se usa aquí, pretende designar cualquier polipéptido o polinucleótido distinto de un polipéptido OBG3 o gOBG3 o de un polinucleótido que codifica un polipéptido OBG3 o gOBG3 de la presente descripción.

Los términos “que comprende”, “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” se definen de acuerdo con su significado estándar. Pensando en esto, los términos pueden ser sustituidos uno por otro a lo largo de la presente solicitud con el fin de unirse al significado específico asociado con cada término.

El término “célula hospedante recombinante para” un polinucleótido particular descrito en esta memoria, significa una célula hospedante que ha sido alterada por las manos del hombre para contener dicho polinucleótido de un modo que no se encuentra naturalmente en dicha célula. Por ejemplo, dicha célula hospedante puede ser transfectada o transducida con dicho polinucleótido de forma transitoria o estable.

El término “obesidad” como se usa aquí, está definido en las clasificaciones de peso de la WHO (Kopelman (2000) Nature 404: 635643). Bajo peso es cuando el BMI es menor de 18,5 (delgado); saludable es con BMI de 18,5-24,9 (normal); sobrepeso grado 1 es con BMI de 25,0-29,9 (sobrepeso); sobrepeso grado 2 es con BMI de 30,0-39,0 (obesidad); sobrepeso grado 3 es con BMI mayor o igual a 40,0. El BMI es el índice de masa corporal (obesidad mórbida) y se expresa en kg/m². También se puede usar la circunferencia de la cintura para indicar el riesgo de complicaciones metabólicas, donde en los hombres una circunferencia mayor o igual a 94 cm indica un riesgo elevado, y mayor o igual a 102 cm indica un riesgo sustancialmente elevado. Similarmente para las mujeres, mayor o igual a 88 cm indica un riesgo elevado, y mayor o igual a 88 cm indica un riesgo sustancialmente elevado. La circunferencia de la cintura se mide en cm en el punto medio entre el borde inferior de las costillas y el borde superior de la pelvis. Otras medidas de la obesidad incluyen, pero sin limitarse a ellas, el espesor de los pliegues cutáneos que es una medida en cm del espesor de los pliegues cutáneos usando calibres, y la bioimpedancia, que se basa en el principio de que la masa sin grasa conduce mejor la corriente que la masa con grasa porque es principalmente una solución de electrolitos; la medida de la resistencia a una corriente débil (impedancia) aplicada entre las extremidades proporciona un estimado de la grasa corporal usando una ecuación derivada empíricamente.

El término “agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refiere a un compuesto o polipéptido descrito en esta memoria, que modula el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos como se ha descrito previamente. Preferiblemente, el agente aumenta o reduce la oxidación de los lípidos de la dieta, preferiblemente de los ácidos grasos libres (FFA) por el músculo. Preferiblemente el agente reduce o aumenta el peso corporal de los individuos o se usa para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad tal como obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ate-

romatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina y diabetes tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardiaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos descritos en esta memoria, incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales relacionados con la obesidad de la invención incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, anorexia, y bulimia.

Los términos “respuesta a un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refieren a la eficacia del fármaco, incluyendo pero sin limitarse a ellas, la capacidad para metabolizar un compuesto, la capacidad para convertir un pro-fármaco en un fármaco activo, y la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinamia (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo.

Los términos “efectos secundarios a un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” se refieren a los efectos adversos de la terapia que resultan de las extensiones de la principal acción farmacológica del fármaco o a las reacciones adversas idiosincrásicas que resultan de una interacción del fármaco con factores únicos del hospedante. Los “efectos secundarios a un agente que actúa sobre el reparto de los lípidos de la dieta entre el hígado y los tejidos periféricos” pueden incluir, pero sin limitarse a ellas, reacciones adversas tales como toxicidades dermatológicas, hematológicas o hepatológicas e incluyen además úlceras gástricas e intestinales, trastornos de la función plaquetaria, lesiones renales, nefritis, rinitis vasomotora con profusas secreciones acuosas, edema angioneurótico, urticaria generalizada, y asma bronquial a edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión, y shock.

El término “enfermedades y trastornos relacionados con OBG3” como se usa aquí, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que comprende un funcionamiento aberrante de OBG3, o que podría ser tratado o prevenido modulando los niveles o la actividad de OBG3. El “funcionamiento aberrante de OBG3” incluye, pero sin limitarse a ellos, niveles de expresión de OBG3 aberrantes (ya sea aumentados o reducidos, pero preferiblemente reducidos), actividad aberrante de OBG3 (ya sea aumentada o reducida), e interacciones aberrantes con ligandos o compañeros de unión (ya sean aumentadas o reducidas). Por “aberrante” se entiende un cambio del tipo, o nivel de actividad visto en las células, tejidos, o pacientes normales, o visto previamente en la célula, tejido, o paciente antes de la aparición de la enfermedad. En las realizaciones preferidas, estas enfermedades y trastornos relacionados con OBG3 incluyen la obesidad y las enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad descritos previamente.

El término “tratamientos estéticos” se entiende que incluye tratamientos con los compuestos o polipéptidos descritos en esta memoria, que aumentan o reducen la masa corporal de un individuo cuando el individuo no está clínicamente obeso ni clínicamente delgado. Así, estos individuos tienen un índice de masa corporal (BMI) por debajo del umbral de la obesidad clínica (por ejemplo, por debajo de 25 kg/m²) y por encima del umbral de la delgadez clínica (por ejemplo, por encima de 18,5 kg/m²). En adición, estos individuos están preferiblemente sanos (por ejemplo no tienen una enfermedad o trastorno de la invención relacionados con la obesidad). Los “tratamientos estéticos” se entienden también que engloban, en algunas circunstancias, aumentos más localizados del tejido adiposo, por ejemplo, ganancias o pérdidas específicamente alrededor de la cintura o de las caderas, o alrededor de las caderas y de los muslos, por ejemplo. Estas ganancias o pérdidas localizadas de tejido adiposo se pueden identificar por aumentos o reducciones en el tamaño de la cintura o de las caderas, por ejemplo.

El término “prevenir” como se usa aquí, se refiere a administrar un compuesto antes de la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad o condición de modo que se previene una manifestación física de aberraciones asociadas con la obesidad o OBG3.

El término “tratar” como se usa aquí, se refiere a administrar un compuesto después de la aparición de los síntomas clínicos.

El término “con necesidad de tratamiento” como se usa aquí, se refiere a un juicio hecho por una persona que presta cuidados de salud (por ejemplo un médico, enfermera, enfermeras practicantes, etc en el caso de los seres humanos; el veterinario en el caso de los animales, incluyendo los mamíferos no humanos) de que un individuo o animal requiere o tendrá beneficios del tratamiento. Este juicio se hace basándose en una variedad de factores que están dentro del campo de un experto en cuidados de salud, pero que incluyen el conocimiento de que el individuo o animal está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una condición que es tratable por los compuestos descritos en esta memoria.

El término “percibe una necesidad de tratamiento” se refiere a una determinación sub-clínica de que un individuo desea reducir peso por razones estéticas como se ha expuesto bajo el “tratamiento estético” anterior. El término “percibe una necesidad de tratamiento” en otras realizaciones se puede referir a la decisión que el dueño de un animal toma sobre el tratamiento estético del animal.

El término “individuo” como se usa aquí, se refiere a cualquier animal, incluyendo los mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos, o primates, y lo más preferiblemente los seres humanos.

El término “animal no humano” se refiere a cualquier vertebrado no humano, incluyendo las aves y más usualmente los mamíferos, preferiblemente primates, animales tales como cerdos, cabras, ovejas, burros, caballos, gatos, perros, conejos o roedores, más preferiblemente ratas o ratones. Tanto los términos “animal” como “mamífero” incluyen expresamente los sujetos humanos a menos que vayan acompañados por el término “no humano”.

En esta invención se ha encontrado que un fragmento de OBG3, llamado gOBG3, es capaz de reducir de forma significativa la respuesta postprandial de los ácidos grasos libres, glucosa, y triglicéridos del plasma, en ratones alimentados con una comida rica en grasas/sacarosa. No hubo ningún efecto significativo sobre los niveles de leptina, insulina o glucagón. En adición, se encontró que el gOBG3 aumenta la oxidación de los ácidos grasos libres del músculo *in vitro* y *ex vivo*. Además, se demostró que el gOBG3 reduce y después que previene un aumento en la ganancia de peso en ratones que hayan sido alimentados con una dieta rica en grasas/sacarosa durante 19 días. En ratones que habían sido mantenidos con la misma dieta rica en grasas/sacarosa durante 6 meses, el tratamiento con gOBG3 dio como resultado una pérdida de peso sostenida a lo largo de 16 días que fue significativa, a pesar de ser mantenidos con la dieta rica en grasas/sacarosa.

La presente invención engloba el uso de fragmentos de polipéptido gOBG3 en el reparto de los ácidos grasos libres (FFA) y como una importante herramienta nueva para controlar la homeostasis de energía. De los tejidos que pueden de forma significativa eliminar los lípidos de la circulación y causar la oxidación de los FFA, el músculo es cuantitativamente el más importante. El OBG3 globular es una nueva y única herramienta farmacológica que controla el peso corporal sin interferir con la ingesta de alimentos.

I. Fragmentos globulares del polipéptido OBG3 para uso en la invención

Se han identificado fragmentos del polipéptido OBG3 que tienen actividad medible *in vitro* e *in vivo*. Estas actividades incluyen, pero sin limitarse a ellas, reducción de la respuesta postprandial de ácidos grasos libres, glucosa, y triglicéridos del plasma, en ratones alimentados con una comida rica en grasas/sacarosa (Ejemplo 8), aumento de la oxidación de los ácidos grasos libres en el músculo *in vitro* y *ex vivo* (Ejemplo 12), y pérdida de peso sostenida en los ratones sometidos a una dieta rica en grasas/sacarosa (Ejemplo 14). Se proporcionan también otros ensayos de la actividad del fragmento del polipéptido OBG3 *in vitro* e *in vivo* (Ejemplos 4, 7, 9, 11, 13, por ejemplo), y pueden ser diseñados ensayos equivalentes por los expertos en la técnica.

Por contraste, el polipéptido OBG3 “intacto” o “de longitud completa” no tiene ni *in vivo* ni *in vitro* las actividades que han sido identificadas para los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria. En la mayoría de los casos, las actividades o no están presentes o como mínimo son indetectables sobre los valores de control en los ensayos usados. En otros casos, las actividades se pueden medir, pero están presentes o en niveles extremadamente reducidos y/o requieren significativamente más proteína en una base molar en comparación con los fragmentos de polipéptido gOBG3 (véase, p. ej. el Ejemplo 10). Por polipéptido OBG3 “intacto” o “de longitud completa” como se usa aquí, se expresa la secuencia polipeptídica de longitud completa de cualquier polipéptido OBG3, desde la metionina en N-terminal hasta el codón de terminación en C-terminal. Ejemplos de polipéptidos OBG3 intactos o de longitud completa se encuentran en la SEQ ID NO: 2 (ratón), en la SEQ ID NO: 4 (ratón), y en la SEQ ID NO: 6 (humanos). El término “fragmentos de polipéptido OBG3” como se usa aquí, se refiere a fragmentos del polipéptido OBG3 “intacto” o “de longitud completa” que tiene “actividad relacionada con la obesidad”. El término “fragmentos de polipéptido gOBG3” se refiere a fragmentos de polipéptido de la región globular solamente y es por tanto un término más limitado que “fragmentos de polipéptido OBG3”. El término “fragmento” significa un polipéptido que tiene una secuencia que es enteramente la misma como parte, pero no el todo, de un polipéptido OBG3 intacto o de longitud completa. Dichos fragmentos pueden ser “libres” (esto es, no son parte ni están fijados a otros polipéptidos), o uno o más fragmentos pueden estar presentes en un único polipéptido. Los fragmentos de OBG3 o gOBG3 son fragmentos contiguos del polipéptido OBG3 de longitud completa a menos que se especifique otra cosa.

El término “actividad relacionada con la obesidad” como se usa aquí, se refiere al menos a una, y preferiblemente a todas, las actividades descritas en esta memoria, para los fragmentos del polipéptido OBG3. Se proporcionan aquí ensayos para la determinación de estas actividades (p. ej. los ejemplos 4, 7-9, 11-14), y pueden ser diseñados ensayos equivalentes por los expertos en la técnica. Opcionalmente, la “actividad relacionada con la obesidad” se puede seleccionar del grupo que consiste en reparto de lípidos, metabolismo de lípidos, y actividad tipo insulina, o una actividad dentro de una de estas categorías. Por actividad de “reparto de lípidos” se entiende la capacidad para efectuar la localización de los lípidos de la dieta entre los grupos principales de tejidos incluyendo, tejido adiposo, hígado, y músculo. Se ha demostrado en la invención que los fragmentos de polipéptido gOBG3 desempeñan un papel en el reparto de lípidos al músculo, hígado o tejido adiposo. Por actividad de “metabolismo de los lípidos” se entiende la capacidad para influir en el metabolismo de los lípidos. Se ha demostrado en la invención que los fragmentos de polipéptido gOBG3 tienen la capacidad de afectar al nivel de los ácidos grasos libres en el plasma así como de aumentar el metabolismo de los lípidos en el músculo a través de experimentos de oxidación de los ácidos grasos libres (Ejemplos 4, 8, 10, 11, 12) y afectar de modo transitorio a los niveles de triglicéridos en el plasma y en el músculo (Ejemplos 8, 10 13). Por actividad “tipo insulina” se entiende la capacidad de los fragmentos del polipéptido OBG3 para modular los niveles de glucosa en el plasma. Se ha encontrado en la invención que los fragmentos de polipéptido gOBG3 no tienen un impacto significativo en los niveles de insulina pero sí tienen impacto en los niveles de glucosa similarmente a los efectos de la insulina (Ejemplos 9 y 10). Estos efectos no se ven en presencia del polipéptido OBG3 intacto (de longitud completa) o son significativamente mayores en presencia de los fragmentos de polipéptido OBG3 en comparación con el polipéptido OBG3 de longitud completa.

El término “significativamente mayor” como se usa aquí, se refiere a una comparación de la actividad de un fragmento del polipéptido OBG3 en un ensayo relacionado con la obesidad comparada con la actividad de un polipéptido OBG3 de longitud completa en el mismo ensayo. Por “significativamente” como se usa aquí, se entiende estadísticamente significativo como es típicamente determinado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los datos se calculan típicamente como la media $\pm$ SEM, y un valor de $p \leq 0,05$ es considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realiza típicamente usando o la prueba t de Student no pareada o la prueba t de Student pareada, según sea apropiado en cada estudio. Ejemplos de un cambio significativo en la actividad como resultado de la presencia de un fragmento del polipéptido OBG3 en comparación con la presencia de un polipéptido OBG3 de longitud completa incluyen un aumento o una reducción en un parámetro dado de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. Uno o más, pero no necesariamente todos, los parámetros medibles cambiarán de forma significativa en la presencia de los fragmentos de polipéptido gOBG3 en comparación con la presencia de un polipéptido OBG3 intacto.

Se proporcionan “ensayos relacionados con la obesidad” representativos en los ejemplos 4, 7-9, y 11-14. Estos ensayos incluyen, pero sin limitarse a ellos, métodos para medir la respuesta postprandial, métodos para medir la oxidación de los ácidos grasos libres, y métodos para medir la modulación del peso. En las realizaciones preferidas, se mide la respuesta post-prandial en animales no humanos, preferiblemente ratones. En las realizaciones preferidas se miden los cambios en los lípidos de la dieta, preferiblemente los ácidos grasos libres y/o los triglicéridos. En otras realizaciones, se miden otros parámetros fisiológicos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, los niveles de glucosa, insulina, y leptina. En otras realizaciones preferidas, se mide la oxidación de los ácidos grasos libres en células *in vitro* o *ex vivo*, preferiblemente en las células del músculo o tejido de animales no humanos, preferiblemente ratones. También en otras realizaciones preferidas se mide la modulación del peso en seres humanos o en animales no humanos, preferiblemente roedores (ratas o ratones), primates, caninos, felinos o porcinos, sometidos a una dieta rica en grasas/sacarosa. Opcionalmente, la “actividad relacionada con la obesidad” incluye otras actividades no específicamente identificadas aquí. En general, los “parámetros medibles” en relación con la obesidad y el campo de la investigación metabólica se pueden seleccionar del grupo que consiste en niveles de ácidos grasos libres, oxidación de los ácidos grasos libres, niveles de triglicéridos, niveles de glucosa, niveles de insulina, niveles de leptina, ingesta de alimentos, peso, unión de leptina y lipoproteína, absorción y degradación y expresión de LSR (receptor de lipólisis estimulado).

En estos ensayos relacionados con la obesidad, los fragmentos preferidos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, pero no los polipéptidos OBG3 de longitud completa, podrían causar un cambio significativo en al menos uno de los parámetros medibles seleccionados del grupo que consiste en lipemia post-prandial, niveles de ácidos grasos libres, niveles de triglicéridos, niveles de glucosa, oxidación de los ácidos grasos libres, y peso. Alternativamente, los fragmentos de polipéptido gOBG3 preferidos, pero no los polipéptidos OBG3 de longitud completa, podrían tener un cambio significativo en al menos uno de los parámetros medibles seleccionados del grupo que consiste en un aumento en la actividad LSR, un aumento en la actividad de la leptina y un aumento en la actividad de la lipoproteína. Por actividad de “LSR” se entiende la expresión de LSR sobre la superficie de la célula, o en una conformación particular, así como su capacidad para unir, absorber, y degradar la leptina y la lipoproteína. Por actividad de “leptina” se entiende su unión, absorción y degradación por LSR, así como su transporte a través de la barrera hematoencefálica, y potencialmente estas incidencias cuando LSR no es necesariamente el factor mediador o el único factor mediador. Similarmente, por actividad de “lipoproteína” se entiende su unión, absorción y degradación por LSR, así como estas incidencias cuando LSR no es necesariamente el factor mediador o el único factor mediador.

Se pueden usar en la invención fragmentos de polipéptido gOBG3 aislados, purificados o recombinantes. Los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, son útiles para reducir o aumentar (usando antagonistas de los polipéptidos OBG3) el peso corporal o bien como un tratamiento de estética o para el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad. Los fragmentos de polipéptido OBG3 son útiles también, entre otros, en los ensayos de cribado de agonistas o antagonistas de la actividad del fragmento de OBG3, para inducir anticuerpos específicos del fragmento de OBG3, y en ensayos de diagnóstico.

El polipéptido OBG3 de longitud completa está constituido por al menos cuatro regiones distintas que incluyen:

1. una supuesta secuencia señal con N-terminal de los aminoácidos 1-17 de la SEQ ID NO: 6, de la SEQ ID NO: 2, o de la SEQ ID NO: 4;
2. una región única de los aminoácidos 18-41 de la SEQ ID NO: 6 o 18-44 de la SEQ ID NO: 2, o de la SEQ ID NO: 4;
3. una región tipo colágeno de los aminoácidos 42-107 de la SEQ ID NO: 6 o 45-110 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4; y
4. una región globular de los aminoácidos 108-244 de la SEQ ID NO: 6 o 111-247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4.

El término “restos de colágeno” se usa de la manera estándar en la técnica para indicar el triplete de aminoácidos glicina, X, Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido.

ES 2 312 450 T3

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, se proporcionan preferiblemente en una forma aislada, y pueden estar parcial o sustancialmente purificados. Una versión producida recombinantemente de un fragmento del polipéptido OBG3 se puede purificar sustancialmente mediante el método de una etapa descrito por Smith *et al.* ((1988) Gene 67(1): 31-40) o por los métodos descritos en esta memoria, o conocidos en la técnica (véase, p. ej. los Ejemplos 1-3). Los fragmentos se pueden purificar también a partir de fuentes naturales o recombinantes usando anticuerpos dirigidos frente a los fragmentos de polipéptido descritos en esta memoria, por métodos conocidos en la técnica de purificación de proteínas.

Se contemplan también específicamente las preparaciones de fragmentos de polipéptido gOBG3 que incluyen una purificación parcial o una selección de los fragmentos de polipéptido gOBG3. Estas preparaciones crudas se prevé que sean el resultado de la concentración de células que expresan fragmentos de polipéptido OBG3 con quizás algunas etapas de purificación adicionales, pero antes de completar la purificación del fragmento. Las células que expresan fragmentos de polipéptido OBG3 están presentes en un sedimento, se lisan, o el polipéptido crudo se liofiliza, por ejemplo.

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 para uso en la invención, se seleccionan de los aminoácidos 101 a 244, 108 a 244, o 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6 y los aminoácidos 104 a 247, 111 a 247, o 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4. El fragmento gOBG3 es humano o de ratón, pero lo más preferiblemente humano.

Los fragmentos gOBG3 descritos en esta memoria, incluyen variantes de los fragmentos gOBG3 descritos antes.

Variantes

Se podrá reconocer por los expertos normales en la técnica que algunos aminoácidos de las secuencias del fragmento gOBG3 descrito en esta memoria, pueden ser variados sin efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína; pero habrá aminoácidos críticos en la secuencia del fragmento que determinan la actividad. Así, se pueden usar en la invención las variantes de los fragmentos de polipéptido gOBG3 que tienen actividad relacionada con la obesidad como se ha descrito antes. Tales variantes incluyen las secuencias del fragmento gOBG3 con una o más sustituciones de aminoácidos permisivas ya sea procedentes de mutaciones naturales o de manipulación humana seleccionadas según las reglas generales conocidas en la técnica de modo que tengan poco efecto sobre la actividad. A continuación se proporciona una guía acerca de cómo hacer sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes.

Hay dos métodos principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio (véase, Bowie, *et al.* (1990) Science, 247,1306-10). El primer método se basa en el proceso de evolución, en el que las mutaciones son aceptadas o rechazadas por selección natural. El segundo método usa la ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o cribados para identificar las secuencias que mantienen la funcionalidad.

Estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos e indican qué cambios de aminoácidos son probablemente permisivos en una cierta posición de la proteína. Por ejemplo, los restos aminoácidos más escondidos requieren cadenas laterales no polares, mientras que algunas características de las cadenas laterales de superficie son en general conservadas. Otras de dichas sustituciones fenotípicamente silentes están descritas por Bowie *et al.* (citado antes) y las referencias citadas allí.

Se ven típicamente como sustituciones conservadoras los reemplazamientos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Phe; el intercambio de los restos hidroxilo Ser y Thr; el cambio de los restos ácidos Asp y Glu; la sustitución entre los restos amida Asn y Gln; el cambio de los restos básicos Lys y Arg; y los reemplazamientos entre los restos aromáticos Phe, Tyr. En adición, los siguientes grupos de aminoácidos generalmente representan cambios equivalentes: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; (5) Phe, Tyr, Trp, His.

Similarmente, los aminoácidos de las secuencias del fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria, que son esenciales para la función pueden ser identificados también por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediante alanina (véase, por ejemplo, Cunningham, *et al.* (1989) Science 244 (4908): 1081-5). El último procedimiento introduce mutaciones simples de alanina en cada resto de la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se ensayan entonces en cuanto actividad relacionada con la obesidad usando los ensayos que se han descrito antes. Son de especial interés las sustituciones de aminoácidos cargados con otros aminoácidos cargados o neutros que pueden producir proteínas con mejores características altamente deseables, tales como menos agregación. La agregación no sólo puede reducir la actividad sino que también puede ser problemática cuando se preparan formulaciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables, porque los agregados pueden ser inmunogénicos (véase, por ejemplo, Pinckard, *et al.*, (1967) Clin. Exp. Immunol 2: 331-340; Robbins, *et al.*, (1987) Diabetes Jul; 36 (7): 838-41; y Cleland, *et al.*, (1993) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 10 (4): 307-77).

La variante del fragmento gOBG3 descrito en esta memoria, puede ser, por ejemplo: una en la que uno o más de los restos aminoácidos se sustituyen con un resto aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un resto aminoácido conservado) y dicho resto aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético (esto es, puede ser un aminoácido no presente en la naturaleza). Un fragmento gOBG3 descrito en esta memoria, puede también estar fusionado con otro compuesto para aumentar la semivida del fragmento (polietilenglicol); o uno

ES 2 312 450 T3

en el que los aminoácidos adicionales de un péptido con la región de fusión IgG Fc están fusionados con el fragmento gOBG3. Dichas variantes y fusiones se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria.

- 5 Preferiblemente la variante tiene al menos una sustitución conservadora de aminoácidos pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Otra realización específica de un fragmento gOBG3 modificado descrito en esta memoria, es un polipéptido que es resistente a la proteólisis, por ejemplo un fragmento gOBG3 en el que un enlace -CONH-péptido está modificado y reemplazado por uno o más de los siguientes: un enlace reducido (CH₂NH); un enlace retro inverso (NHCO); un enlace metilen-oxi (CH₂-O); un enlace tiometileno (CH₂-S); un enlace carba (CH₂CH₂); un enlace cetometileno (CO-CH₂); un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂); un enlace (N-N); un enlace E-alceno; o un enlace -CH=CH-. Así, la invención incluye también el uso de un fragmento gOBG3 o de una variante del mismo como se describe en esta memoria, en el cual al menos un enlace peptídico ha sido modificado como se ha descrito antes.

15 En adición, los aminoácidos tienen quiralidad dentro del cuerpo L o D. En algunas realizaciones puede ser preferible alterar la quiralidad de los aminoácidos en los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, con el fin de extender la semivida dentro del cuerpo. Así, en algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos están preferiblemente en la configuración L. En otras realizaciones, uno o más de los aminoácidos están preferiblemente en la configuración D.

Tanto por ciento de identidad

Un polipéptido puede incluir polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 50% de identidad, al menos 60% de identidad, o 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con un fragmento de OBG3 o gOBG3. Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, con 95% "de identidad" con una secuencia de aminoácidos de un fragmento OBG3 o gOBG3 se entiende que la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia del fragmento del polipéptido OBG3 o gOBG3 excepto en que puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del fragmento del polipéptido OBG3 o gOBG3. La secuencia de referencia es el fragmento del polipéptido OBG3 o gOBG3 con una secuencia que corresponde a la secuencia del listado de secuencias. Así, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 95% de identidad con una secuencia de aminoácidos del fragmento de OBG3 o gOBG3, hasta 5% (5 de 100) de los restos de aminoácidos de la secuencia pueden estar insertados, deletados, o sustituidos con otro aminoácido en comparación con la secuencia del fragmento del polipéptido OBG3 o gOBG3. Estas alteraciones pueden tener lugar en el amino o carboxi terminales o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre restos de la secuencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia.

Como un asunto práctico, si cualquier polipéptido particular es idéntico o no en porcentaje a un fragmento de OBG3 o gOBG3 puede ser determinado convencionalmente usando programas conocidos de ordenador. Tales algoritmos y programas incluyen, pero de ningún modo están limitados a ellos, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, y CLUSTALW (Pearson and Lipman, (1988) Proc Natl Acad Sci USA Apr; 85 (8): 2444-8; Altschul *et al.*, (1990) J Mol. Biol. 215 (3): 403-410; Thompson *et al.*, (1994) Nucleic Acids Res. 22 (2): 4673-4680; Higgins *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266: 383-402; Altschul *et al.*, (1997) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; Altschul *et al.*, (1993) Nature Genetics 3: 266-272). En una realización particularmente preferida, las homologías de la secuencia de proteína y ácido nucleico se evalúan usando el Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"), que es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar; 87 (6): 2264-8; Altschul *et al.*, 1990, 1993, 1997, todos citados antes). En particular, se usan cinco programas BLAST específicos para realizar las siguientes tareas:

50 (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia problema (secuencia query) de aminoácidos frente a una secuencia de proteínas de la base de datos;

(2) BLASTN compara una secuencia query de nucleótidos frente a una secuencia de nucleótidos de la base de datos;

55 (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptual en seis marcos de lectura de una secuencia query de nucleótidos (ambas cadenas) frente a una secuencia de proteínas de la base de datos;

(4) TBLASTN compara una secuencia query de proteínas frente a una secuencia de nucleótidos de la base de datos traducida en los seis marcos de lectura (ambas cadenas); y

(5) TBLASTX compara las traducciones en seis marcos de lectura de una secuencia query de nucleótidos frente a las traducciones en seis marcos de lectura de una secuencia de nucleótidos de la base de datos.

65 Los programas BLAST identifican las secuencias homólogas identificando segmentos similares, a los que se denomina aquí "pares de segmentos de mejor puntuación" entre una secuencia query de aminoácidos o de ácido nucleico y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente a partir de una secuencia de proteína o de ácido nucleico de la base de datos. Los pares de segmentos de mejor puntuación se identifican preferiblemente (esto es, son alineados) por

medio de una matriz de puntuación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (véase, Gonnet *et al.*, (1992) Science Jun 5; 256 (5062): 1443-5; Henikoff and Henikoff (1993) Proteins Sep; 17 (1): 49-61). Menos preferiblemente, se pueden usar también las matrices PAM o PAM250 (véase, por ejemplo, Schwartz and Dayhoff, eds, (1978) Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation). Los programas BLAST evalúan la significancia estadística de todos los pares de segmentos de mejor puntuación identificados, y preferiblemente seleccionan aquellos segmentos que satisfacen el umbral de significancia especificado por el usuario, tal como un porcentaje de homología especificado por el usuario. Preferiblemente, la significancia estadística de un par de segmentos de mejor puntuación se evalúa usando la fórmula de significancia estadística de Karlin (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul, (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar; 87 (6): 2264-8). Los programas BLAST se pueden usar con los parámetros por defecto o con parámetros modificados proporcionados por el usuario. Preferiblemente, los parámetros son parámetros por defecto.

Un método preferido para determinar la mejor concordancia global entre una secuencia query (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto (secuencia de la base de datos), también denominada alineamiento global de secuencias, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (1990) Comp. App. Biosci. 6: 237-245. En un alineamiento de secuencias la secuencia query y la secuencia de la base de datos son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias se da en tanto por ciento de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento de aminoácidos en un FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, penalización por desparejamiento=1, penalización por unión=20, grupo aleatorio=25 longitud=0, puntuación umbral =1, tamaño de la ventana=longitud de la secuencia, penalización por gap=5, penalización por tamaño del gap=0,05, tamaño de la ventana =247 o la longitud de la secuencia de aminoácidos de la base de datos, cualquiera que sea más corta.

Si la secuencia de la base de datos es más corta que la secuencia query debido a las deleciones en N- o C-terminal, no debido a las deleciones internas, los resultados, en porcentaje de identidad, deben ser corregidos manualmente porque el programa FASTDB no cuenta las truncaciones en N- y C-terminal de la secuencia de la base de datos cuando se calcula la identidad global en tanto por ciento. Para las secuencias de la base de datos truncadas en los N- y C-terminales, en relación con la secuencia query, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia query que son N- y C-terminales de la secuencia de la base de datos, que no son concordantes/alineados con un resto correspondiente de la base de datos, como un tanto por ciento de las bases totales de la secuencia query. Si un resto es concordante/alineado se determina por los resultados del alineamiento de la secuencia con FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del tanto por ciento de identidad, calculado por el programa anterior FASTDB usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación final de tanto por ciento de identidad. Esta puntuación final de tanto por ciento de identidad es la que se usa para los fines de la presente descripción. Solamente los restos de los N- y C-terminales de la secuencia de la base de datos, que no son concordantes/alineados con la secuencia query, son considerados para los fines de ajustar manualmente la puntuación del tanto por ciento de identidad. Esto es, solamente los restos de aminoácidos de la secuencia query fuera de los restos más apartados de N- y C-terminales de la secuencia de la base de datos.

Por ejemplo, una secuencia de la base de datos de 90 restos de aminoácidos es alineada con una secuencia query de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción tiene lugar en el N-terminal de la secuencia de la base de datos y por tanto, el alineamiento con FASTDB no concuerda/alinea con los primeros restos en el N-terminal. Los 10 restos no emparejados representan el 10% de la secuencia (número de restos en el N- y C-terminales no concordantes/número total de restos en la secuencia query) así se resta el 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculada con el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes fueran perfectamente concordantes el porcentaje de identidad final sería del 90%.

En otro ejemplo, una secuencia de la base de datos de 90 restos se compara con una secuencia query de 100 restos. Esta vez las deleciones son internas de forma que no hay restos en los N- o C-terminales de la secuencia de la base de datos, que no son concordantes/alineados con la secuencia query. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no es corregido manualmente. Una vez más, solamente los restos de las posiciones fuera de los extremos N y C-terminales de la secuencia de la base de datos, como se visualizan en el alineamiento por FASTDB, que no son concordantes/alineados con la secuencia query se corrigen manualmente. No se hacen otras correcciones manuales para los fines de la presente descripción.

Producción

Nótese, a través de la descripción, que siempre que se trata de fragmentos de polipéptido OBG3, se pretende específicamente que estén incluidos los fragmentos gOBG3 como un subconjunto preferido de fragmentos de polipéptido OBG3.

Los fragmentos de polipéptido OBG3 se aíslan preferiblemente de muestras de tejidos humanos o de mamíferos o son expresados a partir de genes humanos o de mamíferos en células de seres humanos o de mamíferos. Los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, pueden ser preparados usando métodos de expresión rutinarios conocidos en la técnica. El polinucleótido que codifica los fragmentos de polipéptido deseados está ligado a un vector de expresión, adecuado para cualquier hospedante conveniente. Ambos sistemas hospedantes, eucariótico y procariótico, se usan para formar fragmentos de polipéptido recombinantes. El fragmento de polipéptido se aísla después de

las células lisadas o del medio de cultivo y se purifica hasta donde sea necesario para el uso que se pretende. La purificación se realiza por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, extracción diferencial, fraccionamiento de sales, cromatografía, centrifugación, y similares. Véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology* para una variedad de métodos para purificar las proteínas. Véanse también los Ejemplos 1-3 para los métodos usados previamente para los fragmentos de polipéptido OBG3.

Los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser aislados de la leche. Los polipéptidos se pueden purificar como polipéptidos OBG3 de longitud completa, que pueden ser divididos entonces, si es apropiado, *in vitro* para generar un fragmento de OBG3, o, alternativamente, los propios fragmentos de OBG3 pueden ser purificados a partir de la leche. Se puede usar cualquiera de una serie de métodos para purificar los presentes polipéptidos de la leche, incluyendo los descritos en *Protein Purification Applications, A Practical Approach* (New Edition), Edited by Simon Roe, AEA Technology Products and Systems, Biosciences, Harwell; Clark (1998) *J Mammary Gly Biol Neoplasia* 3: 337-50; Wilkins and Velandier (1992) 49: 333-8; U. S. Patent Nos. 6.140.552; 6.025.540; Hennighausen, *Protein Expression and Purification*, vol. 1, pp.3-8 (1990); Harris *et al.* (1997) *Bioseparation* 7: 31-7; Degener *et al.* (1998) *J. Chromatog.* 799: 125-37; Wilkins (1993) *J. Cell. Biochem. Suppl.* 0 (17 part A). En una típica realización, se centrifuga la leche, por ejemplo, a una velocidad relativamente baja para separar la fracción lipídica, y se centrifuga entonces el sobrenadante acuoso a una alta velocidad para separar la caseína de la leche de la restante fracción "suero". A menudo, se encuentran proteínas biomédicas en esta fracción de suero, y se pueden aislar de esta fracción usando procedimientos cromatográficos estándar u otros procedimientos comúnmente usados para purificación de las proteínas, por ejemplo como se describe en otro sitio de la presente solicitud. Los polipéptidos OBG3 se pueden purificar usando anticuerpos específicos para los polipéptidos OBG3, por ejemplo usando cromatografía de afinidad. En adición, se pueden usar métodos para aislar fragmentos particulares de OBG3, por ejemplo métodos electroforéticos u otros para aislar proteínas de un particular tamaño. Los polipéptidos OBG3 aislados usando estos métodos pueden estar presentes en la naturaleza, se ha descubierto que como polipéptidos OBG3 están naturalmente presentes en la leche de mamíferos (véase, p. ej. el Ejemplo 17), o pueden ser el resultado de la producción recombinante de la proteína en las glándulas mamarias de un mamífero no humano, como se describe más adelante. El fragmento de OBG3 puede ser producido como una proteína de fusión con una secuencia polipeptídica antigénica, heteróloga, cuya secuencia antigénica puede ser usada para purificar la proteína, por ejemplo, utilizando la metodología estándar de inmuno-afinidad.

En adición, se pueden producir por síntesis química fragmentos de proteína más cortos. Alternativamente, las proteínas se pueden extraer de células o tejidos de seres humanos o de animales. Los métodos para purificar las proteínas son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de detergentes o agentes caotrópicos para romper las partículas seguido por extracción diferencial y separación de los polipéptidos por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, sedimentación según la densidad, y electroforesis en gel.

El cDNA de cualquier fragmento de OBG3, incluyendo el de la Fig. 4, se puede usar para expresar los fragmentos de polipéptido OBG3. El ácido nucleico que codifica el fragmento de OBG3 a ser expresado puede estar operativamente ligado a un promotor en un vector de expresión usando la tecnología convencional de clonación. El cDNA del fragmento de OBG3 inserto en el vector de expresión puede comprender la secuencia codificadora para: el polipéptido OBG3 de longitud completa (para ser modificado más tarde); de 6 aminoácidos a 6 aminoácidos menos que el polipéptido OBG3 de longitud completa; un fragmento gOBG3; o variantes y % de polipéptidos similares.

El vector de expresión puede ser cualquiera de los sistemas de expresión en mamíferos, levaduras, insectos o bacterias conocidos en la técnica, algunos de los cuales están descritos en esta memoria, y ejemplos de los cuales se dan en los Ejemplos (Ejemplos 1-3). Los vectores y sistemas de expresión comercialmente disponibles se pueden conseguir de una variedad de proveedores incluyendo Genetics Institute (Cambridge, MA), Stratagene (La Jolla, California), Promega (Madison, Wisconsin), e Invitrogen (San Diego, California). Si se desea, para aumentar la expresión y facilitar el plegamiento apropiado de las proteínas, el contexto de los codones y el emparejamiento de los codones de la secuencia puede ser optimizado para el organismo particular de expresión en el cual se introduce el vector de expresión, como es explicado por Hatfield, *et al.*, Patente de Estados Unidos No. 5.082.767.

Si el ácido nucleico que codifica los fragmentos de polipéptido OBG3 carece de una metionina que sirva como sitio de iniciación, se puede introducir una metionina de iniciación próxima al primer codón del ácido nucleico usando técnicas convencionales. Similarmente, si el inserto del cDNA del fragmento del polipéptido OBG3 carece de una señal poly A, esta secuencia puede ser añadida a la estructura artificial, por ejemplo, mediante corte de la señal poly A de pSG5 (Stratagene) usando las enzimas endonucleasas de restricción BglI y SalI e incorporando la señal al vector de expresión del mamífero pXTI (Stratagene). El pXTI contiene los LTR y una porción del gen gag del virus de la leucemia murina de Moloney. La posición de los LTR en la estructura artificial permite una transfección estable eficaz. El vector incluye el promotor timidina-cinasa del Herpes Simplex y el gen de neomicina seleccionable.

El ácido nucleico que codifica un fragmento de OBG3 se puede obtener por PCR a partir de un vector que contiene la secuencia de nucleótidos de OBG3 usando cebadores oligonucleótidos complementarios del cDNA del OBG3 deseado y que contiene las secuencias de endonucleasa de restricción para Pst I incorporadas en el cebador de 5' y BglII en el extremo 5' del correspondiente cebador 3' de cDNA, teniendo cuidado de asegurar que la secuencia que codifica el fragmento de OBG3 está posicionada apropiadamente con respecto a la señal poly A. El fragmento purificado obtenido a partir de la reacción de PCR resultante se digiere con PstI, se termina de forma roma con una exonucleasa, se digiere con BglII, se purifica y se liga a pXTI, que contiene ahora una señal poly A y se digiere con BglII. Métodos alternativos se presentan en los Ejemplos 1-3.

La transfección de un vector que expresa un fragmento de OBG3 en las células NIH 3T3 de ratón es un método para introducir los polinucleótidos en las células hospedantes. La introducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido en una célula hospedante se puede efectuar mediante transfección por fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Tales métodos están descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Davis *et al.* (1986) *Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., Amsterdam). Se contempla específicamente que los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser expresados de hecho por una célula hospedante que carece de un vector recombinante. Los métodos para expresar fragmentos de OBG3 en las células están descritos en los Ejemplos 1-3.

Un polipéptido (esto es, un fragmento gOBG3) puede ser recogido y purificado a partir de cultivos recombinantes de células por métodos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. Lo más preferiblemente, para purificación se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC"). Los polipéptidos descritos en esta memoria, y preferiblemente la forma segregada, se pueden recoger también de: productos purificados procedentes de fuentes naturales, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células, ya sea aislados directamente o cultivados; productos de procedimientos químicos sintéticos; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedante procariótico o eucariótico, incluyendo, por ejemplo, células de bacterias, levaduras, plantas superiores, insectos, y células de mamíferos.

Dependiendo del hospedante empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser glucosilados o pueden no ser glucosilados. Preferiblemente los polipéptidos descritos en esta memoria, son no glucosilados. En adición, los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden incluir también un resto inicial de metionina modificada, en algunos casos como resultado de los procesos mediados por el hospedante. Así, es bien conocido en la técnica que la metionina del N-terminal codificada por el codón de iniciación de la traducción generalmente se separa con alta eficacia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucarióticas. Aunque la metionina del N-terminal en la mayor parte de las proteínas también se separa en la mayor parte de los procariotas, para algunas proteínas este procedimiento de separación procariótico es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que la metionina del N-terminal está ligada covalentemente.

En adición a las construcciones del vector discutidas aquí, las células hospedantes pueden englobar células hospedantes primarias, secundarias, e inmortalizadas de origen vertebrado, particularmente de origen mamífero, que han sido sometidas a ingeniería genética para delecionar o reemplazar material genético endógeno (por ejemplo, la secuencia codificadora), y/o para incluir material genético (por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas heterólogas) que está operativamente asociado con los polinucleótidos descritos en esta memoria, y que activa, altera, y/o amplifica los polinucleótidos endógenos. Por ejemplo, se pueden usar métodos conocidos en la técnica para asociar operativamente las regiones heterólogas de control (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y las secuencias polinucleotídicas endógenas mediante recombinación homóloga, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.641.670, emitida el 24 de junio de 1997; la publicación internacional No. WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la publicación internacional No. WO 94/12650, publicada el 4, de agosto de 1994; Koller *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* Nov; 86 (22): 8932-5; Koller *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* Nov; 86 (22):8927-31; y Zijlstra *et al.* (1989) *Nature* Nov 23; 342 (6248): 435-8.

Modificaciones

En adición, los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser sintetizados químicamente usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Creighton, 1983 *Proteins*. New York, New York: W.H. Freeman and Company; y Hunkapiller *et al.*, (1984) *Nature* Jul 12-18; 310 (5973): 105-11). Por ejemplo, un fragmento relativamente corto descrito en esta memoria, se puede sintetizar mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como una sustitución en la secuencia del fragmento. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α-amino-isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino-hexanoico, Aib, ácido 2-amino-isobutírico, ácido 3-amino-propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butiglicina, t-butialanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como b-metil-aminoácidos, Ca-metil-aminoácidos, Na-metil-aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

Los fragmentos de polipéptido se pueden modificar de forma diferenciada durante o después de la traducción, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, que incluyen pero sin limitarse a ellas, la escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaina, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en la presencia de tunicamicina; etc.

Las modificaciones post-traducción adicionales incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas por N o unidas por O, procesamiento de los extremos N-terminal o C-terminal, unión de los restos químicos a la cadena principal de aminoácidos, modificaciones químicas de las cadenas de carbohidratos unidas por N o unidas por O, y adición o delección de un resto de metionina de N-terminal como resultado de la expresión en la célula hospedante procariótica.

5 Los fragmentos de polipéptido se pueden modificar también con una marca detectable, tal como una marca enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad para permitir la detección y aislamiento del polipéptido.

También se proporcionan por la invención los usos de derivados químicamente modificados de los polipéptidos descritos en esta memoria, que pueden aportar ventajas adicionales tales como aumento de la solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o reducción de la inmunogenicidad. Véase la patente de Estados Unidos: 10 4.179.337. El resto químico para derivatización es polietilenglicol. Los polipéptidos pueden ser modificados en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

15 El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término “aproximadamente” que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas tendrán más peso, algunas menos, que el peso molecular indicado) para facilidad en la manipulación y en la fabricación. Se pueden usar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración deseada de la liberación sostenida, los efectos, 20 si los hubiera sobre la actividad biológica, la facilidad en la manipulación, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol sobre una proteína terapéutica o análogo).

Las moléculas de polietilenglicol deberían estar unidas al polipéptido con consideración de los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos del polipéptido. Hay una serie de métodos de unión disponibles para los expertos 25 en la técnica, por ejemplo, EP 0 401 384, (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik *et al.* (1992) Exp Hematol. Sep; 20 (8): 1028-35, informando sobre la pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede ser unido covalentemente a los restos aminoácidos mediante un grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que se puede unir una molécula de polietilenglicol activada. Los restos aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir restos de lisina y los restos de 30 aminoácido en N-terminal; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir restos de ácido aspártico, restos de ácido glutámico y el resto aminoácido del C-terminal. También se pueden usar los grupos sulfhidrilo como un grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos se prefiere la unión a un grupo amino, tal como la unión en el N-terminal o grupo de lisina.

35 Se pueden desear específicamente proteínas modificadas químicamente en el N-terminal. Usando el polietilenglicol como una ilustración de la presente composición, se puede seleccionar a partir de una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de las moléculas de polietilenglicol a las moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a ser realizada, y el método para obtener la proteína seleccionada pegilada en N-terminal. El método para obtener la preparación pegilada en N-terminal (esto es, separar este resto de otros restos monopegilados si fuera necesario) puede ser por purificación del 40 material pegilado en N-terminal a partir de una población de moléculas de proteína pegilada. Las proteínas selectivas modificadas químicamente en el N-terminal se pueden conseguir mediante alquilación reductora, que se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al N-terminal) disponibles para la derivatización de una proteína particular. Bajo condiciones apropiadas de reacción, se alcanza la derivatización 45 sustancialmente selectiva de la proteína en el N-terminal con un grupo carbonilo que contiene el polímero.

Multímeros

Los fragmentos de polipéptido descritos en esta memoria, pueden ser monómeros o multímeros (esto es, dímeros, trímeros, tetrameros y multímeros más altos). Por consiguiente, la presente descripción se refiere a monómeros 50 y multímeros de los fragmentos de polipéptido descritos en esta memoria, a su preparación, y a composiciones (preferiblemente, composiciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables) que los contienen. En realizaciones específicas, los polipéptidos descritos en esta memoria, son monómeros, dímeros, trímeros o tetrameros. En realizaciones adicionales, los multímeros son al menos dímeros, al menos trímeros, o al menos tetrameros.

55 Los multímeros para uso en la invención pueden ser homómeros o heterómeros. Como se usa aquí, el término homómero, se refiere a un multímero que contiene solamente polipéptidos que corresponden a los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, (incluyendo fragmentos de polipéptido, variantes, variantes de corte y empalme, y proteínas de fusión que corresponden a estos fragmentos de polipéptido como se describe en esta memoria). Estos homómeros pueden contener fragmentos de polipéptido que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. En una realización específica, un homómero es un multímero que contiene solamente fragmentos de polipéptido que tienen una secuencia idéntica de aminoácidos. En otra realización específica, un homómero es un multímero que contiene fragmentos de polipéptido que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. En realizaciones 60 específicas, el multímero es un homodímero (por ejemplo, que contiene fragmentos de polipéptido que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes) o un homotrímero (por ejemplo, que contiene fragmentos de polipéptido que tienen secuencias de aminoácidos idénticas y/o diferentes). En realizaciones adicionales, el multímero homomérico es al menos un homodímero, al menos un homotrímero, o al menos un homotetrámero.

Como se usa aquí, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (esto es, que corresponden a diferentes proteínas o fragmentos polipeptídicos de las mismas) en adición a los polipéptidos descritos en esta memoria. En una realización específica, el multímero es un heterodímero, un heterotrímero, o un heterotetrámero. En realizaciones adicionales, el multímero heteromérico es al menos un heterodímero, al menos un heterotrímero, o al menos un heterotetrámero.

Los multímeros descritos en esta memoria, pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar ligados indirectamente, por ejemplo, por formación de liposomas. Así, en una realización, los multímeros, tales como, por ejemplo, homodímeros u homotrímeros, se forman cuando los polipéptidos descritos en esta memoria, se ponen en contacto uno con otro en solución. En otra realización, los heteromultímeros, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrámeros, se forman cuando los polipéptidos descritos en esta memoria, ponen en contacto los anticuerpos con los polipéptidos descritos en esta memoria, (incluyendo anticuerpos para la secuencia del polipéptido heterólogo en una proteína de fusión descrita aquí) en solución. En otras realizaciones, se forman los multímeros por asociaciones covalentes con y/o entre los polipéptidos descritos en esta memoria. Tales asociaciones covalentes pueden incluir uno o más restos aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica (por ejemplo, la indicada en el listado de secuencias, o contenida en el polipéptido codificado por un clon depositado). En un caso, las asociaciones covalentes están reticuladas entre restos de cisteína localizados dentro de las secuencias del polipéptido, que interactúan en el polipéptido nativo (esto es, presente en la naturaleza). En otro caso, las asociaciones covalentes son la consecuencia de la manipulación química o recombinante. Alternativamente, tales asociaciones covalentes pueden incluir uno o más restos aminoácidos contenidos en la secuencia del polipéptido heterólogo en una proteína de fusión descrita en esta memoria.

En un ejemplo, las asociaciones covalentes están entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes están entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión Fc (como se describe en esta memoria). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de las proteínas de fusión están entre la secuencia heteróloga del polipéptido de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, tales como por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, la publicación internacional número: WO 98/49305). En otra realización, dos o más polipéptidos descritos en esta memoria, se pueden unir por medio de enlaces de péptidos. Los ejemplos incluyen estos enlaces de péptidos descritos en la patente de Estados Unidos No. 5.073.627. Las proteínas que comprenden múltiples polipéptidos descritos en esta memoria, separados por enlaces de péptidos se pueden producir por tecnología convencional de DNA recombinante.

Otro método para preparar polipéptidos multímeros descritos en esta memoria, incluye el uso de polipéptidos descritos en esta memoria, fusionados a una secuencia polipeptídica de la cremallera (zipper) o cierre de leucina o del cierre de isoleucina. Los dominios del cierre de leucina y del cierre de isoleucina son polipéptidos que promueven la multimerización de las proteínas en las que se encuentran. Los cierres de leucina fueron originalmente identificados en varias proteínas que se unen al DNA, y desde entonces han sido encontrados en una variedad de diferentes proteínas (Landschulz *et al.*, (1988) Genes Dev. Jul; 2 (7): 786-800). Entre los cierres de leucina conocidos están los péptidos y sus derivados presentes en la naturaleza que forman dímeros o trímeros. Son ejemplos de dominios de cierre de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles los descritos en la solicitud PCT WO 94/10308. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido descrito en esta memoria, fusionado con una secuencia de polipéptido que se dimeriza o trimeriza en solución pueden ser expresadas en células hospedantes adecuadas, y la proteína de fusión multimérica soluble resultante puede ser recogida del sobrenadante del cultivo usando métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos triméricos pueden ofrecer la ventaja de una actividad biológica mejorada. Los restos de cierre de leucina y los restos de isoleucina preferidos son aquellos que forman preferiblemente trímeros. Un ejemplo es un cierre de leucina derivado de la proteína tensioactiva del pulmón D (SPD), como se describe en Hoppe *et al.* FEBS Letters (1994) May 16; 344 (2-3): 191-5. y en la solicitud de patente de Estados Unidos Ser. No. 08/446.922. Otros péptidos derivados de las proteínas triméricas presentes en la naturaleza se pueden emplear para preparar polipéptidos triméricos. En otro ejemplo, las proteínas descritas en esta memoria, se pueden asociar por interacciones entre Flag® y la secuencia del polipéptido contenida en las proteínas de fusión que contienen la secuencia de polipéptido Flag®. En otra realización, las proteínas descritas en esta memoria, se pueden asociar por interacciones entre la secuencia del polipéptido heterólogo contenida en las proteínas de fusión Flag® y el anticuerpo anti Flag®.

Los multímeros descritos en esta memoria, pueden ser generados usando métodos químicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea que sean contenidos en los multímeros descritos en esta memoria, pueden estar reticulados químicamente usando moléculas de enlace y métodos de optimización de la longitud de la molécula de enlace conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). Adicionalmente, los multímeros pueden ser generados usando métodos conocidos en la técnica para formar uno o más enlaces reticulantes inter-moléculas entre los restos de cisteína localizados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que sean contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). Además, los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser modificados rutinariamente por la adición de cisteína o biotina al C-terminal o N-terminal del polipéptido y pueden ser aplicados métodos conocidos en la técnica para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). Adicionalmente, se pueden aplicar al menos 30 métodos conocidos en

la técnica para generar liposomas que contienen los componentes polipeptídicos que se desea que sean contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925).

Alternativamente, los multímeros descritos en esta memoria, pueden ser generados usando métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica. En una realización, los polipéptidos contenidos en los multímeros pueden ser producidos recombinantemente usando la tecnología de las proteínas de fusión descrita en esta memoria, o conocida de otro modo en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). En una realización específica, los polinucleótidos que codifican un homodímero pueden ser generados ligando una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido descrito en esta memoria, a una secuencia que codifica un enlace polipeptídico y después además a un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa del original C-terminal al N-terminal (careciendo de la secuencia líder) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925). En otra realización, las técnicas recombinantes descritas en esta memoria, o conocidas de otro modo en la técnica pueden ser aplicadas para generar los polipéptidos recombinantes descritos en esta memoria, que contienen un dominio transmembranal (o hidrófobo o de péptido señal) y que pueden ser incorporados a los liposomas por técnicas de reconstitución de la membrana (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925).

II. Polinucleótidos OBG3

Los polinucleótidos preferidos son aquellos que codifican los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria. Los polinucleótidos recombinantes que codifican los fragmentos de polipéptido gOBG3 pueden ser usados de varios modos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, expresar el polipéptido en células recombinantes para uso en ensayos de cribado de antagonistas y agonistas de su actividad así como para facilitar su purificación para uso de varios modos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ensayos de cribado para antagonistas y agonistas de su actividad, cribados de diagnóstico, y producción de anticuerpos, así como tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad y/o para reducir la masa corporal.

Los polinucleótidos que codifican los fragmentos de polipéptido OBG3 y gOBG3 y los fragmentos de polipéptido variantes de los mismos pueden ser purificados, aislados, y/o recombinantes. En todos los casos, los polinucleótidos gOBG3 deseados son aquellos que codifican los fragmentos de polipéptido gOBG3 de la invención que tienen actividad relacionada con la obesidad como se describe y se expone aquí.

Fusiones

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser fusionados en marco de lectura con las secuencias que codifican las secuencias adicionales de aminoácidos heterólogos. También, los ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos descritos en esta memoria, junto con las secuencias no codificantes adicionales, incluyendo por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, las secuencias no codificantes 5' y 3', la secuencia vector, las secuencias usadas para purificación, sondas, o cebadores. Por ejemplo, las secuencias heterólogas incluyen las secuencias transcritas, no traducidas que pueden desempeñar un papel en la transcripción, y procesamiento del mRNA, por ejemplo, la unión a los ribosomas y la estabilidad del mRNA. Las secuencias heterólogas pueden comprender alternativamente secuencias codificadoras adicionales que proporcionan funcionalidades adicionales. Así, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido puede ser fusionada con una secuencia tag, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. La secuencia del aminoácido tag puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como el tag proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión (véase, Gentz *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci USA Feb; 86 (3): 821-4). El "HA" tag es otro péptido útil para la purificación que corresponde a un epítope derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (véase, Wilson *et al.*, (1984) Cell 37 (3):767-78). Como se ha expuesto antes, las proteínas de fusión para uso como se describe en el primer aspecto, incluyen fragmentos gOBG3 fusionados con IgG Fc en el N- o C-terminal.

III. Vectores recombinantes

El término "vector" se usa aquí para designar una molécula de DNA o RNA circular o lineal, que es de doble hebra o una única hebra, y que comprende al menos un polinucleótido de interés que se busca que sea transferido a una célula hospedante o a un organismo hospedante unicelular o multicelular.

Un vector recombinante puede comprender un promotor operativamente ligado a una región codificadora capaz de expresar (a) un fragmento globular de OBG3 o una variante para uso en el primer aspecto; o (b) una fusión de dicho fragmento globular de OBG3 en la que el fragmento está en la forma de un péptido de fusión IgG Fc.

Se pueden emplear vectores de expresión para expresar tal fragmento globular de OBG3, variante o péptido de fusión que pueden ser entonces purificados y, por ejemplo, ser usados como tratamiento para las enfermedades relacionadas con la obesidad, o simplemente para reducir la masa corporal de los individuos.

La expresión requiere que se proporcionen las señales apropiadas en los vectores, incluyendo dichas señales diferentes elementos reguladores, tales como mejoradores/promotores de ambas fuentes virales y de mamíferos, que dirigen la expresión de los genes de interés en las células hospedantes. Se pueden incluir en los vectores de expresión,

marcadores dominantes de selección del fármaco para establecer clones celulares permanentes y estables que expresan los productos, ya que son elementos que ligan la expresión de los marcadores de selección del fármaco a la expresión del polipéptido.

5 Los vectores de expresión pueden incluir ácidos nucleicos que codifican un fragmento gOBG3 descrito en esta memoria, o un fragmento gOBG3 modificado como se describe aquí, o variantes o fragmentos de los mismos, bajo el control de una secuencia reguladora seleccionada entre los fragmentos de polipéptido OBG3, o alternativamente bajo el control de una secuencia reguladora exógena.

10 Consecuentemente, tales vectores de expresión pueden consistir en: (a) una secuencia reguladora de un fragmento de OBG3 que dirige la expresión de un polinucleótido codificador ligado operativamente a la misma; y (b) un fragmento que codifica la secuencia de gOBG3 descrita en esta memoria, ligado operativamente a las secuencias reguladoras que permiten su expresión en una célula hospedante y/o organismo hospedante adecuado.

15 Alguno de los elementos que se pueden encontrar en los vectores se describen con más detalle en las siguientes secciones.

1) Características generales de los vectores de expresión

20 Un vector recombinante puede comprender, pero sin limitarse a ellos, un YAC (cromosoma artificial de levadura), un BAC (cromosoma artificial bacteriano), un fago, un fagémido, un cósmido, un plásmido, o incluso una molécula lineal de DNA que puede consistir en un DNA cromosómico, no cromosómico, semi-sintético o sintético. Un vector recombinante de este tipo puede comprender una unidad transcripcional que comprende un conjunto de:

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

30 (2) una secuencia estructural o codificadora que está transcrita en el mRNA y eventualmente traducida a un polipéptido, estando dicha secuencia estructural o codificadora ligada operativamente a los elementos reguladores descritos en (1); y

35 (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción. Las unidades estructurales destinadas al uso en levaduras o sistemas de expresión eucarióticos incluyen preferiblemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedante. Alternativamente, cuando una proteína recombinante es expresada sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un resto N-terminal. Este resto puede ser o no escindido posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

40 Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación, marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedante, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural hacia abajo. La secuencia estructural heteróloga es ensamblada en una fase apropiada con las secuencias de iniciación y terminación de la traducción, y preferiblemente una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida hacia el espacio periplásmico o el medio extracelular. En una realización específica en la que el vector es adaptado para transfectar y expresar las secuencias deseadas en las células hospedantes del mamífero, los vectores preferidos comprenderán un origen de replicación en el hospedante deseado, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquiera de los sitios necesarios de unión a ribosomas, sitios de poliadenilación, sitios de corte y empalme de donador y aceptor, las secuencias de terminación de la transcripción, y las secuencias no transcritas en la región de flanco 5'. Las secuencias de DNA derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo de origen SV40, promotor inicial, potenciador, sitios de corte y empalme y de poliadenilación, se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

2) Elementos reguladores

55 Promotores

60 Las regiones adecuadas del promotor usadas en los vectores de expresión se eligen teniendo en cuenta la célula hospedante en la que es expresado el gen heterólogo. El promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés no se considera importante, con tal de que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula elegida. Así, cuando se elige como objetivo una célula humana, es preferible colocar la región codificadora de ácido nucleico adyacente a un promotor y bajo el control del mismo, que es capaz de ser expresado en una célula humana, tal como, por ejemplo, un promotor humano o viral.

65 Un promotor adecuado puede ser heterólogo con respecto al ácido nucleico del que controla la expresión o alternativamente puede ser endógeno al polinucleótido nativo que contiene la secuencia codificadora a ser expresada. Adicionalmente, el promotor es generalmente heterólogo con respecto a las secuencias del vector recombinante dentro de las cuales ha sido insertada la estructura artificial de la secuencia promotora/codificadora.

Las regiones del promotor se pueden seleccionar a partir de cualquier gen objetivo usando, por ejemplo, vectores CAT (cloramfenicol-transferasa) y más preferiblemente vectores pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos preferidos son los promotores de RNA-polimerasa, LacI, LacZ, bacteriófago T3 o T7, los promotores gpt, lambda PR, PL y trp (EP 0036776), el promotor de polihedrina, o el promotor de proteína p10 de baculovirus (Kit Novagen) (Smith *et al.*, (1983) Mol Cell Biol Dec; 3 (12): 2156-65; O'Reilly *et al.*, 1992), el promotor lambda PR o también el promotor trc.

Los promotores eucarióticos incluyen el inmediato temprano del CMV (citomegalovirus), timidina-quinasa de HSV (virus del herpes simple), SV40 temprano y tardío, los LTR de retrovirus, y la metalotioneina-L de ratón. En adición, los promotores específicos para un tipo particular de células se pueden elegir, tal como los que facilitan la expresión en tejido adiposo, tejido muscular, o hígado. La selección de un vector y promotor convenientes es bien conocida dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica.

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

Otros elementos reguladores

Cuando se emplea un inserto de cDNA, se desea típicamente incluir una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito del gen. La naturaleza de la señal de poliadenilación no se cree que sea crucial para la práctica satisfactoria de la invención, y se puede emplear cualquiera de tales secuencias como la hormona de crecimiento humano y las señales de poliadenilación de SV40. También se contempla como un elemento de la casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para mejorar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través de la casete hasta las otras secuencias.

Los vectores que contienen la secuencia apropiada de DNA como se ha descrito antes, se pueden utilizar para transformar un hospedante apropiado para permitir la expresión del polipéptido o polinucleótido deseado.

3) Marcadores de elección

Estos marcadores deben conferir un cambio identificable a la célula que permita la fácil identificación de las células que contienen la estructura artificial de expresión. Los genes del marcador de elección para la selección de células hospedantes transformadas son preferiblemente dihidrofolato-reductasa o resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, TRP1 para *S. cerevisiae* o resistencia a tetraciclina, rifampicina o ampicilina en *E. coli*, o levan-sacarasa para las micobacterias, siendo este último marcador un marcador de elección negativo.

4) Vectores preferidos

Vectores bacterianos

Como un ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador de elección y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos de pBR322 (ATCC37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

Muchos otros vectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, y están comercialmente disponibles, tales como los siguientes vectores bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene); pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia); pQE-30 (QIAexpress).

Vectores de baculovirus

Un vector adecuado para la expresión de los polipéptidos descritos en esta memoria, es un vector de baculovirus que se puede propagar en células de insectos y en líneas celulares de insectos. Un sistema específico de vector hospedante adecuado es el vector de transferencia de baculovirus pVL1392/1393 (Pharmingen) que se usa para transfectar la línea celular SF9 (ATCC N° CRL 1711) que se deriva de *Spodoptera frugiperda*.

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

Vectores víricos

El vector de la presente descripción puede ser derivado de un adenovirus. Los vectores de adenovirus preferidos son los descritos por Feldman and Steg (1996; Semin Interv Cardiol Sep;1 (3): 203-8) o Ohno *et al.* (1994; Science

Aug 5; 265(5173): 781-4). Otro adenovirus recombinante preferido es el adenovirus humano tipo 2 o 5 (Ad 2 o Ad 5) o un adenovirus de origen animal (solicitud de patente francesa No. FR-93.05954).

Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adeno-asociados generalmente se entiende que son los sistemas de elección de liberación del gen recombinante para la transferencia de polinucleótidos exógenos *in vivo*, particularmente a los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Estos vectores proporcionan una eficaz liberación de genes a las células, y los ácidos nucleicos transferidos están integrados de forma estable en el DNA cromosómico del hospedante.

Los retrovirus particularmente preferidos para la preparación o construcción de vehículos retrovirales de liberación del gen *in vitro* o *in vivo* incluyen los retrovirus seleccionados del grupo que consiste en virus inductor de focos en células de visón (Mink-Cell Focus Inducing Virus), virus del sarcoma murino, virus de la reticuloendoteliosis y virus del sarcoma de Rous. Los virus de la leucemia murina particularmente preferidos incluyen los virus 4070A y los 1504A, Abelson (ATCC No VR-999), Friend (ATCC No VR-245), Gross (ATCC No VR-590), Rauscher (ATCC No VR-998) y el Virus de la leucemia murina de Moloney (ATCC No VR-190; Solicitud PCT No WO94/24298). Los virus del sarcoma de Rous particularmente preferidos incluyen la cepa Bryan de alto título (ATCC Nos VR-334, VR-657, VR-726, VR-659 y VR-728). Otros vectores retrovirales preferidos son los descritos en Roth *et al.* (1996), solicitud PCT No WO 93/25234, solicitud PCT No WO 94/06920, Roux *et al.*, ((1989) Proc Natl Acad Sci U S A Dec; 86 (23): 9079-83), Julan *et al.*, (1992) J. Gen. Virol. 3: 3251-3255 y Neda *et al.*, ((1991) J Biol Chem Aug 5; 266 (22): 14143-6).

Otro sistema más de vector vírico que se contempla consiste en el virus adeno-asociado (AAV). El virus adeno-asociado es un virus defectuoso presente en la naturaleza que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus ayudador para una replicación eficaz y un productivo ciclo vital (Muzyczka *et al.*, (1992) Curr Top Microbiol Immunol; 158: 97-129). Es también uno de los pocos virus que pueden integrar su DNA en células que no se dividen, y presenta una alta frecuencia de integración estable (Flotte *et al.*, (1992) Am J Respir Cell Mol Biol Sep; 7 (3): 349-56; Samulski *et al.*, (1989) J Virol Sep; 63 (9): 3822-8; McLaughlin *et al.*, (1989) Am. J. Hum. Genet. 59: 561-569). Una característica ventajosa de AAV se deriva de su reducida eficacia para transducir las células primarias en relación con las células transformadas.

5) Liberación de los vectores recombinantes

Con el fin de efectuar la expresión de los polinucleótidos descritos en esta memoria, estas estructuras artificiales deben ser liberadas a una célula. Esta liberación puede ser realizada *in vitro*, como en procedimientos de laboratorio para transformar las líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de ciertas enfermedades.

Un mecanismo es la infección vírica en la que la estructura artificial de expresión es encapsulada en una partícula vírica infecciosa.

Se contemplan también varios métodos no víricos para la transferencia de polinucleótidos a células de mamífero cultivadas, e incluyen, sin que estén limitados a ellos, precipitación de fosfato de calcio (Graham *et al.*, (1973) Virology Aug; 54 (2): 536-9; Chen *et al.*, (1987) Mol Cell Biol Aug; 7 (8): 2745-52), DEAE-dextrano (Gopal, (1985) Mol Cell Biol May; 5 (5): 1188-90), electroporación (Tur-Kaspa *et al.*, (1986) Mol Cell Biol Feb; 6 (2): 716-8; Potter *et al.*, (1984) Proc Natl Acad Sci USA Nov; 81 (22): 7161-5), microinyección directa (Harly *et al.*, (1985) J Cell Biol Sep; 101 (3): 1094-9), liposomas cargados con DNA (Nicolau *et al.*, (1982) Biochim Biophys Acta Oct 11; 721 (2): 185-90; Fraley *et al.*, (1979) Proc Natl Acad Sci USA Jul; 76 (7): 3348-52), y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, (1987) J Biol Chem Apr 5; 262 (10): 4429-32; Wu y Wu (1988) Biochemistry Feb 9; 27 (3): 887-92). Algunas de estas técnicas pueden ser adaptadas satisfactoriamente para uso *in vivo* o *ex vivo*.

Una vez que el polinucleótido de expresión ha sido liberado a la célula, puede ser integrado de manera estable en el genoma de la célula receptora. Esta integración puede hacerse en lugar cognado y en orientación vía recombinación homóloga (reemplazamiento del gen) o puede ser integrado en un lugar aleatorio, no específico (aumento del gen). En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede ser mantenido establemente en la célula como un segmento de DNA separado, episomial. Tales segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican las secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente del ciclo de la célula hospedante o en sincronización con dicho ciclo.

Una realización específica para un método para liberar una proteína o péptido al interior de una célula de un vertebrado *in vivo* comprende la etapa de introducir una preparación que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y un polinucleótido desnudo que codifica operativamente el polipéptido de interés en el espacio intersticial de un tejido que comprende la célula, con lo que el polinucleótido desnudo es llevado hacia el interior de la célula y tiene un efecto fisiológico. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro* pero puede ser aplicado *in vivo* también.

Las composiciones para uso *in vitro* e *in vivo* que comprenden un polinucleótido "desnudo" están descritas en la solicitud PCT No. WO 90/11092 (Vical Inc) y también en la solicitud PCT No. WO 95/11307 (Institut Pasteur, INSERM, Université d'Ottawa) así como en los artículos de Tascon *et al.* (1996) Nature Medicine. 2 (8): 888-892 y de Huygen *et al.* ((1996) Nat Med Aug; 2 (8): 893-8).

También en otra realización, la transferencia de un polinucleótido desnudo, incluyendo una estructura artificial de polinucleótido, a las células puede ser llevada a cabo con un bombardeo de partículas (biolístico), siendo dichas partículas microproyectiles recubiertos de DNA acelerados a una alta velocidad que les permite perforar las membranas de la célula y entrar en las células sin destruirlas, tal como está descrito por Klein *et al.* ((1990) Curr Genet Feb; 17 (2): 97-103).

En otra realización, el polinucleótido puede ser atrapado en un liposoma (Ghosh and Bacchawat, (1991) Targeted Diagn Ther; 4: 87-103; Wong *et al.*, (1980) Gene 10: 87-94; Nicolau *et al.*, (1987) Methods Enzymol.; 149: 157-76). Estos liposomas pueden ser además dirigidos a las células que expresan LSR mediante la incorporación de leptina, triglicéridos, ACRP30, u otros ligandos conocidos de LSR en la membrana del liposoma.

En una realización específica, se puede proporcionar una composición para la producción *in vivo* de un polipéptido de cabeza globular Apml descrito en esta memoria. Dicha composición comprende un polinucleótido desnudo que codifica operativamente este polipéptido, en solución en un vehículo fisiológicamente aceptable, y adecuado para la introducción en un tejido para hacer que las células del tejido expresen dicho polipéptido.

La cantidad de vector a ser inyectada al organismo hospedante deseado varía según el sitio de inyección. Como una dosis indicativa, se inyectará entre 0,1 y 100 µg del vector en un cuerpo animal, preferiblemente un cuerpo de mamífero, por ejemplo un cuerpo de ratón.

En otra realización del vector, éste puede ser introducido *in vitro* en una célula hospedante, preferiblemente en una célula hospedante previamente recogida del animal a ser tratado y más preferiblemente una célula somática tal como una célula del músculo. En una etapa subsiguiente, la célula que ha sido transformada con el vector que codifica el polipéptido de cabeza globular deseado Apml o el fragmento deseado del mismo se reintroduce en el cuerpo del animal con el fin de liberar la proteína recombinante dentro del cuerpo localmente o sistémicamente.

IV. Células recombinantes

Las células hospedantes pueden comprender un vector recombinante como se ha descrito antes. Estas pueden incluir células hospedantes que son transformadas (células procarióticas) o que son transfectadas (células eucarióticas) con un vector recombinante tal como uno cualquiera de los descritos en "Vectores recombinantes".

Generalmente, una célula hospedante recombinante puede comprender al menos uno de los vectores recombinantes que se describen en esta memoria.

Las células hospedantes preferidas usadas como receptoras de los vectores recombinantes son las siguientes:

a) Células hospedantes procarióticas: cepas de *Escherichia coli* (esto es cepa DH5-α), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y cepas de especies como *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, y

b) Células hospedantes eucarióticas: células HeLa (ATCC N° CCL2; N° CCL2.1; N° CCL2.2), células Cv 1 (ATCC N° CCL70), células COS (ATCC N° CRL1650; N° CRL1651), células Sf-9 (ATCC N° CRL1711), células C127 (ATCC N° CRL-1804), 3T3 (ATCC N° CRL-6361), CHO (ATCC N° CCL-61), riñón humano 293 (ATCC N° 45504; N° CRL-1573), BHK (ECACC N° 84100501; N° 84111301), células PLC, HepG2, y Hep3B.

Las estructuras artificiales en las células hospedantes se pueden usar de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante.

Después de la transformación de un hospedante adecuado y el crecimiento del hospedante hasta una densidad apropiada de células, el promotor seleccionado es inducido por medios apropiados, tales como subida de la temperatura o inducción química, y se cultivan las células durante un periodo adicional.

Las células se recogen típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante se retiene para posterior purificación.

Las células microbianas empleadas en la expresión de las proteínas se pueden romper por cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica, o el uso de agentes para lisado de las células. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Además, estas células recombinantes pueden ser creadas *in vitro* o *in vivo* en un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, perros, cerdos, ovejas, reses, y primates, sin incluir los seres humanos. Las células recombinantes creadas *in vitro* pueden ser también implantadas más tarde quirúrgicamente en un animal, por ejemplo. Los métodos para crear células recombinantes *in vivo* en animales son bien conocidos en la técnica.

Las células hospedantes homológamente recombinantes primarias, secundarias, e inmortalizadas de origen vertebrado, preferiblemente de origen mamífero y particularmente de origen humano, pueden ser sometidas a ingeniería genética para: a) insertar polinucleótidos exógenos (heterólogos) en el DNA cromosómico endógeno de un gen objetivo,

b) delecionar el DNA cromosómico endógeno, y/o c) reemplazar el DNA cromosómico endógeno con polinucleótidos exógenos. Las inserciones, delecciones, y/o reemplazamientos de las secuencias de polinucleótido pueden ser para las secuencias codificadoras del gen objetivo y/o para las regiones reguladoras, tales como las secuencias promotoras y potenciadoras, asociadas operativamente con el gen objetivo.

Una célula hospedante homológamente recombinante puede ser preparada *in vitro* o *in vivo*, en la que está alterada la expresión de un gen objetivo normalmente no expresado en la célula. Preferiblemente la alteración causa la expresión del gen objetivo en condiciones normales de crecimiento o en condiciones adecuadas para producir el polipéptido codificado por el gen objetivo. El método para preparar una célula de este tipo puede comprender las etapas de: (a) transfectar la célula *in vitro* o *in vivo* con una construcción de polinucleótido, comprendiendo la construcción de polinucleótido; (i) una secuencia de acceso; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificadora; y (iii) un sitio donador de corte y empalme no emparejado, si fuera necesario, produciendo así una célula transfectada; y (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga.

Un método para alterar la expresión de un gen objetivo en una célula *in vitro* o *in vivo* en el que el gen no está normalmente expresado en la célula, puede comprender las etapas de (a) transfectar la célula *in vitro* o *in vivo* con una construcción de polinucleótido, comprendiendo la construcción de polinucleótido: (i) una secuencia de acceso; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificadora; y (iii) un sitio donador de corte y empalme no emparejado, si fuera necesario, produciendo así una célula transfectada; y (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga, produciendo de este modo una célula homológamente recombinante; y (c) mantener la célula homológamente recombinante *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la expresión del gen.

Un método para preparar un fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria, puede comprender alterar la expresión de un gen objetivo endógeno en una célula *in vitro* o *in vivo* en el que el gen no está normalmente expresado en la célula, comprendiendo las etapas de: a) transfectar la célula *in vitro* o *in vivo* con una construcción de polinucleótido, comprendiendo la construcción de polinucleótido: (i) una secuencia de acceso; (ii) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificadora; y (iii) un sitio donador de corte y empalme no emparejado, si fuera necesario, produciendo así una célula transfectada; (b) mantener la célula transfectada *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la recombinación homóloga, produciendo de este modo una célula homológamente recombinante; y c) mantener la célula homológamente recombinante *in vitro* o *in vivo* en condiciones apropiadas para la expresión del gen preparando de este modo el polipéptido.

Una construcción de polinucleótido puede alterar la expresión de un gen objetivo en un tipo de célula en el que el gen no está normalmente expresado. Esto ocurre cuando una construcción de polinucleótido se inserta en el DNA cromosómico de la célula objetivo, en la que la construcción de polinucleótido comprende: a) una secuencia de acceso; b) una secuencia reguladora y/o una secuencia codificadora; y c) un sitio donador de corte y empalme no emparejado, si fuera necesario. Además, las construcciones de polinucleótido, como se han descrito antes, pueden comprender además un polinucleótido que codifica un polipéptido y que está en marco de lectura con el gen endógeno objetivo después de la recombinación homóloga con DNA cromosómico.

Las composiciones se pueden producir, y los métodos se pueden realizar, por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos Nos: 6.054.288; 6.048.729; 6.048.724; 6.048.524; 5.994.127; 5.968.502; 5.965.125; 5.869.239; 5.817.789; 5.783.385; 5.733.761; 5.641.670; 5.580.734; Publicaciones internacionales Nos: WO 96/29411, WO 94/12650; y artículos científicos descritos por Koller *et al.*, (1994) Annu. Rev. Immunol. 10: 705-730.

La expresión del gen OBG3 en células de mamíferos, y típicamente en células humanas, puede resultar defectuosa, o alternativamente puede ser mejorada, con la inserción de una secuencia genómica de OBG3 o de cDNA con el reemplazamiento del compañero del gen OBG3 en el genoma de una célula animal por un polinucleótido OBG3. Estas alteraciones genéticas pueden ser generadas por sucesos de recombinación homóloga usando estructuras artificiales específicas de DNA que han sido descritas previamente.

Un tipo de célula hospedante que se puede usar son los cigotos de mamíferos, tales como los cigotos murinos. Por ejemplo, los cigotos murinos pueden ser sometidos a una microinyección con una molécula del DNA purificado de interés, por ejemplo una molécula de DNA purificado que ha sido previamente ajustada a un intervalo de concentración desde 1 ng/ml -para los insertos de BAC - 3 ng/ μ l -para los insertos de bacteriófago PI - en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 250 μ M que contiene NaCl 100 mM, espermina 30 μ M, y espermidina 70 μ M. Cuando el DNA a ser microinyectado tiene un tamaño grande, se pueden usar poliaminas y altas concentraciones de sal con el fin de evitar la rotura mecánica de este DNA, como se describe por Schedl *et al* ((1993) Nature Mar 18; 362 (6417): 258-61).

Uno cualquiera de los polinucleótidos descritos en esta memoria, incluyendo las estructuras artificiales de DNA descritas en esta memoria, puede ser introducido en una línea de las células madres embrionarias (ES), preferiblemente una línea celular ES de ratón. Las líneas celulares ES se derivan de células pluripotentes, inmaduras, de la masa interior de la célula de los blastocitos de pre-implantación. Las líneas celulares ES preferidas son las siguientes: ES-E14TG2a (ATCC No. CRL-1821), ES-D3 (ATCC No. CRL1934 y No. CRL-11632), YS001 (ATCC No. CRL-11776), 36.5 (ATCC No. CRL-11116). Para mantener las células ES en un estado inmaduro, se cultivan en presencia de células alimentadoras de crecimiento inhibido que proporcionan las señales apropiadas para preservar este fenotipo embrio-

nario y sirven como una matriz para la adherencia de las células ES. Las células alimentadoras preferidas son los fibroblastos embrionarios primarios que se establecen desde el tejido de embriones del día 13- día 14 de virtualmente cualquier cepa de ratón, que se mantienen en cultivo, tal como se describe por Abbondanzo *et al.* (1993; Methods Enzymol; 225: 803-23) y cuyo crecimiento se ha inhibido por irradiación, tal como se describe por Robertson((1987)

5 Embryo-derived stem cell lines. En: E.J. Robertson Ed. Teratocarcinomas and embrionic stem cells: a practical approach. IRL Press, Oxford), o por la presencia de una concentración inhibidora de LIF, tal como se describe por Pease and Williams (1990; Exp Cell Res. Oct; 190 (2): 20911).

Las estructuras artificiales en las células hospedantes se pueden usar de manera convencional para producir el

10 producto génico codificado por la secuencia recombinante.

Después de la transformación de un hospedante adecuado y el crecimiento del hospedante hasta una densidad apropiada de células, el promotor seleccionado es inducido por medios apropiados, tales como subida de la temperatura o inducción química, y se cultivan las células durante un periodo adicional. Las células se recogen típicamente por

15 centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante se retiene para posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas se pueden romper por cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica, o el uso de agentes para lisado de las células. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 IV. Animales transgénicos

Los métodos y composiciones para la generación de animales no humanos y plantas que expresan polipéptidos OBG3 recombinantes, esto es fragmentos de OBG3 o polipéptidos OBG3 de longitud completa recombinantes, se describen en esta memoria. Los animales o plantas pueden ser transgénicos, esto es cada una de sus células contiene

25 un gen que codifica el polipéptido OBG3, o, alternatively, puede ser introducido un polinucleótido que codifica el polipéptido en las células somáticas del animal o planta, por ejemplo en las células epiteliales secretoras mamarias de un mamífero. El animal puede ser un mamífero tal como una vaca, oveja, cabra, cerdo, o conejo.

Los métodos para preparar animales transgénicos tales como mamíferos son bien conocidos por los expertos en

30 la técnica, y se puede usar cualquiera de tales métodos. En resumen, se pueden producir mamíferos transgénicos, por ejemplo, transfectando una célula madre pluripotencial tal como una célula ES con un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés. Las células ES transformadas satisfactoriamente pueden ser introducidas entonces en un embrión en fase inicial que se implanta después en el útero de un mamífero de la misma especie. En ciertos casos, las células transformadas ("transgénicas") comprenderán parte de la línea germinal del animal resultante, y los animales

35 adultos que comprenden las células transgénicas en la línea germinal pueden ser apareados entonces con otros animales, produciendo eventualmente de este modo una población de animales transgénicos que tienen el transgén en cada una de sus células, y que pueden transmitir establemente el transgén a cada una de sus crías. Se pueden usar otros métodos para introducir el polinucleótido, por ejemplo introducir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en un huevo fertilizado o en un embrión en fase inicial por medio de microinyección. Alternativamente, se puede

40 introducir el transgén en un animal por infección de cigotos con un retrovirus que contiene el transgén (Jaenisch, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,1260-1264). Los métodos para preparar mamíferos transgénicos están descritos, por ejemplo, en Wall *et al.* (1992) J Cell Biochem 1992 Jun; 49 (2): 113-20; Hogan, *et al.* (1986) en Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; en el documento WO 91/08216, o en la patente de Estados Unidos No. 4.736.866.

En un método preferido, se microinyectan los polinucleótidos en el oocito fertilizado. Típicamente, los oocitos fertilizados son microinyectados usando técnicas estándar, y después se cultivan *in vitro* hasta que se obtiene un

50 "embrión de pre-implantación". Tales embriones de pre-implantación contienen preferiblemente aproximadamente 16 a 150 células. Los métodos para cultivar los oocitos fertilizados hasta la fase de preimplantación están descritos, por ejemplo, por Gordon *et al.* ((1984) Methods in Enzymology, 101,414); Hogan *et al.* ((1986) en Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y) (para el embrión de ratón); Hammer *et al.* ((1985) Nature, 315,680) (para los embriones de conejo y cerdo); Gandolfi *et al.* ((1987) J. Reprod. Fert. 81,23-28); Rexroad *et al.* ((1988) J. Anim. Sci. 66,947-953) (para los embriones ovinos); y Eyestone *et al.* ((1989) J. Reprod. Fert. 85,715-720); Camous *et al.* ((1984) J. Reprod. Fert. 72,779-785); y Heyman *et al.* ((1987) Theriogenology 27, 5968) (para los embriones bovinos). Los embriones de pre-implantación se transfieren entonces

55 a una hembra apropiada por métodos estándar para permitir el nacimiento de un animal transgénico o quimérico, dependiendo de la fase de desarrollo en la que es introducido el transgén.

Como a menudo la frecuencia de incorporación del transgén es baja, es muy deseable la detección de la integración

60 del transgén en los embriones de pre-implantación, usando cualquiera de los métodos descritos aquí. Se puede usar cualquiera de una serie de métodos para detectar la presencia de un transgén en un embrión de pre-implantación. Por ejemplo, se pueden separar una o más células del embrión de pre-implantación, y la presencia o ausencia del transgén en la célula o células separadas se puede detectar usando cualquier método estándar por ejemplo la PCR. Alternativamente, la presencia de un transgén puede ser detectada en el útero o después del parto usando métodos

65 estándar.

Se pueden generar mamíferos transgénicos que segreguen polipéptidos OBG3 recombinantes en su leche. Como la glándula mamaria es un órgano productor de proteínas muy eficiente, tales métodos pueden ser usados para producir

concentraciones de proteínas en el intervalo de gramos por litro, y a menudo de forma más significativa. Preferiblemente, la expresión en la glándula mamaria se alcanza uniendo operativamente el polinucleótido que codifica el polipéptido OBG3 a un promotor específico de la glándula mamaria y, opcionalmente, a otros elementos reguladores. Los promotores adecuados y otros elementos incluyen, pero sin limitarse a ellos, los derivados de WAP corto y largo de mamífero, alfa-, beta-, y kappa-caseína, alfa- y beta-lactoglobulina, genes beta-CN 5', así como el promotor del virus del tumor de mama de ratón (MMTV). Dichos promotores y otros elementos pueden ser derivados de cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, vacas, cabras, ovejas, cerdos, ratones, conejos, y cobayas. Las secuencias del promotor y otras secuencias reguladoras, vectores, y otras enseñanzas relevantes, se proporcionan por ejemplo, por Clark (1998) *J Mammary Gly Biol Neoplasia* 3: 337-50; Jost *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol* 17: 160-4; Patentes de Estados Unidos Nos. 5.994.616; 6.140.552; 6.013.857; Sohn *et al.* (1999) *DNA Cell Biol.* 18: 845-52; Kim *et al.* (1999) *J. Biochem. (Japan)* 126: 320-5; Soulier *et al.* (1999) *Euro. J. Biochem.* 260: 533-9; Zhang *et al.* (1997) *Chin. J. Biotech.* 13: 271-6; Rijnkels *et al.* (1998) *Transgen. Res.* 7: 5-14; Korhonen *et al.* (1997) *Euro. J. Biochem.* 245: 482-9; Uusi-Oukari *et al.* (1997) *Transgen. Res.* 6: 75-84; Hitchin *et al.* (1996) *Prot. Expr. Purif.* 7: 247-52; Platenburg *et al.* (1994) *Transgen. Res.* 3: 99-108; Heng-Cherl *et al.* (1993) *Animal Biotech.* 4: 89-107; y Christa *et al.* (2000) *Euro. J. Biochem.* 267: 1665-71.

Los polipéptidos descritos en esta memoria, pueden ser producidos en la leche mediante la introducción de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos en las células somáticas de la glándula mamaria *in vivo*, por ejemplo en las células epiteliales secretoras mamarias. Por ejemplo, el DNA plásmido puede ser infundido a través del canal del pezón, por ejemplo en asociación con DEAE-dextrano (véase, por ejemplo, Hens *et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1523: 161-171), en asociación con un ligando que puede llevar a la endocitosis de la construcción mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Sobolev *et al.* (1998) 273: 7928-33), o en un vector vírico tal como un vector retroviral, por ejemplo el virus de la leucemia del gibón ape (véase, por ejemplo, Archer *et al.* (1994) *PNAS* 91: 6840-6844). En cualquiera de estas realizaciones, el polinucleótido puede estar unido operativamente a un promotor específico de la glándula mamaria, como se ha descrito antes, o, alternativamente, a cualquier promotor fuertemente expresado tal como CMV o MoMLV LTR.

La idoneidad de cualquier vector, promotor, elemento regulador, etc. para el uso que se describe en esta memoria, puede ser evaluada de antemano transfectando células tales como las células epiteliales mamarias, por ejemplo células MacT (células epiteliales mamarias bovinas) o células GME (células epiteliales mamarias de cabra), *in vitro* y evaluando la eficacia de la transfección y expresión del transgén en las células.

Para la administración *in vivo*, los polinucleótidos pueden ser administrados en cualquier formulación adecuada, en cualquier concentración dentro de un intervalo de concentraciones (por ejemplo 1-500 µg/ml, preferiblemente 50-100 µg/ml), en cualquier volumen (por ejemplo 1-100 ml, preferiblemente 1 a 20 ml), y pueden ser administrados en cualquier número de veces (por ejemplo 1, 2, 3, 5, o 10 veces), a cualquier frecuencia (por ejemplo cada 1, 2, 3, 5, 10, o cualquier número de días). Las concentraciones, frecuencias, modos de administración, etc. adecuados dependerán del particular polinucleótido, vector, animal, etc., y pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica.

Se puede usar un vector retroviral tal como un vector del virus de la leucemia de gibón ape, como se describe en Archer *et al.* ((1994) *PNAS* 91: 6840-6844). Como la infección retroviral requiere típicamente la división de las células, se puede estimular la división de las células en las glándulas mamarias conjuntamente con la administración del vector, por ejemplo usando un factor tal como benzoato de estradiol, progesterona, reserpina, o dexametasona. Además, el método retroviral y otros métodos de infección pueden ser facilitados usando compuestos accesorios tales como polibreno.

En cualquiera de los métodos descritos aquí para obtener polipéptidos OBG3 de la leche, la cantidad de leche obtenida, y por tanto la cantidad de polipéptidos OBG3 producidos, puede ser aumentada usando cualquier método estándar de inducción de la lactación, por ejemplo usando hexestrol, estrógenos, y/o progesterona.

Los polinucleótidos usados pueden codificar o un polipéptido OBG3 de longitud completa o un fragmento de OBG3. Típicamente, el polipéptido codificado incluirá una secuencia señal para asegurar la secreción de la proteína en la leche. Cuando se usa una secuencia de OBG3 de longitud completa, la proteína de longitud completa puede ser aislada, por ejemplo, a partir de la leche y escindida *in vitro* usando una proteasa adecuada. Alternativamente, se puede introducir un segundo polinucleótido que codifica la proteasa en el animal o en las células de la glándula mamaria, con lo que la expresión de la proteasa produce la escisión del polipéptido OBG3 *in vivo*, permitiendo de este modo el aislamiento directo de fragmentos de OBG3 de la leche.

V. Composiciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables

Los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, se pueden administrar a animales y/o a seres humanos, solos o en composiciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables en las que se mezclan con vehículos o excipientes adecuados. La composición farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable puede ser administrada entonces a una dosis terapéuticamente eficaz. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de fragmento gOBG3 suficiente para dar resultados en la prevención o mejoría de los síntomas o estado fisiológico de enfermedades o trastornos relacionados con la obesidad como se determina por los métodos descritos en esta memoria. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede referir también a la cantidad de fragmento OBG3 o gOBG3 necesaria para una reducción de peso o una prevención de un aumento de peso o prevención de un aumento del ritmo de ganancia

de peso en personas que desean este efecto por razones estéticas. Una dosis terapéuticamente eficaz de un fragmento gOBG3 descrito en esta memoria, es aquella dosis que es adecuada para estimular la pérdida de peso o la ganancia de peso con el uso o administración periódica continuada. Las técnicas para la formulación y administración de fragmentos de polipéptido OBG3 se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Otras enfermedades o trastornos en los que se pueden usar los fragmentos de polipéptido gOBG3 para su tratamiento o prevención incluyen, pero sin limitarse a ellas, la obesidad y enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad tales como obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina y diabetes tipo II. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos descritos en esta memoria, incluyen hiperlipidemia e hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales de la invención relacionados con la obesidad incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, anorexia, y bulimia. Los fragmentos de polipéptido gOBG3 pueden ser usados también para mejorar el rendimiento físico durante el trabajo o ejercicio o mejorar una sensación de bienestar general. Las actividades de rendimiento físico incluyen andar, correr, saltar, ascender y/o escalar.

Los fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 o sus antagonistas pueden ser usados también para tratar la dislexia, el trastorno de déficit de atención (ADD), el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), y los trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia mediante la modulación del metabolismo de los ácidos grasos, más específicamente, la producción de ciertos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Se considera expresamente que los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, se pueden proporcionar solos o en combinación con otros compuestos farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Otros compuestos útiles para el tratamiento de la obesidad y otras enfermedades y trastornos son actualmente bien conocidos en la técnica.

En una realización preferida, los fragmentos de polipéptido gOBG3 son útiles y se usan en el tratamiento de la resistencia a la insulina y en la diabetes usando métodos descritos en esta memoria, y conocidos en la técnica. Más particularmente, un procedimiento para la modificación y regulación terapéutica del metabolismo de la glucosa en un sujeto animal o en un ser humano puede comprender administrar a un sujeto que necesite tratamiento (alternativamente fijado en una base diaria) un fragmento de polipéptido gOBG3 (o polinucleótido que codifica dicho polipéptido) en una dosis y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los niveles de glucosa del plasma, en dicho sujeto animal o ser humano.

Otros métodos para la profilaxis o tratamiento de la diabetes pueden comprender administrar a un sujeto que necesite tratamiento (alternativamente fijado en una base diaria) un fragmento de polipéptido gOBG3 (o polinucleótido que codifica dicho polipéptido) en una dosis y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los niveles de glucosa del plasma, en dicho sujeto animal o ser humano.

Vías de administración

Las vías de administración adecuadas incluyen la administración oral, nasal, rectal, transmucosal, o intestinal, administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, intrapulmonares (inhalaación) o intraoculares usando métodos conocidos en la técnica. Un método particularmente útil para administrar los compuestos para estimular la pérdida de peso incluye la implantación quirúrgica, por ejemplo en la cavidad abdominal del receptor, de un dispositivo para liberar fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 durante un extenso periodo de tiempo. Otras vías particularmente preferidas de administración son los aerosoles y la formulación depot. Están expresamente contempladas las formulaciones de liberación sostenida, particularmente depot, de los medicamentos descritos en esta memoria.

Composición/Formulación

Las composiciones y medicamentos farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables pueden ser formulados de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptable que comprenden excipientes y auxiliares. Una formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Ciertos medicamentos descritos en esta memoria, incluirán un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable y al menos un polipéptido que es un fragmento de polipéptido gOBG3 como se describe en esta memoria. Para inyección, los agentes descritos aquí, pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampones salinos fisiológicos tales como un tampón de fosfato o bicarbonato. Para administración transmucosal, se usan en la formulación, agentes penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Las preparaciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables que se pueden tomar oralmente incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con agentes de carga tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. En adición, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o comprimidos para chupar formulados de una manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se liberan convenientemente en la forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un adecuado propelente gaseoso, por ejemplo, dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para liberar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos por ejemplo, de gelatina, para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o por perfusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en polvo o en forma liofilizada para reconstitución con un vehículo adecuado, tal como agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

En adición a las formulaciones descritas previamente, los compuestos pueden ser formulados también como una preparación depot. Tales formulaciones de acción a largo plazo pueden ser administradas por implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden ser formulados con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados bastante solubles, por ejemplo, como una sal bastante soluble.

Adicionalmente, los compuestos se pueden administrar usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diferentes materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante unas semanas hasta más de 100 días.

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

Las composiciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables pueden comprender también vehículos o excipientes adecuados sólidos o en fase de gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen pero sin limitarse a ellos, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

55 *Dosificación eficaz*

Las composiciones farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables pueden incluir composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin que se proponen. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo o aliviar los síntomas existentes del sujeto a ser tratado. La determinación de las cantidades eficaces está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada aquí.

Para cualquier compuesto usado descrito en esta memoria, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos de cultivo de las células. Por ejemplo, una dosis puede ser formulada en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye o engloba un punto o intervalo de concentración que se ha demostrado que aumenta la absorción o unión de la leptina o lipoproteína en un sistema *in vitro*. Tal información se puede usar para determinar más exactamente los dosis útiles en los seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del compuesto que produce una mejoría de los síntomas en un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50, (la dosis letal para el 50% de la población de ensayo) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación entre LD50 y ED50. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en los seres humanos. La dosis de tales compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50, con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser elegidas por cada médico a la vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1).

La cantidad de dosis y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del compuesto activo que sean suficientes para mantener o prevenir la pérdida o ganancia de peso, dependiendo de la situación particular. Las dosis necesarias para alcanzar estos efectos dependerá de las características del individuo y de la vía de administración.

Los intervalos de dosis se pueden determinar también usando el valor de la concentración eficaz mínima. Los compuestos se deben administrar usando un régimen que mantiene los niveles plasmáticos por encima de la concentración eficaz mínima durante 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90%; y lo más preferiblemente entre 50-90%. En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede que no esté relacionada con la concentración plasmática.

La cantidad de composición administrada dependerá naturalmente, del sujeto a ser tratado, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, de la manera de administración y del criterio del médico prescriptor.

Un intervalo de dosis preferido para la cantidad de un fragmento de polipéptido gOBG3 descrito en esta memoria, que puede ser administrada en base diaria o regular para alcanzar los resultados deseados, incluyendo una reducción en los niveles de lipoproteínas circulantes plasmáticas ricas en triglicéridos, varían de 0,01-0,5 mg/kg de masa corporal. Un intervalo de dosis más preferido varía de 0,05-0,1 mg/kg. Naturalmente, estas dosis diarias pueden ser liberadas o administradas en pequeñas cantidades periódicamente a lo largo de un día. Se debe observar que estos intervalos de dosis son solamente intervalos preferidos y no significa que sean limitantes para la invención.

VI. Métodos de tratamiento

El tratamiento de ratones con fragmentos de polipéptido gOBG3 da como resultado la reducción de los niveles de triglicéridos, la reducción de los niveles de ácidos grasos libres, la reducción de los niveles de glucosa, y la reducción del peso corporal así como un aumento de la oxidación muscular.

Los métodos para prevenir o tratar las enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad pueden comprender proporcionar a un individuo que necesita tal tratamiento un fragmento de polipéptido gOBG3 como se describe en esta memoria. Preferiblemente, el fragmento del polipéptido OBG3 tiene actividad relacionada con la obesidad ya sea *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente el fragmento del polipéptido OBG3 se proporciona al individuo en una composición farmacéutica que preferiblemente se toma oralmente. Preferiblemente el individuo es un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano. En las realizaciones preferidas, la enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes tipo II y diabetes lipoatrófica. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos de la invención incluyen lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos descritos en esta memoria, incluyen hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, y hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales de la invención relacionados con la obesidad incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, pérdida de peso relacionada con neoplasia, anorexia, y bulimia. En las realizaciones altamente preferidas, se usan los fragmentos de polipéptido gOBG3 en composiciones farmacéuticas para modular el peso corporal en individuos sanos por razones estéticas.

Los métodos para prevenir o tratar enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad pueden comprender proporcionar a un individuo que necesita tal tratamiento un compuesto identificado por los ensayos descritos en la Sección VI de las Realizaciones preferidas y en los Ejemplos. Preferiblemente estos compuestos antagonizan o agonizan los efectos de los fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 en las células *in vitro*, músculos *ex vivo*, o en modelos animales. Alternativamente, estos compuestos agonizan o antagonizan los efectos de los fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 sobre la absorción y/o unión de la leptina y/o lipoproteína. Opcionalmente, estos compuestos previenen la interacción, unión, o absorción de los fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 con LSR *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, el compuesto se proporciona al individuo en una composición farmacéutica que preferiblemente se toma oralmente. Preferiblemente el individuo es un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano. En

las realizaciones preferidas, la enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad se selecciona del grupo que consiste en obesidad y enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad tales como aterosclerosis, cardiopatía, resistencia a la insulina, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes tipo II, y diabetes lipoatrófica. Las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo II a ser tratadas por los métodos descritos en esta memoria, pueden incluir lesiones microangiopáticas, lesiones oculares, y lesiones renales. La cardiopatía incluye, pero sin limitarse a ellas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, y tensión arterial alta. Otros trastornos relacionados con la obesidad a ser tratados con los compuestos descritos en esta memoria, pueden incluir hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, y hiperuricemia. Otras enfermedades o trastornos adicionales de la invención relacionados con la obesidad incluyen caquexia, consunción, pérdida de peso relacionada con el SIDA, pérdida de peso relacionada con neoplasia, anorexia, y bulimia. Las composiciones farmacéuticas se pueden usar para modular el peso corporal razones estéticas.

El tratamiento se puede realizar con fragmentos de polipéptido gOBG3 cuando se ha demostrado que el individuo tiene un particular genotipo para un marcador Apm1 (Apm1 designa el homólogo humano del polipéptido OBG3 de longitud completa), o cuando se ha demostrado que tiene una cantidad reducida de Apm1 plasmático, ya sea de longitud completa o preferiblemente un fragmento más biológicamente activo de Apm1, en comparación con los valores control, por ejemplo los valores representativos de individuos no enfermos, o en comparación con el del individuo antes de la aparición de una enfermedad o condición. En cualquier caso, el tratamiento debe comprender proporcionar al individuo fragmentos de polipéptido gOBG3 farmacéuticamente aceptables. La cantidad exacta de fragmento gOBG3 proporcionada se debe determinar mediante ensayos clínicos bajo la dirección de médicos cualificados, pero es de esperar que esté en el intervalo de 5-7 mg por individuo al día. En general, un intervalo preferido debe variar de 0,5 a 14 mg por individuo al día, siendo un intervalo altamente preferido entre 1 y 10 mg por individuo al día. Los individuos que podrían beneficiarse del tratamiento con fragmentos de polipéptido gOBG3 pueden ser identificados por dos métodos al menos: determinaciones del nivel en suero plasmático y caracterización del genotipo.

25 Niveles de OBG3/APM1

Estudios preliminares han demostrado que las personas obesas tienen niveles más bajos de OBG3/Apm1 de longitud completa que las personas no obesas. Se contempla el tratamiento de individuos (preferiblemente obesos) que tienen niveles bajos de OBG3/Apm1 de longitud completa con los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria. En adición, se contempla el tratamiento de individuos con niveles bajos del fragmento de OBG3/Apm1 biológicamente activo con fragmentos de polipéptido gOBG3. Los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos en esta memoria, pueden ser administrados a individuos, preferiblemente individuos obesos, que tienen niveles de OBG3 de longitud completa (o alternativamente un fragmento maduro del polipéptido OBG3) que son al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, aproximadamente 100% o 100% más bajos que los de los individuos no obesos, preferiblemente individuos sanos como se determina por un médico usando los estándares normales en la técnica. Los métodos para determinar y comparar los niveles de OBG3 de longitud completa en individuos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, el uso de un anticuerpo específico para Apm1 en un formato tal como un radioinmunoensayo, ELISA, transferencia Western, transferencia a membrana, o como parte de una matriz, por ejemplo. Los métodos para generar anticuerpos frente a Apm1 y sus fragmentos así como frente a proteínas con SNPs se exponen en los documentos PCT/IB99/01858, solicitud de Estados Unidos No. 09/434.848, y WO 99/07736. Además, los anticuerpos específicos para los fragmentos de polipéptido gOBG3 descritos aquí, su generación, y su uso están descritos en esta memoria.

Otras características y ventajas de la invención se describen en la Breve descripción de las figuras y en los Ejemplos. Estos son a título de ejemplos solamente, y no limitan la invención de ningún modo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no como medios de limitación. Un experto normal en la técnica debería ser capaz de diseñar ensayos y métodos equivalentes basados en esta descripción y todos ellos forman parte de la presente invención.

Se debe observar que en el término polipéptido OBG3 de longitud completa usado a todo lo largo de la memoria descriptiva se pretende englobar los homólogos de la proteína ACRP30 (Scherer *et al* (1995) J Biol. Chem. 270: 26746-9), AdipoQ (Hu *et al* (1996) J Biol Chem 271: 10697-10703) y el homólogo humano Apm-1 (Maeda *et al* (1996) Biochem Biophys Res Commun 221: 289-9) o GBP28 (Nakano *et al* (1996) J Biochem (Tokyo) 120:803-812). También OBG3 intenta englobar otros homólogos.

Ejemplo 1

Producción de OBG3 recombinante

A continuación se detalla un método a título de ejemplo para generar el OBG3 recombinante. Aunque el método describe la producción del análogo de ratón, una persona experta en la técnica debería ser capaz de usar la información proporcionada para producir otros análogos de OBG3, incluyendo pero sin limitarse a él, el análogo humano. En la Fig.1 se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del OBG3 humano (apm1) y de ratón (AdipoQ y acrp30).

ES 2 312 450 T3

El análogo de OBG3 recombinante es clonado en pTRC His B (Invitrogen) entre BamH1 y Xho1 (Fig. 2) y se mantiene en *E. coli* DH5-alfa. La secuencia del inserto de OBG3 corresponde a ACRP 30 genbank U37222 bases 88 a 791 excepto en la posición 382 donde en #3 G reemplaza a A encontrado en ACRP 30 (V en lugar de M). El correspondiente nucleótido en AdipoQ U49915 es G como en el clon #3. El aminoácido V se conserva también en la secuencia humana APM-1 D45371.

Cultivo

Poner en placas las bacterias en medio agar LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Inocular 1 colonia en 5 ml de medio (sin agar) a 37°C durante la noche. Añadir 2 ml de este cultivo inicial a matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 200 ml de medio LB y 100 µg/ml de ampicilina. Incubar a 37°C en un agitador vibrador hasta que la OD₆₀₀ = 0,2. Añadir IPTG hasta una concentración final de 1 mM (solución stock = 1 M). Incubar a 37°C durante la noche.

Lisis

Sedimentar las bacterias por centrifugación (Sorvall, 3500 rpm, 15 min, 4°C) en un tubo pre-pesado.

A 4°C resuspender el sedimento en 3 ml/g de tampón de lisis

Añadir 40 µl/g de PMSF 10 mM

Añadir 80 µl/g de lisozima a 10 mg/ml

Incubar durante 20 min sobre hielo, agitando intermitentemente

Añadir 30 µl/g de desoxicolato de sodio al 10%

Incubar a 37°C hasta que el lisado se vuelve viscoso

Congelar en nitrógeno líquido y descongelar a 37°C tres veces

Sonicar 2X, 30 segundos, ciclo a 25%, nivel 2,5 de potencia

Centrifugar durante 30 min, 15000 rpm, 4°C

Recoger el sobrenadante

Nota: El lisado se puede conservar congelado antes de la etapa de sonicación.

Purificación del lote

1. Empaquetar 1 ml de resina Probond (Invitrogen; 1 ml = 2 ml de gel suspendido) en una columna de 5 ml. Lavar con 5 ml de PBS.

2. Aplicar 5 ml de sobrenadante bacteriano a dicho 1 ml de gel. (Si el volumen es muy alto, usar varias columnas pequeñas)

3. Lavar con 24 ml de tampón fosfato, pH 7,8, seguido por un lavado con 24 ml de tampón fosfato, pH 6.

4. Eluir con tampón de imidazol y recoger fracciones de 1 ml.

5. Analizar las fracciones por OD a 280 nm o por SDS-PAGE (12,5%, dilución ½ en 2X tampón de muestra) en condiciones reductoras (100°C, 5 min)

6. Reunir las fracciones que contienen proteínas (usualmente las fracciones números 2-4 para las concentraciones de 0,8-1 mg/ml y las fracciones 1, 5 y 6 para las concentraciones de 0,2-0,4 mg/ml).

7. Dializar a fondo frente a 1 X PBS, bicarbonato de amonio 24 mM o Tris 50 mM, pH 7,4 que contiene NaCl 250 mM. Concentrar mediante Speed-Vac si fuera necesario.

8. Analizar las proteínas por el método Lowry.

9. Dividir en alícuotas y almacenar a -20°C.

ES 2 312 450 T3

Sistema de purificación por cromatografía de líquidos

1. Empaquetar 5 ml de resina Probond en una columna de 5 ml.

2. Lavar con 4 volúmenes del lecho de tampón fosfato pH 7,8, 1 ml/min.

3. Inyectar 25 ml de lisado (filtrado sobre 0,45 μ o centrifugado a 3000 rpm, 30 min, 4°C, Beckman Allegra 6R) a 0,5 ml/min.

4. Lavar con 4 volúmenes de lecho de tampón fosfato, pH 7,8 a 1 ml/min.

5. Lavar con 12 volúmenes de lecho de tampón fosfato pH 5,5 a 1 ml/min.

6. Eluir la fracción unida con tampón fosfato, pH 5,5, que contiene imidazol 1 M a 1 ml/min.

7. Recoger las fracciones, dializar y analizar las proteínas como se ha descrito para la purificación del lote, etapas 7-9.

Ejemplo 2

Generación de OBG3 globular por escisión enzimática

Incubar el OBG3 purificado (obtenido como se ha descrito antes o por un método equivalente) con tripsina acetilada-tipo V-S procedente de páncreas bovino (Sigma E.C. = 3.4.21.4) a 400 u/mg de proteína a 25°C durante 10 min.

Parar la reacción pasando la muestra sobre una columna poli-Prep (Biorad 731-1550) a +4°C que contiene un inhibidor inmovilizado de tripsina.

Recoger fracciones de 1,0 ml. Determinar la concentración de proteína.

Reunir las fracciones que contienen proteína y dializar extensamente frente a PBS usando tubo de diálisis con un corte de peso molecular = 10.000 da.

Concentrar sobre un filtro estéril Amicon YM-10 Centricon Filter (Millipore, corte de peso molecular = 10.000 da).

Determinar la concentración final de proteína usando el procedimiento de Lowry modificado por Markwell (1981) o el ensayo BCA de proteínas (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) y BSA como estándar.

Comprobar la pureza y la eficacia de la escisión por análisis de SDS-PAGE usando un gel con gradiente 4-20%. El OBG3 intacto migra como una banda simple a aproximadamente 37 kda aparentemente debido a las secuencias del vector cotranscrito unido a la cola de histidina en el N-terminal de AdipoQ, y forma un dímero a 74 kDa. El OBG3 escindido forma una banda a aproximadamente 18 kda (gOBG3). También se generan productos de degradación adicionales, todos menores de 10 kda a partir de la región N-terminal. Estos se separan de la banda de 18 kda deseada por diálisis con membranas semipermeables con un corte de peso molecular de 10.000. Los dos sitios potenciales de escisión para gOBG3 se muestran en la Fig. 3. El sitio de escisión real ha sido identificado como el que está después del aminoácido 103 (aminoácido 100 para el gOBG3 humano o APM1) (Fig. 7). Esto es, el N-terminal del producto de escisión de gOBG3 es Lys 104 (Lys 101 para el gOBG3 humano o APM1).

Se pueden usar también otros métodos enzimáticos/proteolíticos que producen productos similares, por ejemplo clostripaína. Otras enzimas preferidas deberían preferiblemente escindir el OBG3 en un sitio próximo a la unión entre la cola tipo colágeno y la cabeza globular (aproximadamente el aminoácido 108 para el gOBG3 humano y aproximadamente el aminoácido 111 para el gOBG3 murino), preferiblemente deberían permitir que la reacción sea parada fácilmente, preferiblemente que sea separado fácilmente usando un inhibidor inmovilizado, o un método similar, y preferiblemente corta el fragmento N-terminal en pequeñas piezas (menores que un MW de 10.000). La escisión preferiblemente tiene lugar en la presencia de no más de 6 repeticiones de colágeno, más preferiblemente 3 repeticiones de colágeno, y lo más preferiblemente sin repeticiones de colágeno. Una repetición de colágeno consiste en GLY-X-Y. La determinación de si se ha generado un gOBG3 activo, se puede comprobar usando los ensayos *in vitro* y *in vivo* descritos en esta memoria, (Ejemplos 4-6, 8-10).

Ejemplo 3

Generación de gOBG3 por metodología recombinante

5 *Clonación en el sitio de restricción*

Una primera táctica es buscar sitios de restricción únicos cerca del comienzo de la región de la cabeza globular (las secuencias de ácido nucleico de ratón y de polipéptidos OBG3 humanos se proporcionan en el listado de secuencias). Si está presente este sitio único, se puede usar para escindir la región tipo colágeno en 5' a partir de la región de cabeza globular. Si no está presente un único sitio, es posible también, aunque más difícil, hacer esto usando enzimas de restricción que cortan en más de una localización haciendo digestiones parciales. El extremo 3' de la cabeza globular puede ser cortado desde su vector de la cadena principal usando una enzima apropiada. La cabeza globular puede ser clonada entonces en un vector de expresión y se pueden identificar las estructuras artificiales que contienen los fragmentos correctos. Para AdipoQ, parece que la Tau I es la única enzima que debería separar la cola del colágeno de la cabeza globular.

Clonación por PCR

20 Otra táctica es someter a la PCR la región de interés de la secuencia intacta (si el cDNA está disponible) usando cebadores con sitios de restricción en el extremo de forma que los productos de la PCR pueden ser clonados en vectores de interés. Alternativamente, el gOBG3 puede ser generado también usando RT-PCR para aislarlo del RNA del tejido adiposo.

25 *Vector de E. coli*

Por ejemplo, la región globular AdipoQ puede ser clonada en pTrcHisB, poniendo un sitio BamHI en el oligo sentido y un sitio XhoI en el oligo antisentido. Esto permite el aislamiento del producto de la PCR, la digestión de dicho producto, y el enlace con el vector pTrcHisB que también ha sido digerido con BamHI y XhoI (Fig. 4). El vector, pTrcHisB, tiene un cola de 6-Histidina en N-terminal, que permite la purificación de la proteína sobreexpresada procedente del lisado usando una columna de resina Nickel. El vector pTrcHisB se usa para la sobre-expresión de proteínas en *E. coli*.

35 Los oligos a título de ejemplos para clonación en el vector de *E. coli* incluyen:

A) obg3 sentido CTTAGTGGATCCCGCTTATGTGTATCGCTCAG a 6 pares de bases desde la izquierda hay un sitio BamHI de 6 bp. Así la región que es homóloga al gen empieza en el nucleótido 13.

40 B) obg3 antisentido GCTGTTCTCGAGTCAGTTGGTATCATGG a 6 pares de bases desde la izquierda hay un sitio XhoI de 6 bp. Así la región que es homóloga al gen empieza en el nucleótido 13.

45 Lo que sigue son ejemplos de las condiciones de la PCR.

Las concentraciones finales de la reacción son:

1X de tampón A de PE Biosystems

50 MgCl₂ 1,5 mM

Cada uno de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200 μM

55 2,5 unidades de Amplitaq Gold de PE Biosystems

Cada cebador (sentido y antisentido) 0,4 μM

10 ng de modelo de plásmido

Parámetros de ciclo:

95°C 10 min --- 1 ciclo

65 95°C 30 s

56°C 30 s

ES 2 312 450 T3

72°C 30 s

repetir las 3 etapas anteriores durante 30 ciclos

5 72°C 7 min --- 1 ciclo.

Vector BAC

10 La cabeza globular también puede ser sobreexpresada en un sistema de Baculovirus usando el kit 6xHis Baculovirus (PharMingen), por ejemplo. La región globular AdipoQ es clonada en el vector apropiado usando enzimas disponibles en el sitio de clonación múltiple. Esto permite la sobre-expresión de la proteína en un sistema eucariótico que tiene algunas ventajas sobre el sistema de *E. coli*, que incluye: expresión múltiple del gen, escisión del péptido señal, corte y empalme del intrón, transporte nuclear, proteína funcional, fosforilación, glucosilación, y acilación.

15

Los oligos a título de ejemplos para clonación en el vector de Baculovirus son los siguientes:

20 A). obg3 sentido CTTAGTGAATTCGCTTATGTGTATCGCTCAGA a 6 pares de bases desde la izquierda hay un sitio EcoRI de 6 bp. Así la región que es homóloga al gen empieza en el nucleótido 13.

B). obg3 antisentido GCTGTTCTGCAGTCAGTTGGTATCATGG a 6 pares de bases desde la izquierda hay un sitio PstI de 6 bp. Así la región que es homóloga al gen empieza en el nucleótido 13.

25

Lo que sigue son ejemplos de las condiciones de la PCR.

Las concentraciones finales de la reacción son:

30 1X de tampón A de PE Biosystems

MgCl₂ 1,5 mM

35

Cada uno de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200 µM

2,5 unidades de Amplitaq Gold de PE Biosystems

Cada cebador (sentido y antisentido) 0,4 µM

40

10 ng de modelo de plásmido

Parámetros de ciclo:

45

95°C 10 min --- 1 ciclo

95°C 30 s

60°C 30 s

50

72°C 30 s

repetir las 3 etapas anteriores durante 30 ciclos

55

72°C 7 min --- 1 ciclo.

Vector de un mamífero

60 El OBG3 globular puede ser clonado también en un vector de expresión de mamífero y puede ser expresado y purificado a partir de células de mamífero, por ejemplo células 3T3-L1 (precursoras de adipocitos indiferenciados). La cabeza globular se genera entonces en un entorno muy próximo a su entorno endógeno. Sin embargo, este no es necesariamente el modo más eficaz de preparar la proteína.

65

Ejemplo 4

Ensayos in vitro de la actividad relacionada con la obesidad

5 La actividad de diferentes preparaciones y diferentes variantes de la secuencia de los fragmentos de polipéptido gOBG3 se evalúa usando diferentes ensayos *in vitro* incluyendo los que se indican a continuación. Estos ensayos son también ejemplos de los que se pueden usar para desarrollar antagonistas y agonistas del fragmento de polipéptido gOBG3. Para hacer esto, el efecto de los fragmentos de polipéptido gOBG3 en los ensayos anteriores, por ejemplo sobre la actividad de la leptina y/o LSR, en presencia de las moléculas candidatos se debe comparar con el efecto de los fragmentos de polipéptido gOBG3 en los ensayos en ausencia de las moléculas candidatos. Puesto que se ha demostrado que los fragmentos de polipéptido gOBG3 reducen el peso corporal en ratones con una dieta de alto restaurante (Ejemplo 5), estos ensayos sirven también para identificar los tratamientos candidatos para reducir (o aumentar) el peso corporal.

15 *Línea de células hepáticas*

Los ensayos de eficacia de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre LSR se pueden realizar usando líneas de células hepáticas, incluyendo por ejemplo, PLC, HepG2, Hep3B (humano), Hepa 1-6, BPRCL (de ratón), o MCA-RH777, MCA-RH8994 (de rata). Para líneas de células humanas, se deben usar preferiblemente APM1 y APM1 globular; para roedores, se deben usar preferiblemente AdipoQ/ACRP30 de longitud completa y globular.

Las células hepáticas de ratón BPRCL (depósito ATCC) se pusieron en placas a una densidad de 300.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (día 0) en DMEM (rico en glucosa) que contiene glutamina y penicilina-estreptomina (Bihain & Yen, 1992). Se cambió el medio el día 2. El día 3, se lavaron las monocapas confluentes una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) (2 ml/pocillo). Se incubaron las células a 37°C durante 30 min con concentraciones crecientes de AdipoQ (AQ) recombinante o AdipoQ globular (AQ-GH) en DMEM que contiene BSA al 0,2% (p/v), Hepes 5 mM, CaCl₂ 2 mM, bicarbonato de sodio a 3,7 g/l, pH 7,5. Se continuaron las incubaciones durante 3 h a 37°C después de la adición de 10 ng/ml de ¹²⁵I-leptina de ratón (actividad específica, 22100 cpm/ng). Se lavaron las monocapas 2 veces consecutivamente con PBS que contiene BSA al 0,2%, seguido por 1 lavado con PBS/BSA, y después 2 veces consecutivamente con PBS. Se lisaron las células con NaOH 0,1 N que contiene EDTA 0,24 mM. Se recogieron los lisados en tubos, y se contaron en un contador gamma.

Los resultados de un experimento a título de ejemplo se muestran como la media de determinaciones triplicadas en la Fig. 5.

Los resultados indican que los fragmentos de polipéptido gOBG3 son al menos un 30% más eficaces que el OBG3 para aumentar la absorción de leptina en una línea celular hepática (Fig. 5). Este ensayo se puede usar para determinar la eficacia de los fragmentos de polipéptido gOBG3 y los compuestos relacionados (o agonistas o antagonistas) para aumentar o reducir la absorción de leptina en el hígado, así como el mecanismo por el que el fragmento/compuesto polipeptídico gOBG3 ejerce este efecto.

Modelo de barrera hematoencefálica

El efecto de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre el transporte de leptina en el cerebro se puede determinar usando células derivadas del cerebro. Un método que se prevé, es usar el modelo de barrera hematoencefálica descrito por Dehouck, *et al* (J Neurochem 54: 1798-801, 1990) que usa un co-cultivo de células endoteliales capilares de cerebro y astrocitos para analizar los efectos de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre el transporte de leptina (u otras moléculas) a través de LSR u otros receptores.

Este ensayo debería ser un indicador del efecto potencial de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre el transporte de leptina al cerebro y podría ser usado para seleccionar variantes de los fragmentos de polipéptido gOBG3 en cuanto a su capacidad para modular el transporte de leptina a través de LSR u otros receptores en el cerebro. En adición, también se podrían cribar usando este ensayo los supuestos agonistas y antagonistas del efecto de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre el transporte de leptina a través de LSR u otros receptores. El aumento del transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica debería aumentar presumiblemente su acción como un factor saciante.

Análisis FACS de la expresión de LSR

El efecto de los fragmentos de polipéptido gOBG3 sobre LSR se puede determinar también midiendo el nivel de expresión de LSR en la superficie celular mediante citometría de flujo de superficie, usando anticuerpos anti-LSR y anticuerpos secundarios fluorescentes. La citometría de flujo es una tecnología basada en láser que se usa para medir las características de las partículas biológicas. El principio en que se basa la citometría de flujo es que la luz se dispersa y la fluorescencia que se emite como luz a partir de la fuente de excitación golpea las partículas en movimiento.

Este es un ensayo de alto rendimiento que podría ser adaptado fácilmente para seleccionar fragmentos de polipéptido OBG3 y gOBG3 y variantes, así como los supuestos agonistas o antagonistas de los fragmentos de polipéptido gOBG3. A continuación se proporcionan dos ensayos. El anticuerpo, la línea celular y el análogo del fragmento de polipéptido gOBG3 podrían variar dependiendo del experimento, pero se podría usar una línea celular humana, un

ES 2 312 450 T3

anticuerpo anti-LSR humano y APM1 globular para seleccionar variantes, agonistas, y antagonistas a ser utilizados para tratar a seres humanos.

Ensayo 1

Se pretratan las células o con OBG3 intacto o con fragmentos de polipéptido gOBG3 (o no se tratan) antes de su recogida y análisis por FACS. Se recogen las células usando solución de disociación no enzimática (Sigma), y después se incuban durante 1 h a 4°C con una dilución 1:200 de anti-LSR 81B o un anti-suero irrelevante en PBS que contiene BSA al 1% (p/v). Después de lavar dos veces con el mismo tampón, se añade a las células anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con FITC (Rockland, Gilbertsville, PA), seguido por una incubación adicional durante 30 min a 4°C. Después de lavado, se fijan las células en formalina al 2%. El análisis por citometría de flujo se realiza en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

El ensayo *in vitro* con la línea celular hepática (descrito antes) ha demostrado que la actividad de LSR (unión de leptina) aumenta con concentraciones crecientes de fragmentos de polipéptido gOBG3. Aunque no se desea que esté limitado por ninguna teoría particular, esto podría ser o bien el resultado de un aumento del número de sitios de unión a LSR sobre la superficie de la célula, o bien un cambio en la afinidad para la leptina. El ensayo FACS debería presumiblemente detectar cambios en el número de sitios de unión a LSR, aunque también podrían ser detectados cambios en la conformación que reflejan cambios en afinidad. Preferiblemente el anticuerpo debería ser frente al C-terminal del LSR.

Ensayo 2

Se cultivan las células en matraces T175 según las instrucciones del fabricante durante 48 horas antes del análisis.

Se lavan las células una vez con tampón FACS (1x PBS/ FBS al 2%, filtro esterilizado), y se raspan manualmente del matraz en 10 ml de tampón FACS. Se transfiere la suspensión de células a un tubo cónico de 15 ml y se centrifuga a 1200 rpm, 4°C durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de tampón FACS enfriado a 4°C. Se realiza el recuento de células y se ajusta la densidad celular con tampón FACS hasta una concentración de 1×10^6 células/ml. Se añade un mililitro de suspensión celular a cada pocillo de una placa de 48 pocillos para análisis. Se centrifugan las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se comprueban las placas para asegurarse de que las células se han sedimentado, se separa el sobrenadante y se resuspenden las células poniendo la placa sobre un mezclador en vórtex. Se añade un mililitro de tampón FACS a cada pocillo, seguido por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Este lavado de células descrito se realizó un total de 3 veces.

Se añade a las células un anticuerpo primario, cuyo título se ha determinado en experimentos de cribado para determinar las diluciones de trabajo apropiadas (por ejemplo 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:5000, o 1:10000), hasta un volumen total de 50 μ l de tampón FACS. Se incuban las placas durante 1 h a 4°C protegidas de la luz. Después de la incubación, se lavan las células 3 veces como se ha indicado antes. Se añade a las células un anticuerpo secundario apropiado, cuyo título se ha determinado en experimentos de cribado para determinar las diluciones de trabajo apropiadas (por ejemplo 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:5000, o 1:10000), hasta un volumen total de 50 μ l de tampón FACS. Se incuban las placas durante 1 h a 4°C protegidas de la luz. Después de la incubación, se lavan las células 3 veces como se ha indicado antes. Después del lavado final, se resuspenden las células en 500 μ l de tampón FACS y se transfieren a un tubo de adquisición de FACS. Se ponen las muestras sobre hielo protegidas de la luz y se analizan antes de 1 hora.

Unión celular y absorción de gOBG-3 detectada por microscopía de fluorescencia

Conjugación de gOBG3 con isotiocianato de fluoresceína (FITC): Se marcó gOBG3 purificado a una concentración de 1 mg/ml con FITC usando el kit de conjugación FluoroTag FITC de Sigma (Stock No. FITC-1). Para marcar el gOBG3 se siguió el protocolo indicado en el Sigma Handbook para conjugación a pequeña escala.

Cultivo celular: Se sembraron células C2C12 del músculo esquelético de ratón (ATCC, Manassas, VACRL-1772) y hepatocitos de ratón Hepa-1-6 (ATCC, Manassas, VA CRL-1830) en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 2×10^5 células por pocillo. Las células C2C12 y Hepa-1-6 se cultivaron según instrucciones del depositario durante 24-48 horas antes del análisis. Se llevó a cabo el ensayo cuando las células tuvieron una confluencia del 80%.

Unión celular y absorción del gOBG3 marcado con FITC usando microscopía: las células C2C12 y Hepa 1-6 se incubaron en presencia/ausencia de anticuerpo dirigido frente a LSR humano (81B: secuencia N-terminal de LSR humano; no reacciona de forma cruzada con LSR de ratón y 93A: la secuencia C-terminal, sí reacciona de forma cruzada con LSR de ratón) o un antisuero dirigido frente a gClqr (953) durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Se añadieron anticuerpos LSR al medio a una concentración de 2 μ g/ml. Se añadió el antisuero anti-gClqr al medio a un volumen de 2.5 μ l de suero sin diluir (alta concentración) o dilución 1:100 (baja concentración). Después de incubación con el anticuerpo especificado, se añadió FITC-gOBG3 (50 nM/ml) a cada pocillo de cultivo celular. Se incubaron de nuevo las células durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Se lavaron las células 2x con PBS, se rascaron las células del pocillo a

ES 2 312 450 T3

1 ml de PBS. Se transfirió la suspensión de células a un tubo eppendorf y se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos. Se separó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ l de PBS. Se analizó la unión y absorción de FITC-gOBG3 por microscopía de fluorescencia con un aumento de 40X.

5 El análisis de las células C2C12 y Hepa 1-6 revela idénticos fenotipos con respecto a los perfiles de unión y absorción de FITC-gOBG3 tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos LSR. Parece que el FITC-gOBG3 se localiza dentro de las vesículas del citoplasma tanto de los hepatocitos de ratón como de los mioblastos de ratón, dando a entender que la unión y absorción de FITC-gOBG3 está teniendo lugar. La absorción de FITC-gOBG3 parece que se bloquea cuando las células fueron pretratadas con el anticuerpo anti-LSR que reconoce el LSR de ratón. Sin embargo, la unión de FITC-gOBG3 a la superficie celular tiene lugar en una pequeña porción de las células (C2C12 y Hepa 1-6). A baja concentración del antisuero gClqr, parece que FITC-gOBG3 está localizado dentro de las vesículas del citoplasma de ambos tipos de células, similarmente al fenotipo de las células que no han recibido pre-tratamiento con anticuerpo antes de la adición de FITC-gOBG3. El fenotipo de absorción y unión de FITC-gOBG3 no es afectado por el pre-tratamiento con un anticuerpo LSR que no reconoce el LSR de ratón. Juntos, estos datos sugieren que la absorción de FITC-gOBG3 puede ser bloqueada por un anticuerpo LSR humano que reacciona de forma cruzada con el LSR de ratón. Sin embargo, este fenotipo no se reproduce con otros anticuerpos LSR que no tienen reactividad cruzada. Por tanto, este ensayo puede ser útil para identificar agentes que facilitan o previenen la absorción y/o unión de OBG3 o fragmentos de polipéptido gOBG3 a las células.

20 *Efecto sobre LSR como un receptor de lipoproteínas*

Se puede ensayar también el efecto de gOBG3 sobre la actividad del LSR de unión, internalización y degradación de las lipoproteínas. La medida de LSR como receptor de lipoproteínas está descrita en Bihain & Yen, ((1992) Biochemistry May 19; 31 (19): 4628-36). El efecto de gOBG3 sobre la actividad del LSR (u otros receptores) de unión, internalización y degradación de lipoproteínas se puede comparar con la de OBG3 intacto, con células sin tratar como un control adicional. Este ensayo se puede usar también para cribar las variantes activas e inhibitoras de gOBG3, así como los agonistas y antagonistas de la actividad relacionada con la obesidad.

Las células hepáticas humanas PLC (Depósito ATCC) se pusieron en placas a una densidad de 300.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (día 0) en DMEM (rico en glucosa) que contiene glutamina y penicilina-estreptomicina (Bihain & Yen, 1992). Se cambió el medio el día 2. El día 3, se lavaron las monocapas confluentes una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) (2 ml/pocillo). Se incubaron las células a 37°C durante 30 min con 10 ng/ml de leptina recombinante humana en DMEM que contiene BSA al 0,2% (p/v), Hepes 5 mM, CaCl_2 2 mM, 3,7 g/l de bicarbonato de sodio, pH 7,5, seguido por otros 30 min de incubación a 37°C con concentraciones crecientes de gOBG3. Se continuaron las incubaciones durante 2 h a 37°C después de adición de oleato 0,8 mM y 20 μ g/ml de 125 I-LDL. Se lavaron las monocapas 2 veces consecutivamente con PBS que contiene BSA al 0,2%, seguido por 1 lavado con PBS/BSA, y después 2 veces consecutivamente con PBS. Las cantidades de unión, absorción y degradación de 125 I-LDL inducidas por el oleato, se midieron como se ha descrito previamente (Bihain & Yen, 1992, cita anterior). Los resultados se presentan como la media de determinaciones triplicadas.

Como se muestra en la Figura 6, la adición de gOBG3 lleva a un aumento de la actividad de LSR como un receptor de lipoproteínas. La unión y absorción de LDL inducidas por el oleato parecen más afectadas por el gOBG3 en comparación con la degradación. Este aumento de la actividad de LSR podría producir potencialmente un mejor aclaramiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos durante el estado postprandial. De este modo, debería ser eliminada más grasa de la dieta a través del hígado, en lugar de ser depositada en el tejido adiposo.

Este ensayo podría ser usado para determinar la eficacia de un compuesto (o los agonistas o antagonistas) para aumentar o reducir la actividad de LSR (o la absorción, unión y degradación de lipoproteínas a través de otros receptores), y por tanto afecta a la tasa de aclaramiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

50 *Efecto sobre la diferenciación muscular*

Se siembran células C2C12 (línea celular del músculo esquelético murino; ATCC CRL 1772, Rockville, MD) con baja densidad (aproximadamente 15-20%) en DMEM completo (con glutamina, penicilina/estreptomicina, etc) + FCS al 10%. Dos días más tarde tenían una confluencia de 80-90%. En este momento, se cambia el medio a DMEM+suero de caballo al 2% para permitir la diferenciación. Se cambia el medio diariamente. Después de 3-4 días de estar en el suero de caballo al 2%, aparece abundante formación de miotubos aunque el tiempo exacto de diferenciación de las células C2C12 depende de cuánto tiempo han sido sometidas a pases y cómo han sido mantenidas, entre otras cosas.

60 Para ensayar el efecto de la presencia de gACRP30 sobre la diferenciación muscular, se añadió gACRP30 (1 a 2,5 μ g/ml) el día después de la siembra cuando las células estaban todavía en DMEM con FCS al 10%. Dos días después de poner en placas las células (un día después de que fue añadido gACRP30 por primera vez), a aproximadamente 80-90% de confluencia, se cambió el medio a DMEM+ suero de caballo al 2% más gACRP30.

65 Los resultados muestran que la adición de gACRP30 hace que las células empiecen a organizarse dentro de un día después de su adición. Por contraste con la orientación aleatoria de las células no tratadas con gACRP30, las tratadas con gACRP30 se alinearon ellas mismas en relación una con otra. En adición, la diferenciación tuvo lugar sólo 2 días después de tratamiento con gACRP30, en contraste con los 3 a 4 días necesarios en su ausencia.

Efecto sobre la oxidación de los ácidos grasos de las células musculares

Se diferenciaron las células C2C12 en presencia o ausencia de 2 $\mu\text{g/ml}$ de gACRP30 durante 4 días. El día 4, se determinaron las tasas de oxidación del oleato midiendo la conversión de 1- ^{14}C -oleato (0,2 mM) a CO_2 durante 90 min. Las células C2C12 diferenciadas en la presencia de gACRP30 sufren el 40% más de oxidación del oleato que los controles diferenciados en ausencia de gACRP30. Se puede usar este experimento para cribar los fragmentos y péptidos activos así como los agonistas y antagonistas o activadores e inhibidores de los polipéptidos OBG3 y gOBG3.

El efecto de gACRP30 sobre la tasa de oxidación del oleato se comparó en células C2C12 diferenciadas (células del músculo esquelético murino; ATCC, Manassas, VA CRL-1772) y en una línea celular de hepatocitos (Hepa1-6; ATCC, Manassas, VA CRL-1830). Se mantuvieron las células cultivadas según las instrucciones del fabricante. El ensayo de oxidación del oleato se realizó como se ha descrito previamente (Muoi *et al* (1999) *Biochem J* 338; 783-791). En resumen, se mantuvieron los miocitos casi confluentes en medio de diferenciación bajo en suero (DMEM, suero de caballo al 2,5%) durante 4 días, a cuyo tiempo la formación de miotubos llegó a ser máxima. Se mantuvieron los hepatocitos en el mismo medio DMEM suplementado con FCS al 10% durante 2 días. Una hora antes del experimento se separó el medio y se añadió 1 ml de medio de preincubación (MEM, suero de caballo al 2,5%, glucosa 3 mM, glutamina 4 mM, Hepes 25 mM, BSA al 1% libre de FFA, oleato 0,25 mM, gentamicina a 5 $\mu\text{g/ml}$). Al comienzo del experimento de oxidación se añadió ácido oleico marcado con ^{14}C (1 $\mu\text{Ci/ml}$, American Radiolabeled Chemical Inc., St. Louis, MO) y se incubaron las células durante 90 min a 37°C en ausencia/presencia de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de gACRP30. Después del periodo de incubación se separaron 0,75 ml del medio y se ensayaron en cuanto a productos de oxidación marcados con ^{14}C como se describe más adelante para el experimento de oxidación de los FFA en el músculo.

La oxidación del oleato en las células C2C12 determinada a lo largo de 90 min aumentó de forma significativa (39%; $p = 0,036$, test t de dos colas) en las células tratadas con gACRP30. Por contraste, no se observó ningún aumento detectable en la tasa de oxidación de los FFA en los hepatocitos incubados con gACRP30.

Análisis de triglicéridos y proteínas después de oxidación del oleato en células cultivadas

Después de la transferencia del medio para el ensayo de oxidación del oleato, se pusieron las células sobre hielo. Para determinar el contenido de triglicéridos y proteínas, se lavaron las células con 1 ml de 1x PBS para eliminar el medio residual. Se añadieron a cada pocillo 300 μl de solución de disociación de las células (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 10 min. Se taparon las placas para soltar las células, y se añadieron 0,5 ml de 1x PBS. Se transfirió la suspensión celular a un tubo eppendorf, se lavó cada pocillo con 0,5 ml adicionales de 1x PBS, y se transfirió a un tubo eppendorf apropiado. Se centrifugaron las muestras a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron al sedimento de células 750 μl de 1x PBS/chaps al 2%. Se agitó la suspensión celular en vórtex y se puso sobre hielo durante 1 hora. Se centrifugaron entonces las muestras a 13000 rpm durante 20 min a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a un nuevo tubo y se congelaron a 20°C hasta su análisis. Se determinó cuantitativamente el nivel de triglicéridos en cada muestra usando el kit enzimático GPO-TRINDER de Sigma Diagnostics. Se siguió el procedimiento indicado en el manual con las siguientes excepciones: se realizó el ensayo en una placa de 48 pocillos, se ensayaron 350 μl de volumen de muestra, el blanco control consistió en 350 μl de PBS/chaps al 2%, y el estándar contenía 10 μl de estándar proporcionado en el kit más 690 μl de PBS/chaps al 2%. El análisis de las muestras se realizó en un Packard Spectra Count a una longitud de onda de 550 nm. El análisis de proteínas se realizó sobre 25 μl de cada muestra de sobrenadante usando el ensayo de proteínas BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de las muestras se realizó en un Packard Spectra Count a una longitud de onda de 550 nm.

La producción de triglicéridos tanto en las células C2C12 como en las células Hepa 1-6 no cambió de forma significativa en la ausencia/presencia de ACRP30 y gACRP30. El contenido de proteína de todas las células analizadas fue equivalente en ausencia/presencia de ACRP30 y gACRP30.

Ejemplo 5

Efecto de gOBG3 sobre ratones alimentados con una dieta rica en grasas

Se realizan los experimentos usando ratones C57B1/6 de aproximadamente 6 semanas de edad (8 por grupo). Todos los ratones se ponen en jaulas individuales. Se mantienen los ratones con una dieta rica en grasas a lo largo de cada experimento. La dieta rica en grasas (dieta de cafetería; D12331 de Research Diets, Inc) tiene la siguiente composición: kcal de proteínas 16%, kcal de sacarosa 26%, y kcal de grasas 58%. La grasa estaba principalmente compuesta de aceite de cacahuete, hidrogenado.

Una vez que se hubo alimentado a los ratones con una dieta rica en grasas durante 6 días, se insertan bombas microosmóticas usando anestesia de isoflurano, y se usan para administrar a los ratones subcutáneamente (s.c.) durante 18 días gOBG3, OBG3, solución salina, y un péptido irrelevante. El gOBG3 se proporciona a dosis de 50, 25, y 2,5 $\mu\text{g/día}$; el OBG3 se proporciona a 100, 50, y 5 $\mu\text{g/día}$, y el péptido irrelevante se proporciona a 10 $\mu\text{g/día}$. El peso corporal se determina el primero, tercero y quinto día de la dieta rica en grasas, y después diariamente a partir del comienzo del tratamiento. Se toman muestras finales de sangre por punción cardíaca y se usan para determinar los niveles de triglicéridos (TG), de colesterol total (TC), de glucosa, de leptina, y de insulina. Se determina también la cantidad de alimento consumida por día para cada grupo.

ES 2 312 450 T3

En un experimento preliminar, los ratones tratados con 2,5 $\mu\text{g}/\text{día}$ de gOBG3 habían reducido de forma significativa el peso corporal.

Ejemplo 6

Análisis de la actividad relacionada con la obesidad en humanos

Los análisis de la eficacia de gOBG3 en humanos se realizan de acuerdo con las recomendaciones de un médico y con las normas establecidas. Los parámetros analizados en ratones se analizan también en los seres humanos (por ejemplo, ingesta de alimento, peso, TG, TC, glucosa, insulina, leptina, FFA). Es de esperar que los factores fisiológicos presenten cambios a corto plazo. Los cambios en la ganancia de peso podrían requerir un periodo de tiempo más largo. En adición, la dieta necesitará ser vigilada cuidadosamente. El OBG3 globular se debe administrar a dosis diarias de aproximadamente 6 mg de proteína por persona de 70 kg o aproximadamente 10 mg por día. También se pueden ensayar otras dosis, por ejemplo 1 mg o 5 mg al día hasta 20 mg, 50 mg, o 100 mg al día.

Ejemplo 7

Análisis de la actividad relacionada con la obesidad en un modelo murino de diabetes lipoatrófica

Previamente, se había publicado que la leptina invierte la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus en ratones con lipodistrofia congénita (Shimomura *et al.* Nature 401: 73-76 (1999). Se encontró que la leptina era menos eficaz en un modelo de diabetes lipoatrófica de ratón lipodistrófico diferente (Gavrilova *et al.* Nature 403: 850 (2000). Se pueden usar fragmentos de polipéptido OBG3 o gOBG3 para reducir la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en este modelo bien solos o en combinación con leptina, el péptido de leptina (solicitud provisional de Estados Unidos No 60/155.506), u otros compuestos. Los ensayos incluyen el descrito previamente en Gavrilova *et al.* ((2000) Diabetes Nov; 49(11): 1910-6; (2000) Nature Feb 24; 403 (6772): 850) usando ratones A-ZIP/F-1, excepto que el gOBG3 debe ser administrado usando los métodos previamente descritos en el Ejemplo 5 (o en los Ejemplos 8-10). Los niveles de glucosa e insulina de los ratones deben ser analizados, y la ingesta de alimento y el peso del hígado deben ser monitorizados, así como otros factores, tales como los niveles de leptina, FFA, y TG, típicamente medidos en los experimentos de esta invención (véase el Ejemplo 5 anterior, o los Ejemplos 8-10).

Ejemplo 8

Efecto de gOBG-3 sobre los ácidos grasos libres del plasma, en ratones C57 BL/6

Se analizó el efecto de la cabeza globular de acrp-30 sobre la lipemia postprandial (PPL) en ratones C57BL6/J normales. ACRP-30 es otro nombre para adipo Q y es la proteína de ratón homóloga de la proteína humana apm-1. OBG3 es un modo genérico para referirse a todas estas formas. La forma de cabeza globular se indica colocando una "g" delante, por ejemplo g-acrp30 o gOBG3. El gOBG3 usado se preparó mediante digestión proteolítica de OBG3 recombinante como se ha descrito previamente en el Ejemplo 2. Se usó tripsina acetilada como proteasa.

Los ratones usados en este experimento se mantuvieron en ayunas durante 2 horas antes del experimento tras lo cual se tomó una muestra de sangre como línea base. Todas las muestras de sangre fueron tomadas de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (50 μl en cada punto de tiempo). En el tiempo 0 (8:30 AM), se dio a todos los animales por sonda nasogástrica (vol = 1% de peso corporal) una comida estándar rica en grasas (6 g de mantequilla, 6 g de aceite de girasol, 10 g de leche desecada desnatada, 10 g de sacarosa, 12 ml de agua destilada preparada recientemente siguiendo Nb#6, JF, pg.1).

Inmediatamente después de la comida rica en grasas, se inyectaron i.p. 25 μg de gOBG3 en 100 μl de solución salina. Se inyectó de nuevo la misma dosis (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 100 μl) a los 45 min y a 1 h 45 min (grupo tratado, n=8). Los animales testigos (n=8) fueron inyectados con solución salina (3x100 μl). Los animales tratados y no tratados fueron manipulados de modo alternativo.

Se tomaron muestras de sangre a intervalos de una hora, y se pusieron inmediatamente sobre hielo. Se preparó el plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. Se mantuvo el plasma a -20°C y se determinaron los ácidos grasos libres (FFA), los triglicéridos (TG) y la glucosa dentro de las 24 horas usando kits de ensayo estándares (Sigma and Wako). Debido a la cantidad limitada de plasma disponible, se determinó la glucosa por duplicado usando las muestras reunidas. Para cada punto de tiempo, se reunieron volúmenes iguales de plasma de los 8 animales por grupo de tratamiento. Las barras de error mostradas para la glucosa representan por tanto la SD de la determinación por duplicado y no la variación entre animales como para TG y FFA.

Resultados

El aumento de los FFA del plasma, debido a la comida rica en grasas fue significativamente más bajo en los ratones tratados con gOBG3 a todos los puntos de tiempo entre 1 y 4 h. Esto puede ser interpretado como un aumento de la oxidación de los FFA (Fig. 8).

El tratamiento con gOBG3 también llevó a un aumento significativamente más pequeño de los TG del plasma, en comparación con los ratones no tratados. Sin embargo, este efecto fue menos pronunciado que el efecto sobre los FFA (Fig. 9).

- 5 El metabolismo de la glucosa se mejoró significativamente después del tratamiento con gOBG3; este efecto puede ser interpretado como un aumento de la sensibilidad de la insulina posiblemente debido a la reducción de los FFA (Fig. 10).

10 Similares resultados se vieron previamente en un experimento anterior que incluye solo 2 tratamientos (a 0 y a 45 minutos; no se muestran los datos). Se observó un fuerte efecto de reducción de los FFA por el gOBG3 acoplado con un menor efecto de reducción de los TG.

Ejemplo 9

- 15 *Efecto de gOBG-3 sobre la leptina e insulina plasmáticas en ratones C57 BL/6*

Se analizó el efecto de la cabeza globular de acrp-30 sobre los niveles plasmáticos de leptina e insulina durante la lipemia postprandial (PPL) en ratones normales C57BL6/J. El procedimiento experimental fue el mismo que se ha descrito en el Ejemplo 8, excepto que la sangre fue tomada sólo a las 0,2 y 4 horas para poder tener muestras de sangre 20 más grandes que son necesarias para la determinación de leptina e insulina por RIA.

En resumen, 16 ratones fueron mantenidos en ayunas durante 2 horas antes del experimento tras lo cual se tomó una muestra de sangre como línea base. Todas las muestras de sangre fueron tomadas de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (100 μ l en cada punto de tiempo). En el tiempo 0 (9:00 AM), se administró a todos los 25 animales por sonda nasogástrica (vol = 1% de peso corporal) una comida estándar rica en grasas (véase el Ejemplo 8). Inmediatamente después de la comida rica en grasas, se inyectaron i.p. 25 μ g de gOBG3 en 100 μ l de solución salina. Se inyectó de nuevo la misma dosis (25 μ g/ml en 100 μ l) a los 45 min y a 1 h 45 min (grupo tratado, n=8). Los animales testigos (n=8) fueron inyectados con solución salina (3x100 μ l). Los animales tratados y no tratados fueron manipulados de modo alternativo.

30 Las muestras de sangre se pusieron inmediatamente sobre hielo y se preparó el plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. Se mantuvo el plasma a -20°C y se determinaron los ácidos grasos libres (FFA) antes de 24 horas usando un kit estándar de ensayo (Wako). Se determinaron la leptina e insulina por RIA (ML-82K y SRI-13K, LINCO Research, Inc., St. Charles, MO) siguiendo el protocolo del fabricante. Sin embargo, se usaron solamente 35 20 μ l de plasma. Se hizo cada determinación por duplicado. Debido a la limitada cantidad de plasma disponible, se determinaron la leptina y la insulina en 4 conjuntos de 2 animales cada uno, en ambos grupos de tratamiento.

Resultados

- 40 Como se ha mostrado previamente (Ejemplo 8), el tratamiento con gOBG3 redujo de forma significativa el aumento postprandial de los FFA del plasma, causado por la comida rica en grasas a las 2 horas (Fig. 11). No hubo ningún cambio significativo en los niveles de leptina del plasma, a ningún punto de tiempo; el tratamiento con gOBG3 no afectó a los niveles de leptina (Fig. 12). Los niveles de insulina (Fig. 13) indican un aumento marginal de la insulina a las 2 horas. Sin embargo, cuando se analizó como porcentaje de cambio desde t_0 , este aumento (212% vs. 260%, 45 testigo vs. tratado) no fue estadísticamente significativo ($p = 0,09$).

Estos datos reafirman la aceleración previamente mostrada del metabolismo de los FFA por tratamiento con gOBG3. También demuestran que el gOBG3 no afecta a los niveles de leptina e insulina del plasma, y que el gOBG3 reduce la hiperglucemia durante la lipemia postprandial y también induce la pérdida de peso durante el tratamiento a 50 lo largo de varios días. Sin estar limitado por ninguna teoría particular, los datos sugieren: a) que la reducción de peso es causada por un aumento del metabolismo independiente de la leptina; y b) que el gOBG3 lleva a un aumento de la sensibilidad a la insulina.

Ejemplo 10

- 55 *Efecto de OBG-3 sobre los FFA, TG y glucosa del plasma, en ratones C57 BL/6*

Se ha descrito el efecto de la cabeza globular de acrp30 sobre los niveles plasmáticos de FFA, TG, glucosa, leptina e insulina durante la lipemia postprandial (PPL) en ratones C57BL6/J normales. También se ha demostrado la pérdida 60 de peso que resulta a partir del gOBG3 (2,5 μ g/día) administrado a ratones C57BL6/J normales con una dieta rica en grasas (Ejemplo 5). En comparación, se necesitó una dosis mucho más alta de la forma completa de acrp30 (200 μ g/día) para inducir un efecto relativamente más pequeño en los ratones. Este ejemplo demuestra el efecto de la forma completa de acrp30 sobre los niveles plasmáticos de FFA, TG y glucosa.

65 El procedimiento experimental fue similar al descrito en el Ejemplo 8. En resumen, 14 ratones fueron mantenidos en ayunas durante 2 horas antes del experimento tras lo cual se tomó una muestra de sangre como línea base. Todas las muestras de sangre fueron tomadas de la cola usando tubos capilares recubiertos con EDTA (50 μ l en cada punto de tiempo). Al tiempo 0 (9:00 AM), se administró a todos los animales por sonda nasogástrica (vol = 1% de peso

corporal) una comida estándar rica en grasas (véase el Ejemplo 8). Inmediatamente después de la comida rica en grasas, se inyectaron i.p. 4 ratones con 25 μg de OBG3 en 100 μl de solución salina. Se inyectó de nuevo la misma dosis (25 μg en 100 μl) a los 45 min y a 1 h 45 min. Un segundo grupo de tratamiento (n=4) recibió 3 veces 50 μg de OBG3 a los mismos intervalos. Los animales testigos (n=6) fueron inyectados con solución salina (3x100 μl). Los animales tratados y no tratados fueron manipulados de modo alternativo.

Las muestras de sangre se pusieron inmediatamente sobre hielo. Se preparó el plasma por centrifugación después de cada punto de tiempo. Se mantuvo el plasma a -20°C y se determinaron los ácidos grasos libres (FFA), los triglicéridos (TG) y la glucosa dentro de las 24 horas usando kits de ensayo estándares (Sigma and Wako).

Resultados

El tratamiento con OBG3 de longitud completa no tuvo ningún efecto sobre los niveles de FFA del plasma (Fig. 14) excepto durante $t = 2$ horas cuando se demostró una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$). No se observó ningún cambio significativo en los niveles postprandiales de TG (Fig. 15) y de glucosa (Fig. 16) en los animales tratados.

Los datos presentados demuestran que la forma completa de OBG3 no redujo los niveles de FFA, TG y glucosa en contraste con lo que se observó para la región globular (Ejemplos 5, 8, 9). Solamente a las 2 horas después de la administración por sonda nasogástrica, el tratamiento con OBG3 redujo las concentraciones plasmáticas de FFA de forma significativa ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que gOBG3 es mucho más activo *in vivo* que la proteína de longitud completa. Se observó un efecto similar para la reducción del peso corporal; la cabeza globular fue mucho más activa que la proteína de longitud completa.

Ejemplo 11

Efecto de gACRP30 sobre los FFA después de inyección de epinefrina

En los ratones, los ácidos grasos libres del plasma, aumentaron después de la administración intragástrica de una comida de ensayo rica en grasas/sacarosa. Estos ácidos grasos libres son producidos en su mayor parte por la actividad de las enzimas lipolíticas, esto es, lipoproteína-lipasa (LPL) y lipasa hepática (HL). En estas especies, estas enzimas se encuentran en cantidades significativas tanto unidas al endotelio como circulando libremente en el plasma¹⁶. Otra fuente de ácidos grasos libres del plasma, es la hormona sensible lipasa (HSL) que libera ácidos grasos libres a partir del tejido adiposo después de estimulación β -adrenérgica. Para analizar si gACRP30 regula también el metabolismo de los ácidos grasos libres liberados por HSL, se inyectaron los ratones con epinefrina.

Dos grupos de ratones (n=5 cada uno) recibieron epinefrina (5 μg) por inyección intraperitoneal. Un grupo tratado fue inyectado con gACRP30 (25 μg) una hora antes y de nuevo junto con epinefrina, mientras que los animales testigos recibieron solución salina. Se aisló el plasma y se midieron los ácidos grasos libres y la glucosa como se ha descrito antes (Ejemplo 10). Como se muestra en la Fig. 18, las inyecciones de epinefrina (5 μg) causaron un incremento en los ácidos grasos libres y en la glucosa del plasma. Ambos efectos se redujeron de forma significativa en los ratones tratados con gACRP30.

Esta reducción en el aumento de los niveles de glucosa y FFA no fue debida al bloqueo del efecto β -adrenérgico de la epinefrina, como se demuestra induciendo la liberación de los FFA a partir del tejido adiposo aislado *in vitro*. En estos estudios control, se separó el tejido adiposo de los ratones C57BL/6J normales y se incubó en tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit. Se añadió epinefrina y se determinó la concentración de los FFA en el medio después de una incubación de 90 min. La epinefrina (10 μM) produjo un aumento de 1,7 veces en los ácidos grasos libres en el medio. Las concentraciones crecientes de gACRP30 o ACRP30 hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no inhibieron este efecto de la epinefrina.

Los datos presentados hasta ahora indican que la región globular de ACRP30 ejerce profundos efectos farmacológicos sobre el metabolismo de sustratos de energía con el efecto más evidente sobre los ácidos grasos libres del plasma. Además, la reducción de la concentración de los FFA del plasma, no se puede explicar ni por la inhibición de LPL-esto causaría un aumento de los triglicéridos del plasma, mientras que realmente se observa una reducción de los triglicéridos en el plasma -ni por inhibición de HSL. Por lo tanto, la explicación más sencilla es que el gACRP30 causa un aumento de la separación de los ácidos grasos libres de la circulación mediante la promoción de la absorción celular.

Ejemplo 12

Efecto de gACRP30 sobre la oxidación de los FFA en el músculo

Para investigar el efecto de gACRP30 sobre la oxidación de los ácidos grasos libres en el músculo, se aislaron músculos intactos de las extremidades traseras de ratones C57BL/6J y se midió la oxidación de los FFA usando oleato como sustrato (Clee *et al* (2000) J Lipid Res 41:521-531; Muoio *et al* (1999) Am J Physiol 276: E913-921). La oxidación del oleato en el músculo aislado se midió como se ha descrito previamente (Cuendet *et al* (1976) J Clin Invest 58:1078-1088; LeMarchand-Brustel (1978) Am J Physiol 234:E348-E358). En resumen, se sacrificaron

los ratones mediante dislocación cervical y se aislaron rápidamente los músculos sóleo y EDL de las extremidades traseras. El tendón distal de cada músculo se ató a una pieza de sutura para facilitar la transferencia entre diferentes medios. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C en 1,5 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit (NaCl 118,6 mM, KCl 4,76 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, MgSO₄ 1,19 mM, CaCl₂ 2,54 mM, NaHCO₃ 25 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) suplementado con seroalbúmina bovina al 4% libre de FFA (fracción V, grado RIA, Sigma) y glucosa 5 mM (Sigma). La concentración total de oleato (Sigma) a lo largo del experimento fue 0,25 mM. Todos los medios fueron oxigenados (O₂ al 95%; CO₂ al 5%) antes de la incubación. La mezcla de gas fue hidratada a lo largo del experimento haciendo burbujear a su través un lavador de gas (Kontes Inc., Vineland, NJ).

Se lavaron los músculos durante 30 min en medio de incubación con oxigenación. Se transfirieron entonces los músculos a medio fresco (1,5 ml) y se incubaron a 30°C en la presencia de 1 µCi/ml de [1-¹⁴C]ácido oleico (American Radiolabeled Chemicals). Los viales de incubación que contienen este medio se sellaron con un séptum de goma del cual se suspendió un pocillo central que lleva una pieza de papel Whatman (1,5 cm x 11,5 cm).

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

Después de 5 min, se separó el músculo del medio, y se separó también una alícuota de 0,5 ml del medio. Se cerraron los viales de nuevo y se inyectó 1 ml de ácido perclórico al 35% con una jeringa hasta el medio penetrando a través del séptum de goma. Se recogió el CO₂ liberado del medio acidificado mediante Solvable en el pocillo central. Después de un periodo de recogida de 90 min a 30°C, se separó el papel Whatman del pocillo central y se puso en viales de centelleo que contienen 15 ml de fluido de centelleo (HionicFlour, Packard Instruments, Meriden, CT). La cantidad de radioactividad ¹⁴C se cuantificó por conteo de centelleo líquido. La tasa de oxidación del oleato se expresó como nmol de oleato producido en 90 min/g de músculo.

Para analizar el efecto de gACRP30 o ACRP30 sobre la oxidación del oleato, se añadieron estas proteínas al medio a una concentración final de 2,5 µg/ml y se mantuvieron en el medio a lo largo del procedimiento.

Se analizaron dos músculos de diferente capacidad oxidativa (sóleo y extensor digitorum longus (EDL)) (Fig. 19). Se aislaron los músculos EDL y sóleo de ambas patas de ratones C57BL/6J normales (n=18). Se incubó un músculo de cada par en medio con 2,5 µg/ml de gACRP30 (gris oscuro) y el otro en medio sin gACRP30 (testigo-gris claro). Este diseño experimental permitió comparar la oxidación del oleato en pares de músculos aislados del mismo animal. Se determinó la oxidación de C-oleato a lo largo de 90 minutos. La incubación de los músculos EDL y sóleo durante 90 minutos en medio que contiene 2,5 µg/ml de gACRP30 lleva a un aumento estadísticamente significativo en la oxidación del oleato (p<0,05, t-Test apareado, una cola) o (p=0,0041, análisis de varianza de medidas repetidas, tests univariados de hipótesis para efectos dentro del sujeto) en ambos tipos de músculos.

Ambos tipos de músculos mostraron una respuesta significativa a gACRP30. El aumento relativo en la oxidación de los FFA fue del 17% (p=0,03) y del 10% (p=0,04) para EDL y sóleo, respectivamente. En los seres humanos, los músculos representan aproximadamente el 25% del peso corporal. Por tanto, incluso un aumento moderado en la oxidación de los ácidos grasos libres puede tener consecuencias cuantitativamente importantes sobre la utilización global de energía.

Ejemplo 13

Efecto de gAcrp30 sobre los triglicéridos en músculo e hígado aislados de ratones

Para determinar si el aumento de la oxidación de los FFA inducido por gACRP30 va acompañado también por un aumento de la liberación de los FFA en el músculo o en el hígado, se midió el contenido de triglicéridos en el músculo de la pata trasera y en el hígado después de tratamiento de los ratones con gACRP30. Se separaron muestras de los músculos de la pata trasera así como del hígado de los animales tratados y no tratados y se determinó la concentración de triglicéridos y ácidos grasos libres siguiendo un método estándar de extracción de lípidos (Shimabukuro *et al* (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4637-4641) seguido por análisis de TG y FFA usando kits estándar de ensayo.

El tratamiento a corto plazo de los animales con gACRP30 (2 inyecciones de 25 µg cada una administradas dentro de las 3 horas antes del sacrificio) no cambió el contenido de triglicéridos ni del músculo de la pata trasera ni del tejido del hígado (no se muestran datos). Sin embargo, después de 3 días de tratamiento, durante cuyo periodo los ratones C57BL/6J normales consumieron una dieta normal de roedores, los ratones que habían recibido 25 µg de gACRP30 dos veces al día mostraron un contenido significativamente más alto (p=0,002) de triglicéridos en el músculo (Fig. 20A) que los que recibieron solución salina (testigo: gris claro; gACRP30: gris oscuro). Esto estuvo en contraste con una falta de aumento de los triglicéridos en el hígado (Fig. 20B). Además, no se observó un aumento detectable en los TG del músculo después del día 16 de tratamiento demostrado independientemente por medida directa del contenido de TG en el músculo tiñendo con rojo oleoso O las secciones del microscopio congeladas. En resumen, los datos indican que el aumento del contenido de TG fue transitorio.

Estos datos son consistentes con la idea de que el gACRP30 aumenta la tasa de separación de los ácidos grasos libres del plasma al menos parcialmente al aumentar su liberación al músculo; muchos de los FFA son oxidados inmediatamente mientras que algunos se almacenan como triglicéridos y son oxidados posteriormente. Se obtuvo un soporte adicional para esta interpretación midiendo la concentración de cuerpos cetónicos en el plasma de animales tratados y no tratados después de una comida rica en grasas/sacarosa.

Los cuerpos cetónicos (KB) se producen en el hígado como resultado de la oxidación de los ácidos grasos libres, pero la formación de KB no ocurre de forma significativa en el músculo. En los ratones que reciben la comida de ensayo rica en grasas y la inyección de solución salina, el nivel de KB del plasma, aumentó de forma significativa a lo largo de las 3 horas siguientes ($183 \pm 12\%$, $n=6$). Los animales tratados con gACRP30, por otro lado, no mostraron aumento de las concentraciones de KB del plasma. Por lo tanto, el gACRP30 inhibe o bien directamente la formación de KB o puede reducir la producción de KB inhibiendo la oxidación de los FFA en el hígado.

Ejemplo 14

Efecto de gACRP30 sobre la ganancia de peso y la pérdida de peso de los ratones

Dos estudios independientes demostraron que el gACRP30 también afecta a la homeostasis global de la energía. En el primero, se administró a ratones C57BL/6J machos de 10 semanas de edad una dieta purificada muy rica en grasas/sacarosa durante 19 días para promover la ganancia de peso (véase el Ejemplo 5); la media de peso corporal en este momento fue de 30 g. Se implantó entonces quirúrgicamente a los ratones una bomba osmótica (Alzet, Newark, DE) que libera 2,5 $\mu\text{g}/\text{día}$ de gACRP30, o 5 $\mu\text{g}/\text{día}$ de ACRP30, o solución salina fisiológica. Se mantuvieron los ratones con la dieta rica en grasas y se registró su peso corporal a lo largo del siguiente periodo de 10 días.

Los ratones tratados con solución salina o con 5 $\mu\text{g}/\text{día}$ de ACRP30 de longitud completa continuaron ganando peso a un ritmo medio diario de 0,16% y 0, 22%, respectivamente. Por contraste, los ratones tratados con gACRP30 experimentaron una reducción de peso significativa (-3,7%, $p = 0,002$) durante los primeros 4 días y después su peso permaneció constante (Fig. 21A). Por lo tanto, en esta cepa endogámica de ratones normales, una infusión continua de una dosis diaria baja de gACRP30 puede prevenir la ganancia de peso causada por una alimentación rica en grasas/sacarosa, de un modo sostenible.

Se confirmó este resultado y se extendió en un segundo estudio realizado en ratones C57BL/6J machos obesos, maduros, de 9 meses de edad, que habían recibido la misma dieta rica en grasas/sacarosa durante 6 meses; el peso corporal medio cuando empezó el estudio era $52,5 \pm 0,8$ g. Se trataron tres grupos de 8 ratones con solución salina, ACRP30 o gACRP30 durante 16 días. Los animales en el grupo tratado recibieron dos veces al día 25 μg de proteína subcutáneamente. Se registraron los pesos corporales en los puntos de tiempo indicados.

El tratamiento con gACRP30 llevó a una pérdida de peso significativa ($p < 0,05$) el día 3. Este efecto se hizo aún más significativo cuando continuó el estudio. Durante el periodo de estudio de 16 días, los ratones C57BL/6J obesos que recibieron gACRP30 perdieron aproximadamente 8% ($p=0,001$) de su peso corporal inicial a pesar del hecho de haber sido mantenidos con una dieta rica en grasas/sacarosa (Fig. 21B). Los animales tratados con solución salina sólo presentaron fluctuaciones marginales en su peso corporal ($p = \text{n.s.}$). Los animales tratados con ACRP30 de longitud completa, pero a una dosis 10 veces más alta que la usada en el primer experimento, también perdieron peso significativamente (-3,2%, $p=0,025$). De modo interesante, los ratones tratados con gACRP30 continuaron perdiendo peso a un ritmo constante durante el periodo de 16 días del estudio, mientras que el ritmo de reducción de peso en los tratados con el ACRP30 de longitud completa disminuyó durante la última fase del estudio. El consumo de alimentos en los animales tratados con gACRP30 no fue significativamente diferente del de los animales tratados con solución salina o con ACRP30 (Fig. 21D).

El tratamiento con gACRP30 causó una reducción significativa en la concentración de ácidos grasos libres en el plasma (Fig. 21C). Este efecto fue significativo después de 3 días de tratamiento ($p<0,05$ vs. solución salina) y continuó a lo largo del periodo completo del estudio. Se muestra el nivel de los FFA en el plasma el día 16 del estudio. La concentración inicial de FFA en el plasma fue la misma en los tres grupos de tratamiento. Se debe observar, sin embargo, que a pesar de esta reducción la concentración de los ácidos grasos libres en el plasma de estos animales masivamente obesos permanece aproximadamente 40-60% más alta que la de los ratones normales. Un análisis químico de la sangre (incluyendo determinación de SGPT, SGOT, urea, creatinina o bilirrubina) realizado sobre las muestras terminales de sangre no reveló ningún parámetro anormal en el plasma (Fig. 22).

Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó típicamente usando o la prueba t de Student no pareada o la prueba t de Student pareada, como se indica en cada estudio.

Ejemplo 15

Detección del fragmento APM-1 (gOBG3) en el plasma humano después de inmunoprecipitación

La forma recombinante de la proteína ACRP30 usada tiene un peso molecular aparente de 37 kDa y forma un dímero de 74 kDa (Fig. 23A, pista II). Se generó un fragmento proteolítico que contiene la región completa de la cabeza globular (gACRP30) y que migra con un peso molecular aparente de 18 kDa usando tripsina acetilada (Fig. 23A, pista I). Ambas preparaciones de proteína (ACRP30 y gACRP30) estaban esencialmente libres de endotoxina; se usaron columnas de afinidad ActiClean Etox (Sterogen Bioseparations Inc., Carlsbad, CA) para separar contaminaciones potenciales de endotoxina siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles de endotoxina se determinaron por Endosafe, Charleston, SC. Como se determina por la secuenciación en N-terminal de gACRP30 purificado, el sitio de escisión estaba justo antes del aminoácido 104 (justo antes del aminoácido 101 para gOBG3 o APM1 humanos).

La inmunoprecipitación de Apm1 en el plasma humano seguida por transferencia Western se utilizó para detectar un producto de escisión de apm-1, el homólogo humano de ACRP30, usando un anti-suero específico de la cabeza globular para la etapa de inmunoprecipitación así como para la etapa de detección. El suero preinmune o el suero preparado frente al dominio de la cabeza globular o región no-homóloga humana (HDQETTTQGPVLLPLPKGA) se reticularon con la proteína A (Sigma Chemical CO, Saint Louis, MO) usando dimetil-pimelimidato-dihidrócloruro (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO). Después de lavado (sal 0,2 M) se eluyeron las proteínas a partir de la proteína A, se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa pura Protran® (Schleicher and Schuell, Keene, NH) usando procedimientos estándar. Los productos Apm-1 se visualizaron usando anticuerpos del dominio de la cabeza globular marcados con biotina; kit de peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina y sustrato de CN/DAB (Pierce, Rockford, IL) según las instrucciones del fabricante.

El peso molecular aparente de esta forma truncada fue 27 kDa, que corresponde a aproximadamente 70% de la forma completa de apm-1 (Fig. 23B, pista IV). Esta forma truncada no fue detectable cuando se realizó la inmunoprecipitación usando un anticuerpo diferente dirigido frente a la región no-homóloga humana (HDQETTTQGPVLLPLPKGA) de apm-1; este dominio está localizado hacia el extremo del terminal NH₂ de la proteína fuera del dominio globular (Fig. 23, pista V). Ambos anticuerpos anti-apm-1 dirigidos frente al dominio globular o el dominio no globular identificaron la forma de la proteína de longitud completa, así como una baja abundancia de dímero de MW aparente de 74 kDa.

Ejemplo 16

Efecto de gACRP30 sobre los FFA después de una inyección de Intralipid

Se inyectaron intravenosamente (vena caudal) dos grupos de ratones (n=5 cada uno) con 30 µl en embolada de Intralipid al 20% (Clintec) para generar una subida rápida de los FFA del plasma, evitando de este modo la absorción intestinal. (Intralipid es una emulsión de grasa intravenosa usada en terapia nutricional). Se inyectó un grupo tratado (♦ tratado con gACRP30) con gACRP30 (25 µg) a los 30 y 60 minutos antes de la administración de Intralipid, mientras que los animales testigos (▲ testigo) recibieron solución salina. Se aisló el plasma y se midieron los FFA como se ha descrito previamente.

Después se monitorizó el efecto de gACRP30 sobre la caída de los FFA en el plasma después del pico inducido por la inyección de Intralipid. Como se muestra en la Fig. 24, el gACRP30 acelera la separación de los FFA del plasma después de la inyección de Intralipid. Por lo tanto, el gACRP30 acelera el aclaramiento de los FFA sin interferir con la absorción intestinal. Aunque sin desear que sea limitada por ninguna teoría, debido a que el Intralipid no produce una respuesta significativa a la insulina, los resultados indican también que la regulación por gACRP30 del metabolismo de los FFA tiene lugar independientemente de la insulina.

Referencias

Dehouck et al. *J Neurochem* 54: 1798-801, 1990.

1. **Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F.** A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-26749 (1995).

2. **Shapiro, L. & Scherer, P. E.** The crystal structure of a complement-lq family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8,335-338 (1998).

3. **Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-10703 (1996).

4. **Maeda, K. et al.** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apMI (AdiPose Most abundant Gene transcript1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286289 (1996).

5. **Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N. H., Mazda, T. & Omita, M.** Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem (Tokyo)* 120, 803-812 (1996).

6. **Kishore, U. & Reid, K. B.** Modular organization of proteins containing Clq-like globular domain. *Immunopharmacology* 42, 15-21 (1999).

7. **Kavety, B. & Morgan, J.I.** Characterization of transcript processing of the gene encoding precerebellin-1. *Brain Res Mol Brain Res* 63, 98-104 (1998).

8. **Satoh, F. et al.** Cerebellin and cerebellin mRNA in the human brain, adrenal glands and the tumour tissues of adrenal tumour, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *J Endocrinol* 154, 2734 (1997).

9. **Mazzocchi, G. et al.** Cerebellin enhances *in vitro* secretory activity of human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 632-635 (1999).

10. **Kondo, N. & Kondo, J.** Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. *J Biol Chem* 267, 473-478 (1992).

11. **Takamatsu, N., Ohba, K., Kondo, J., Kondo, N. & Shiba, T.** Hibernation-associated gene regulation of plasma proteins with a collagen-like domain in mammalian hibernators. *Mol Cell Biol* 13, 1516-1521 (1993).

12. **Spiegelman, B. M. & Hotamisligil, G. S.** Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell* 73, 625-627 (1993).

13. **Saito, K. et al.** Regulation of gelatin-binding protein 28 (GBP28) gene expression by C/EBP. *Biol Pharm Bull* 22, 1158-1162 (1999).

14. **Takamatsu, N. et al.** Expression of multiple alpha1-antitrypsin-like genes in hibernating species of the squirrel family. *Gene* 204, 127-132 (1997).

15. **Ross, S. R., Graves, R. A. & Spiegelman, B. M.** Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 7, 1318-1324 (1993).

16. **Moitra, J. et al.** Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 12, 3168-3181 (1998).

17. **Clee, S. M. et al.** Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J Lipid Res* 41, 521-531 (2000).

18. **Muoio, D. M., Dohm, G. L., Tapscott, E. B. & Coleman, R.A.** Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. *Am J Physiol* 276, E913-921 (1999).

19. **Peters, S. J., Dyck, D. J., Bonen, A. & Spriet, L. L.** Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle. *Am J Physiol* 275, E300-309 (1998).

20. **Rigotti, A., Acton, S.L. & Krieger, M.** The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270, 16221-16224 (1995).

21. **Hirsch, D., Stahl, A. & Lodish, H. F.** A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8625-8629 (1998).

22. **Hotamisligil, G. S. et al.** IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668 (1996).

23. **Peraldi, P. & Spiegelman, B.** TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem* 182, 169-175 (1998).

24. **Kirchgessner, T. G., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S.** Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 100, 2777-2782 (1997).

25. **Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S.** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610-614 (1997).

26. **Jensen, D. R. et al.** Prevention of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing skeletal muscle lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 273, R683-689 (1997).

27. **Levak-Frank, S. et al.** Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest* 96, 976-986 (1995).

28. **Scheja, L. et al.** Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-I-mice. *Diabetes* 48, 1987-1994 (1999).

29. **Griffin**, M. E. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270-1274 (1999).

30. **Dresner**, A. *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-259 (1999).

31. **Kelley**, D. E., **Goodpaster**, B., **Wing**, R. R. & **Simoneau**, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277, E1130-1141 (1999).

32. **Roden**, M. *et al.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97, 2859-2865 (1996).

33. **Cuendet**, G. S., **Loten**, E. G., **Jeanrenaud**, B. & **Renold**, A. E. Decreased basal, noninsulin-stimulated glucose uptake and metabolism by skeletal soleus muscle isolated from obese-hyperglycemic (oblob) mice. *J Clin Invest* 58, 1078-1088 (1976).

34. **Le Marchand-Brustel**, Y., **Jeanrenaud**, B. & **Freychet**, P. Insulin binding and effects in isolated soleus muscle of lean and obese mice. *Am J Physiol* 234, E348-E358 (1978).

35. **Shimabukuro**, M. *et al.* Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4637-4641 (1997).

REIVINDICACIONES

1. El uso de un fragmento globular de OBG3, en el que el fragmento globular de OBG3 se selecciona del grupo que consiste en:

(i) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6, o

(ii) una variante de cualquiera de los fragmentos globulares de OBG3 que tienen una o más sustituciones permisivas de aminoácidos, en la que cada una de dichas sustituciones permisivas de aminoácidos es una sustitución conservadora de aminoácidos, en la que la variante tiene al menos una pero no más de 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos; o

(iii) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6; ligados a polietilenglicol o en la forma de un péptido de fusión IgG Fc;

causando el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) un cambio en al menos uno de los parámetros seleccionados entre lipemia post-prandial, nivel de ácidos grasos libres, nivel de triglicéridos, nivel de glucosa, oxidación de los ácidos grasos libres, o peso, siendo comparable el cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) a un cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (i), para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno relacionado con la obesidad.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con la obesidad se selecciona entre obesidad, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad ateromatosa, cardiopatía, hipertensión, ictus, síndrome X, diabetes no dependiente de la insulina, y diabetes tipo II.

3. El uso de un fragmento globular de OBG3, en el que el fragmento globular de OBG3 se selecciona del grupo que consiste en:

(i) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6, o

(ii) una variante de cualquiera de los fragmentos globulares de OBG3 que tienen una o más sustituciones permisivas de aminoácidos, en la que cada una de dichas sustituciones permisivas de aminoácidos es una sustitución conservadora de aminoácidos, en la que la variante tiene al menos una pero no más de 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos; o

(iii) aminoácidos 104 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 111 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 135 a 247 de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6, y aminoácidos 132 a 244 de la SEQ ID NO: 6; ligados a polietilenglicol o en la forma de un péptido de fusión IgG Fc;

causando el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) un cambio en al menos uno de los parámetros seleccionados entre lipemia post-prandial, nivel de ácidos grasos libres, nivel de triglicéridos, nivel de glucosa, oxidación de los ácidos grasos libres, o peso, siendo comparable el cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (ii) o (iii) a un cambio causado por el fragmento globular de OBG3 de (i), para la preparación de un medicamento para la reducción de la masa corporal o prevención de ganancia de peso.

4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha sustitución conservadora de aminoácidos es:

(a) el reemplazamiento de un aminoácido con otro aminoácido, en el que el aminoácido a ser reemplazado se selecciona entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Phe, y es reemplazado con otro de dichos aminoácidos alifáticos;

(b) el intercambio de los restos hidroxilo Ser y Thr;

(c) el cambio de los restos ácidos Asp y Glu;

(d) la sustitución entre los restos amida Asn y Gln;

ES 2 312 450 T3

(e) el cambio de los restos básicos Lys y Arg; o

(f) el reemplazamiento de un resto aminoácido aromático con otro resto aminoácido aromático, en el que el aminoácido Phe se reemplaza con Tyr, o el aminoácido Tyr se reemplaza con Phe.

5

5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fragmento globular de OBG3 tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 101 a 244 de la SEQ ID NO: 6.

10

6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento globular de OBG3 tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 108 a 244 de la SEQ ID NO: 6.

7. El uso según una cualquiera de reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento globular de OBG3 o variante es un homotrímero.

15

8. El uso según una cualquiera de reivindicaciones 1 a 7, en el que el fragmento globular de OBG3 o variante tiene un enlace peptídico modificado, que es resistente a la proteólisis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 312 450 T3

	10	20	30	
1	M L L L G A V L L L L A L P G H D Q E - - - T T T Q G P G V			apmlprotein _a
1	M L L L Q A L L F L L I L P S H A E D D V T T T E E L A P A			adipoQprotein _a
1	M L L L Q A L L F L L I L P S H A E D D V T T T E E L A P A			acrp30protein _{a2}
	40	50	60	
28	L L P L P K G A C T G W M A G I P G H P G H N G A P G R D G			apmlprotein _a
31	L V P P P K G T C A G W M A G I P G H S G H N G T P G R D G			adipoQprotein _a
31	L V P P P K G T C A G W M A G I P G H P G H N G T P G R D G			acrp30protein _{a2}
	70	80	90	
58	R D G T P G E K G E K G D P G L L G P K G D I G E T G V P G			apmlprotein _a
61	R D G T P G E K G E K G D S G L L G P K G E T G D V G M T G			adipoQprotein _a
61	R D G T P G E K G E K G D A G L L G P K G E T G D V G M T G			acrp30protein _{a2}
	100	110	120	
88	A E G P R G F P P G I Q G R K G E P G E G A Y V Y R S A F S V			apmlprotein _a
91	A E G P R G F P P G T P G R K G E P G E A A Y V Y R S G F S V			adipoQprotein _a
91	A E G P R G F P P G T P G R K G E P G E A A Y M Y R S A F S V			acrp30protein _{a2}
	130	140	150	
118	G L E T Y V T I P N M P I R F T K I F Y N Q Q N H Y D G S T			apmlprotein _a
121	G L E T R V T V P N V P I R F T K I F Y N Q Q N H Y D N S T			adipoQprotein _a
121	G L E T R V T V P N V P I R F T K I F Y N Q Q N H Y D G S T			acrp30protein _{a2}
	160	170	180	
148	G K F H C N I P G L Y Y F A Y H I T V Y M K D V K V S L F K			apmlprotein _a
151	G K F Y C N I P G L Y Y F S Y H I T V Y M K D V K V S L F K			adipoQprotein _a
151	G K F Y C N I P G L Y Y F S Y H I T V Y M K D V K V S L F K			acrp30protein _{a2}
	190	200	210	
178	K D K A M L F T Y D Q Y Q E N N V D Q A S G S V L L H L E V			apmlprotein _a
181	K D K A V L F T Y D Q Y Q E K N V D Q A S G S V L L H L E V			adipoQprotein _a
181	K D K A V L F T Y D Q Y Q E K N V D Q A S G S V L L H L E V			acrp30protein _{a2}
	220	230	240	
208	G D Q V W L Q V Y G E G E R N G L Y A D N D N D S T F T G F			apmlprotein _a
211	G D Q V W L Q V Y G D G D H N G L Y A D N V N D S T F T G F			adipoQprotein _a
211	G D Q V W L Q V Y G D G D H N G L Y A D N V N D S T F T G F			acrp30protein _{a2}
	238			
238	L L Y H D T N .			apmlprotein _a
241	L L F H D T - N			adipoQprotein _a
241	L L Y H D T - N			acrp30protein _{a2}

FIG 1

GTTGTGACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGT
 GCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCGCCGACATCAT
 AACGGTTCTGGCAAAATATTCGAAATGAGCTGTTGAACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAAATTGTGAGCGGA
 TAACAATTTTACACAGGAAACAGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACTGCTCTTTAACAATTTATCAGACAATCTGT
 GTGGGCACTCGACCGGAATTATTCGATTAACTTTATTATTAATAAATTAAAGAGGTATATTAATGTATCGATTAAATAAG
 GAGGAATAAACCATGGGGGGTCTCATCATCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATGGGTCG
 GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGAGTCATGCCGAAGATGACGTTACTACAACCTGAAGAGCTAGCTCCTGCTT
 TGGTCCCTCCACCAAGGGAACCTTGTGCAGGTTGGATGGCAGGCATCCAGGACATCCTGGCCACATGGCACACCAGGC
 CGTGATGGCAGAGATGGCACTCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAGGAGATGCAGGTCCTTCTTGGTCTTAAGGGTGAGACAGG
 AGATGTTGSAATGACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGGAGAGCCTGGAGAAGCCG
 CTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCACTGTGGGGCTGGAGACCCGCGTCACTGTTCCCAATGTACCCATTCGCTTTAGTAAG
 ATCTTCTACAACCAACAGAATCATTATGACGGCAGCACTGGCAAGTTCTACTGCAACATTCGGGACTCTACTACTTCTC
 TTACCACATCAGGTTGATCATGAAAGATGTGAAGGTGAGCCTCTTCAAGAAAGGACAAGGCCGTTCTCTTCACTACGACC
 AGTATCAGGAAAAGATGTGGACAGGCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCCATCTGGAGGTGGGAGACCAAGTCTGGCTCCAG
 GTGTATGGGGATGGGGACCACAATGGACTCTATGCAGATAACGTCAACGACTCTACATTTACTGGCTTTCTTCTCTACCA
 TGATACCACTGACTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATATGGGAATTCGAAGCTTGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGAT
 TTTGAGCTGTATACAGATTAAATCAGAACCGAGAAGCGGTCTGATAAAAAGAAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGG
 TCCCACCTGACCCCACTCAGAACTCAGAAGTGAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATCCGAGAGTA
 GGGAACTGCCAGGATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAGACTGGGCCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCTGTA
 ACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGA
 CGCCCGCATAAACTGCCAGGATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGATGGCCTTTTTCGCTTTCTACAACTCT
 TTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
 AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTTCCTTCTGCTTTTTCG
 CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACAGTGGGTACATCGAAGCTGGATCTC
 AACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
 CGCGGTATTATCCCGTGTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGTCCGCGCATACATATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGT
 ACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGAGTGTGTCATACCAATCATGAGTGT
 AACACTGCGGCCAATTACTTCTGACAACGATCGGAGGACGGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACAACTGGGGATCA
 TGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGTGCCTGTAG
 CAATGGCAACAACTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATG
 GAGGCGGATAAAGTTGCGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGCGTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG
 TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
 GGAGTACGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCAGTGATTAGCACTTGGTAACTGTCTCA
 GACCAAGTTTACTCATATATACCTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTT
 TGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGAT
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
 CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTCTTAGT
 GTAGCGGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCAACGCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAAGTGG
 CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGC
 TGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
 AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTGTGCGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTCG
 TGATGCTGCTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCTGCGCTTTTTCGCTGGCC
 TTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG
 CTCGCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCTT
 ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGTA
 TACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCACTGGCTGCGCCCGACACCCGCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGC
 TTGTTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTCAACCTCAT
 CACCGAAACGCGCGAGGCGAGCATCAATTCCGCGCGGAAGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTGACACCATCGAATGGT
 GCAAAACCTTTTCGCGTATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAATTACGGGTGGTGAATGTGAACCAAGTAACGTTA
 TACGATGTCGACAGATATGCCGCTGCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACAGGCGAGCCAGCTTCTGCGAA
 AACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTTCCCAACCGCGTGGCACAACAACTGGCGGGCAAC
 AGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCGACCTCCAGTCTGGCCTGACGCGCGCTCGCAAAATGTGCGCGGATTAATATCTCGC
 GCGGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGTTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAA
 TCTTCTGCGCAACCGCTCAGTGGGTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGTGCCT
 GCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACAGACACCCATCAACAGTATATTTTCTCCCATGAAGACGGT
 ACGGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTCAACAGCAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAAGTTCTGTCTC
 GCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTACTCGCAATCAAAATCAGCGGATAGCGGAAACGGGAAGCGCAT
 GGAGTGCATGTGCGGTTTTCAACAAACATGCAAAATGCAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAAC
 GATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGTGCGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATA
 CGACGATACCGAGACAGCTCATGTTATATCCGCGCTTAACCACTCAAAACAGGATTTTTCGCTGCTGGGGCAACCA
 GCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCTCACTGGTGAAGA
 AAAACCAACCTTGGCGCCATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCTTGGCGGATTCATTAAATGACAGCTGGCACGACAGGT
 TTCCCGACTGGAAAGCGGCGAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCGCAATTGATCTG

FIG. 2

Dibujo esquemático de la estructura de la proteína Apm1
(homólogo de ratón = Acrp30)

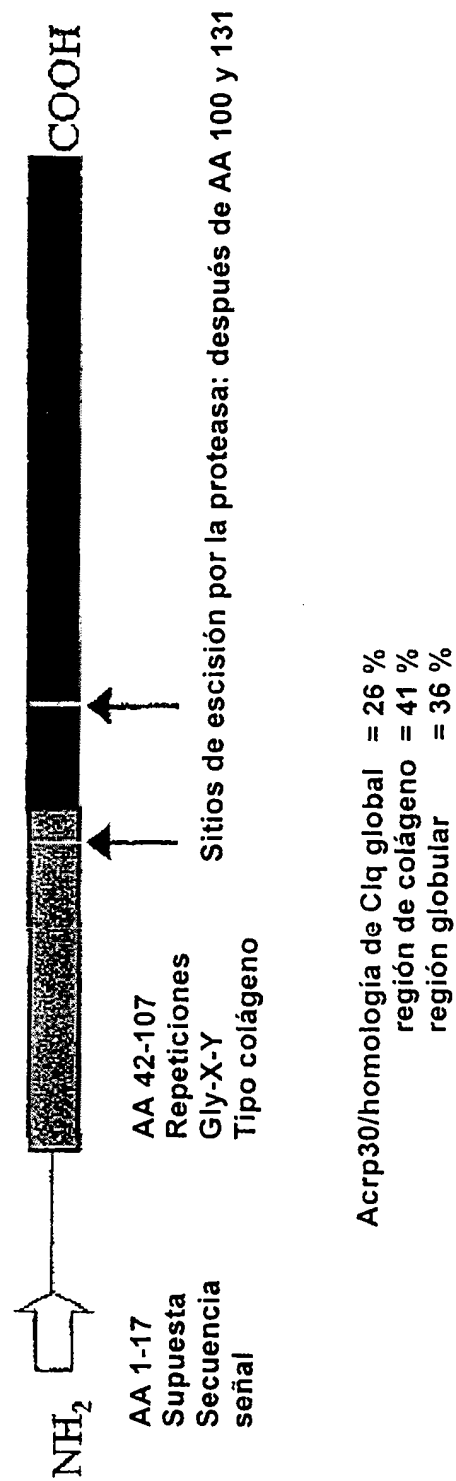


FIG. 3

GTTTGACAGCTTATCATCGACTGCA CGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGT
 GCAGGTCGTAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCGCGACATCAT
 AACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTGACAAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGA
 TAACAATTTACACAGGAACAGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCAGTGTCTTTAACAATTTATCAGACAATCTGT
 GTGGGCACTCGACCGGAATTATCGATTAACTTTATTATTAATAAATAAGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAG
 GAGGAATAAACCATGGGGGGTCTCATCATCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCTG
 GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCCGCTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCAGTGTGGGGCTGGAGACCCGCGTCA
 CTGTTCCCAATGTACCAATTGCTTTACTAAGATCTTCTACAAACCAACAGAATCATTATGACGGCAGCACTGGCAAGTTC
 TACTGCAACATTCGGGACTCTACTACTTCTCTTACCACATCACGGTGTACATGAAAGATGTGAAGGTGAGCCTCTTCAA
 GAAGGACAAGGCGCTTCTCTTACCTACGACCAGTATCAGGAAAAGAAATGTGGACCAGGCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCC
 ATCTGGAGGTGGGAGACCAAGTCTGGCTCCAGGTGTATGGGGATGGGGACCAATGGACTCTATGCAATAACGTCAAC
 GACTCTACATTTACTGGCTTTCTTCTCTACCATGATACCACTGACTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATATGGGAATTCG
 AAGCTTGGCTGTGTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGAGAAGCGGTCTGATAAA
 ACAGAAATTTGCTGGCGGAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCGGAACCTCAGAAGTGAACGCGGTAGCGCGG
 ATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG
 GGCTTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCGGGAGCGGATTTGAAGCTTG
 CGAAGCAACGGCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAATGCGCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCTG
 ACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAAACTCTTTTGTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGA
 CAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCGCCCTTATTCC
 CTTTTTTTCGCGCATTTTTCCTTCTGTTTGTCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
 GTGCAGAGTGGGTTATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTGAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCGCGGAGACGTTTTCGA
 ATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCGCGCAAGAGCACTCGGTGCGCG
 CATACACTATTCTCAGAACTGCTGGTTGAGTACTCAGCTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
 AATTATGCACTGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGGCGCAACTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAAGGAG
 CTAACCGCTTTTTCGACAAATGCGGGATCATGTAATCGCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 AAGCAGAGCGTGAACCAACGATGCTGTAGCAATGGCAACCAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGAACTACTTACTC
 TAGCTTCCCGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
 GGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGAGCGCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 GCCCTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
 GTGCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACTTCAATTT
 TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAA
 AAAAACCCAGCTACAGCGGTGGTTGTTTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC
 AGAGCCAGATACCAATACGTCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTAC
 ATACCTCGCTCTGTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
 GATAGTTACCGGATAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCGTGCAACAGCCAGCTTGGAGCGCAACGACCTAC
 ACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 AAGCGGCGAGGTGCGAACAGGAGAGCGACAGGGAGCTTCAGGGGGAAACGCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGT
 TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAACAAACGCGACCAACGCG
 GCCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTGTGCTGCTTTTGTGCTCATGTTCTTCTGCGTATCCCTGATTTCTGTGGATAA
 CCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACGCTCGCCGACGCGGAGCGAGCGAGTGAAGCGAGGAGGAG
 CGGAAGAGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGATCTGTGCGGTATTTCAACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACA
 ATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCGACAC
 CCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
 GAGCTGCATGTGTGAGGTTTTCACCGTCAACCGAAACGCGCGAGGCGAGCAGATCAATTCGCGCGCAAGGCGAAGC
 GGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGTGAACCACTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAAT
 TCAGGGTGGTGAATGTGAACCAAGTAACTTATACGATGTGCGAGATATGCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGC
 GTGGTGAACAGGCGACCGCTTTCTGCGAAACGCGGAAAAAGTGAAGCGCGGATGGCGAGCTGAATTACATTCC
 CAACCGCGTGGCAACAACCTGGCGGGCAACAGTCTGTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCAGTCTGGCCCTGCACGCGC
 CGTCCGAAATGTGCGCGGATTAATCTCGCGCGATCAACTGGGTGCGAGCTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGC
 GCATCTTCCCACTGCGATGCTGTTGCGCAACGATCAGATGGCGCTGGCGCAATGCGCGCAATTACCGCACTTCCGCTGGA
 TGACAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCTGCACTAATGTTCCGGGTTATTTCTGATGCTCTGACCAGACACCCA
 TCAACAGTATTATTTTCTCCATGAAGACGGTACGCACTGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCAACAGCAATC
 GCGCTGTAGCGGGCCATTAAAGTTCTGTCTCGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCA
 AATTACAGCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAATGCTGAATGAGG
 GCATCTTCCCACTGCGATGCTGTTGCGCAACGATCAGATGGCGCTGGCGCAATGCGCGCAATTACCGCACTTCCGCTG
 CGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGAGATACGGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCGTTAACCACCAT
 CAAACAGGATTTTTCGCTGTGGGGCAACAGCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCA
 ATCAGCTGTTCCCGCTCACTGGTGAAGAAAAACACCTGGCGCCCAATACGCAACCGCTCTCCCGCGCGGTG
 GCCGATTCAATATGCACTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTT
 AGCGCAATTGATCTG

FIG. 4

Efecto de OBG3 sobre ^{125}I -leptina en la línea
celular hepática de ratón BPRCL

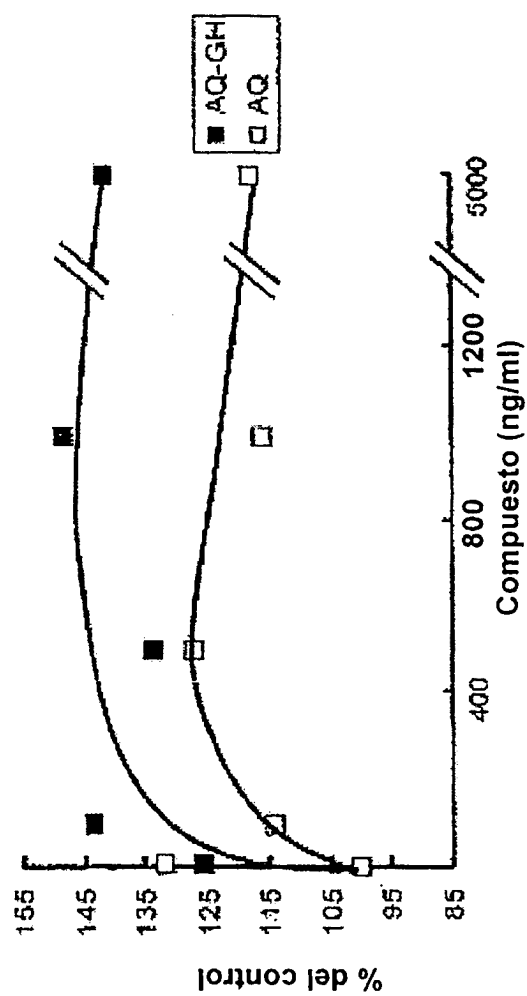


FIG. 5

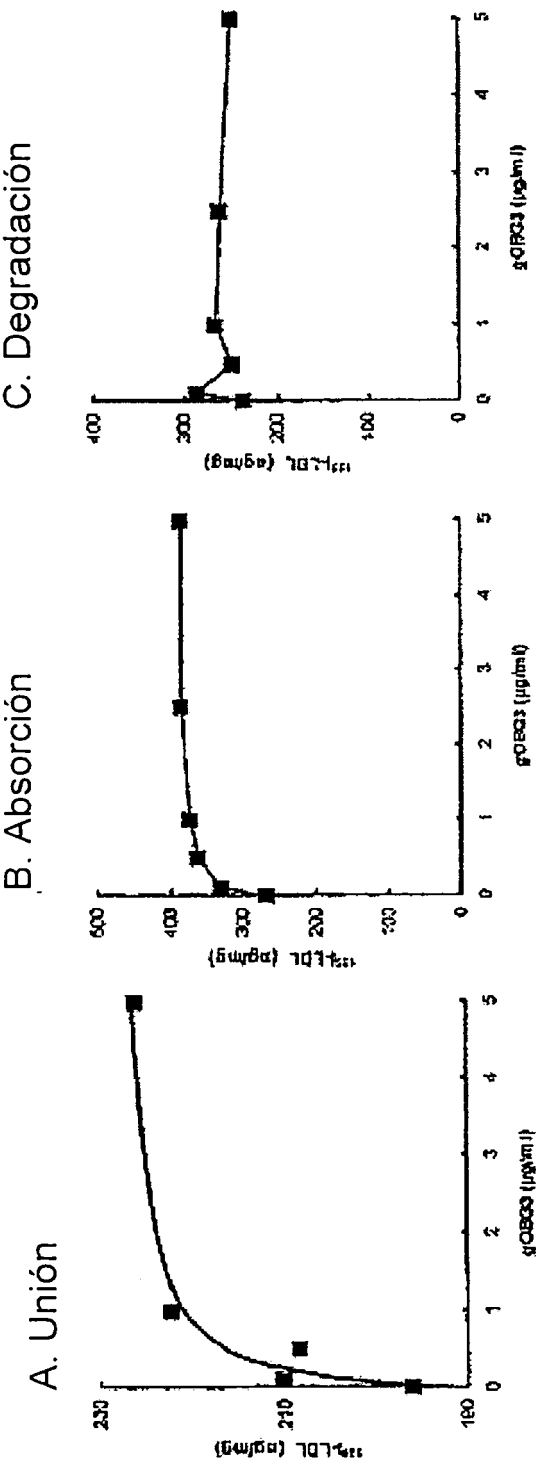


FIG. 6

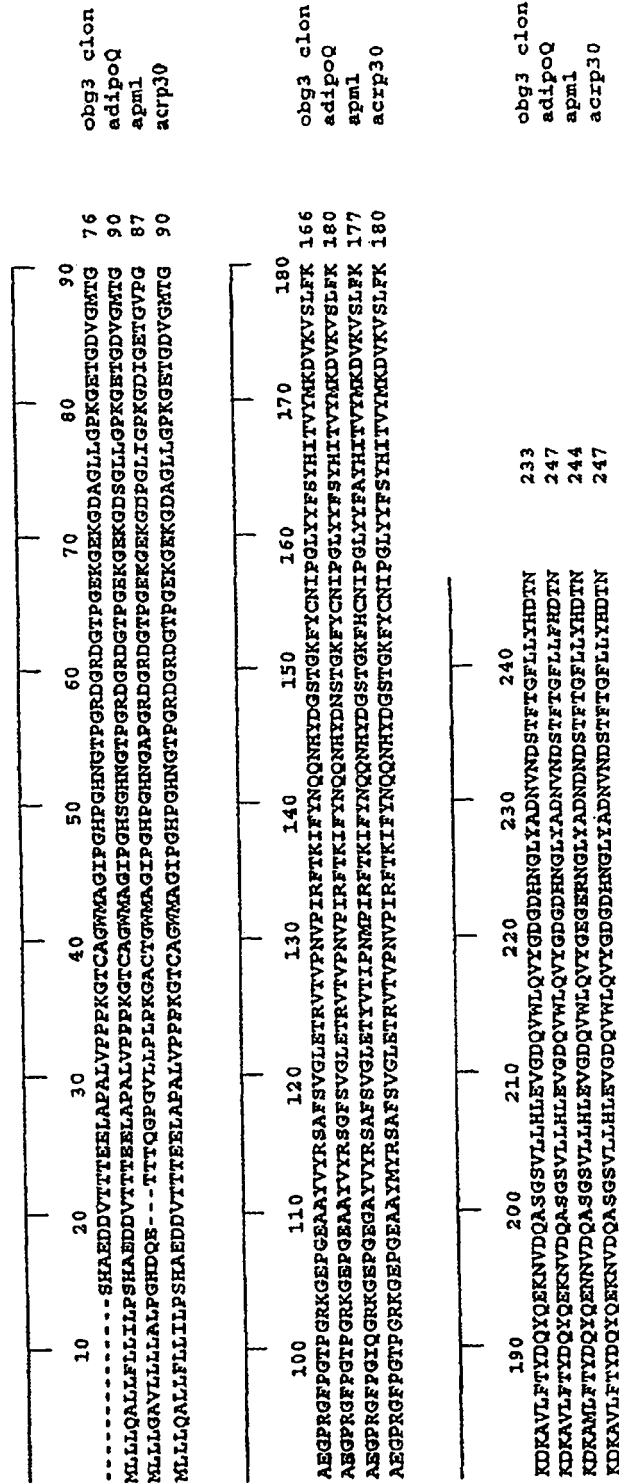


FIG. 7

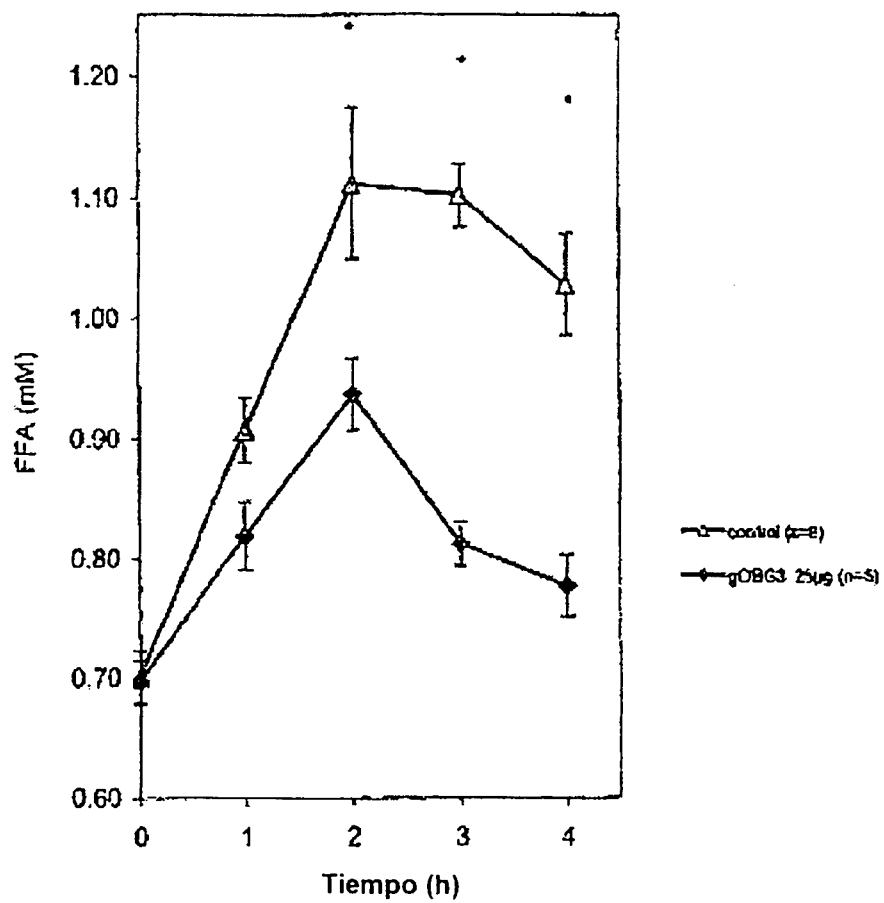


FIG. 8

Fig. 9A.

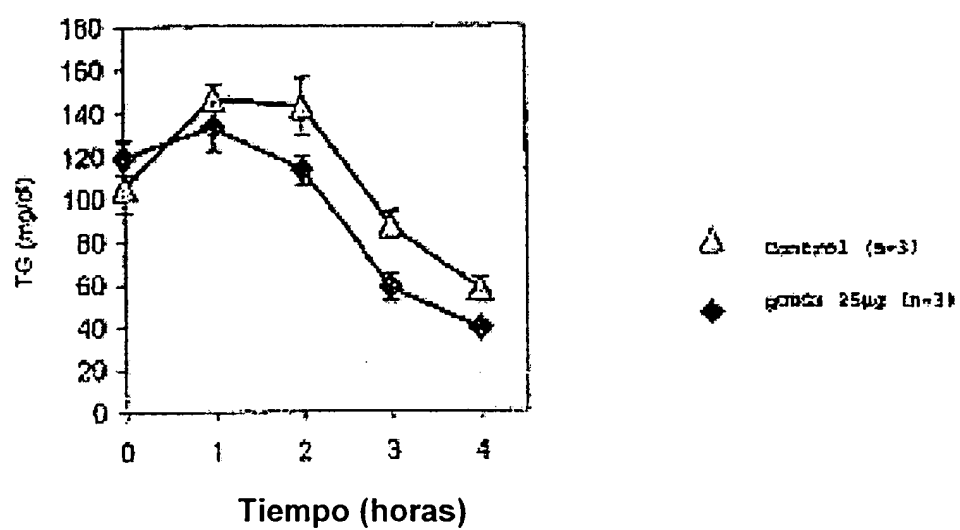
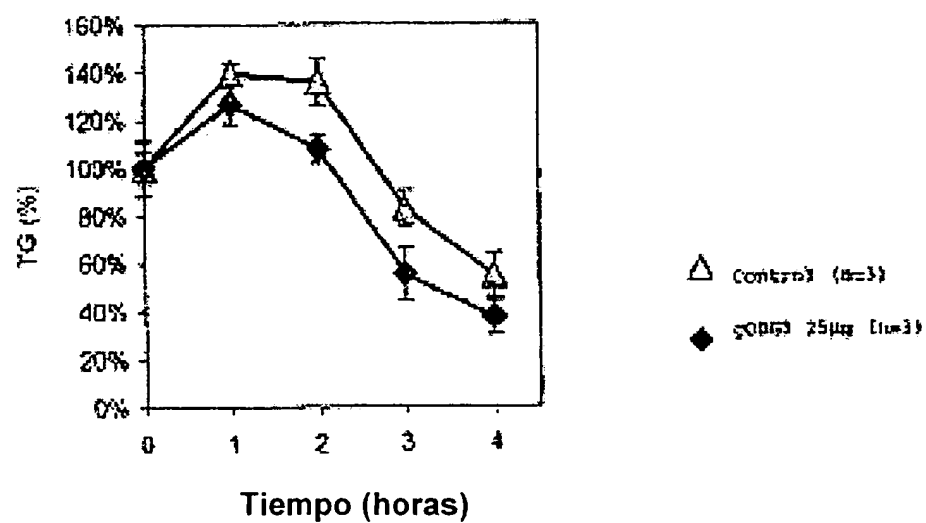


Fig. 9B.



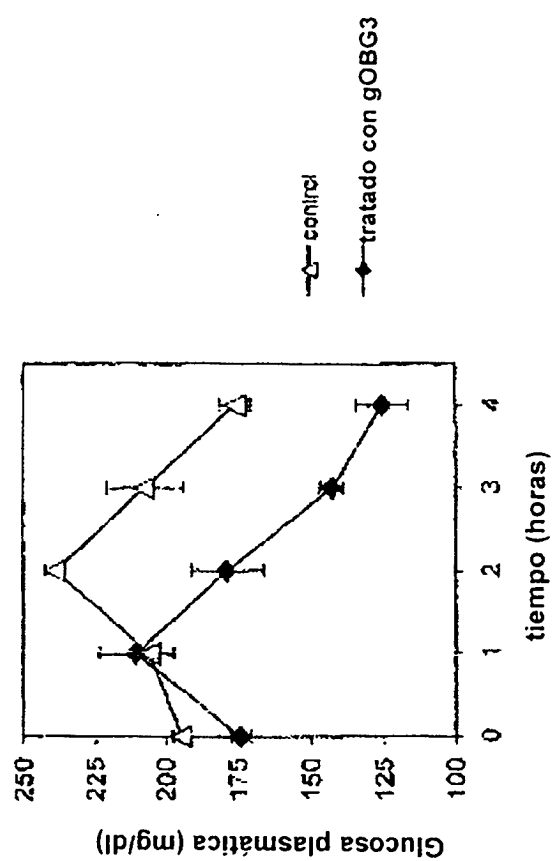


FIG. 10

Fig. 11B.



Fig. 11A.

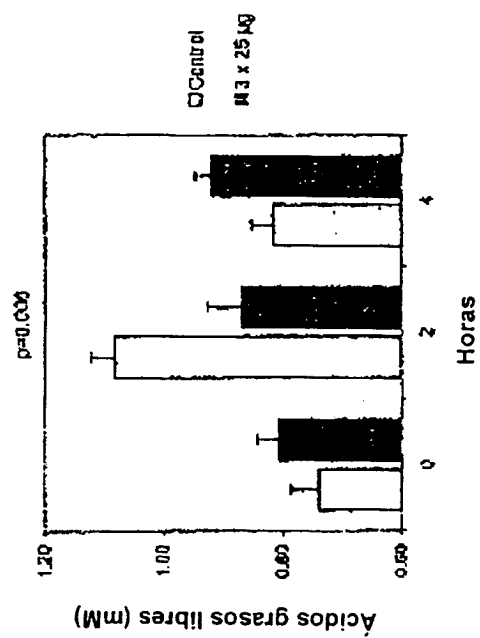


Fig. 12B.

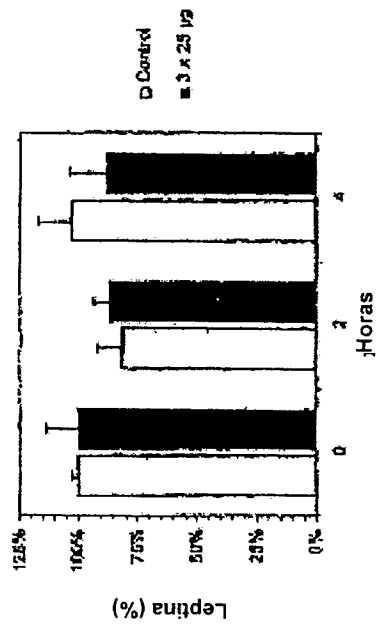


Fig. 12A.

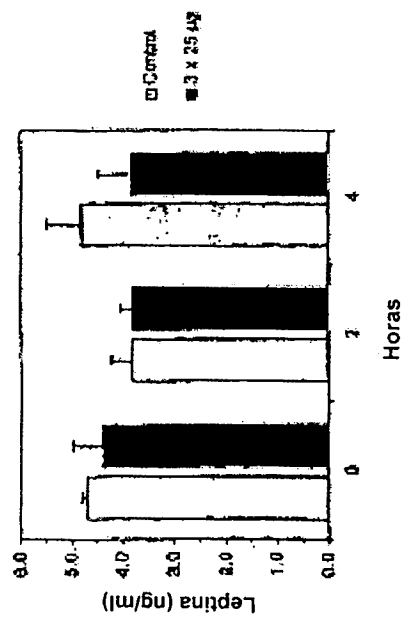


Fig. 13A.

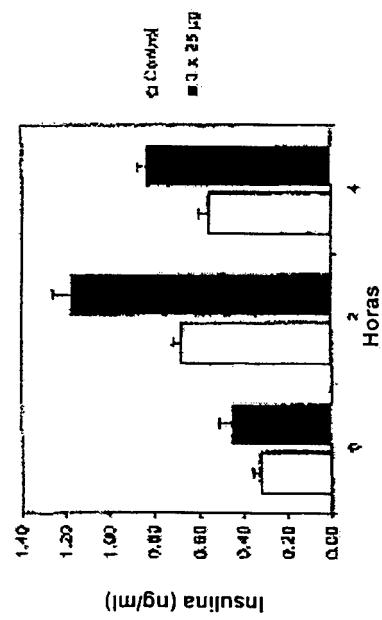


Fig. 13B.

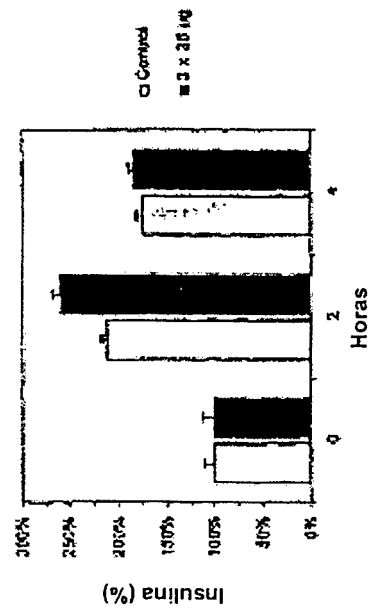


Fig. 14A.

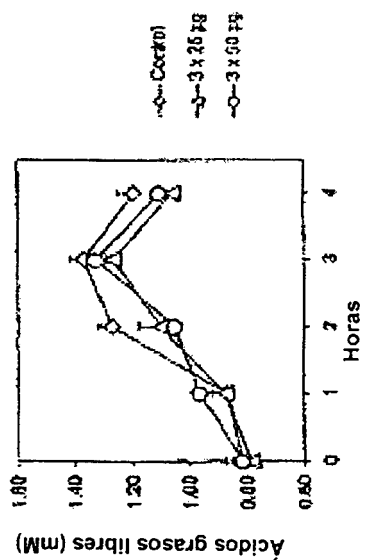


Fig. 14B.

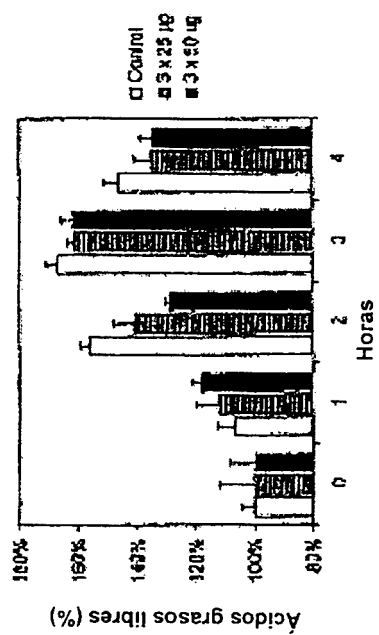


Fig. 15B.

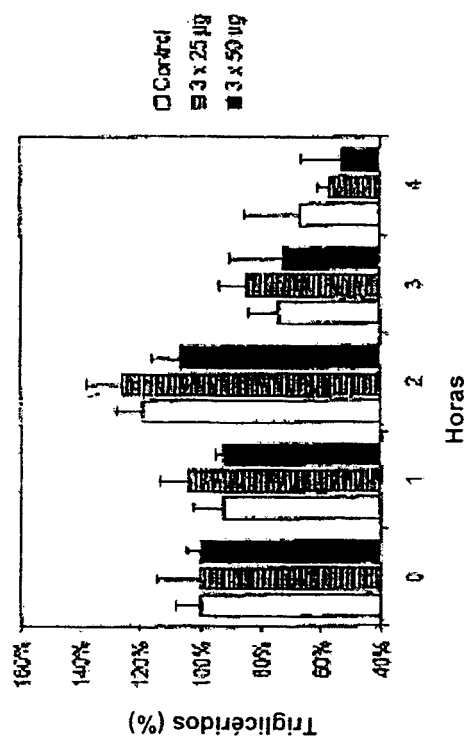


Fig. 15A.

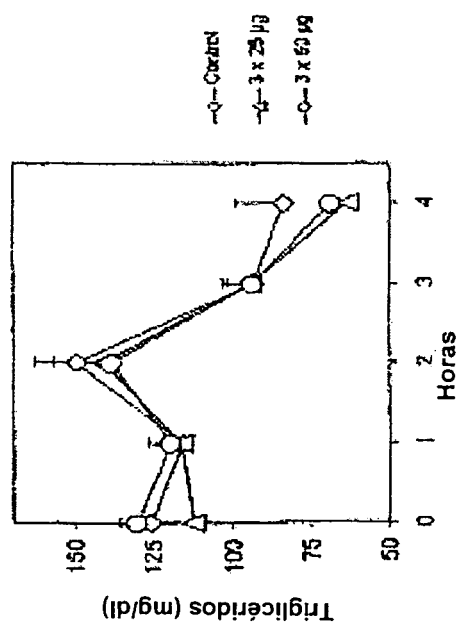


Fig. 16A.

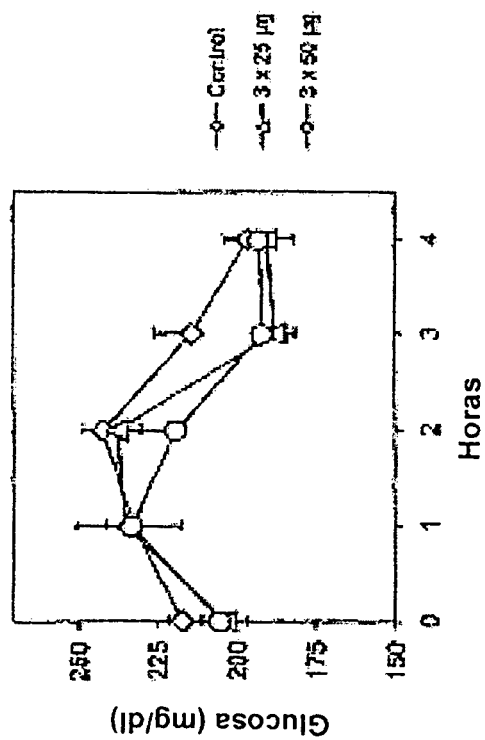


Fig. 16B.



MARCADORES DE APM1 / SECUENCIA DEL CEBADOR

NÚMERO DE BASES CONOCIDAS	LOCALIZACIÓN	MARCADORES PREVIOS	AMPLIFICON	CEBADOR DIRECTO (F. 3)	CEBADOR INVERSO (F. 4)
3738	PROMOTOR		9-27F18-27R	TGGACATTAGCAGGAAGC	ATGCCTATTCTGTCTCTTG
3773	PROMOTOR	12-28F27/251/255R	9-27F18-27R	TGGACATTAGCAGGAAGC	ATGGCTATTCTGTCTCTTG
3787	PROMOTOR				
5095	INTRON 0		4788F1334R	TCCTCCTCACTTCGATCTGAC	TGTGAAGCCCAATCCCACTGTCTA
5210	INTRON 0		4788F1334R	TCCTCCTCACTTCGATCTGAC	TGTGAAGCCCAATCCCACTGTCTA
11039	INTRON 0		99-14387F199-14387R	TCAGAGTCCGTTCTTGCTC	CTTGTACCTTCCACCCCTTTC
11118	INTRON 0	8888F14387/129R	99-14387F199-14387R	TCAGAGTCCGTTCTTGCTC	CTTGTACCTTCCACCCCTTTC
11888	INTRON 0		13843F14498R	TAGCTTTGTCCGCTGTGTCTTG	AGGAGAGACAGATCATGCCATG
13873	TGAGACT.INSERTO		13843F14498R	TAGCTTTGTCCGCTGTGTCTTG	CATGTCTGAGCAGACAGGACCAA
14702	INTRON 0		13843F14498R	TAGCTTTGTCCGCTGTGTCTTG	CATGTCTGAGCAGACAGGACCAA
14787	INTRON 0		13843F14498R	TAGCTTTGTCCGCTGTGTCTTG	CATGTCTGAGCAGACAGGACCAA
14815	INTRON 0		13843F14498R	TAGCTTTGTCCGCTGTGTCTTG	CATGTCTGAGCAGACAGGACCAA
15050	INTRON 0		14745F14815R	CTGGTTAGCATTAATGAGCA	TGAGTCGTGTGTCTTGCTGTCA
18120	INTRON 0	18209F152/154/152R			
18196	EXÓN 1 Gly = Gly	18209F152/154/152R			
15427	INTRON 1	18209F152/154/152R			
15500	INTRON 1	18209F152/154/152R			
15680	INTRON 1		19531F15680R	GCCTCTTTCATCAGACAGCTCC	CAATTGTACCCCTCCCATCTAG
16730	INTRON 1		19531F15680R	GCCTCTTTCATCAGACAGCTCC	CAATTGTACCCCTCCCATCTAG
15683	INTRON 1				
17170	3' UTRIA DE EJÓN	18209F1405/1408R			
17829	3' UTR	18209F1405/1408R	17201F18240R	CAGAGCTGTGGACTTTGTTCAC	ACTCAAGGAGACAAATGGCTTCA
18011	3' UTR	18209F1405/1408R	17201F18240R	CAGAGCTGTGGACTTTGTTCAC	ACTCAAGGAGACAAATGGCTTCA
18489	3' UTR	18209F1405/1408R	16141F19314R	CCACTGAAGTTAGGGATGACTGT	GACTCAGTGAATGGTCAAGAAACA

FIG. 17

Fig. 18B

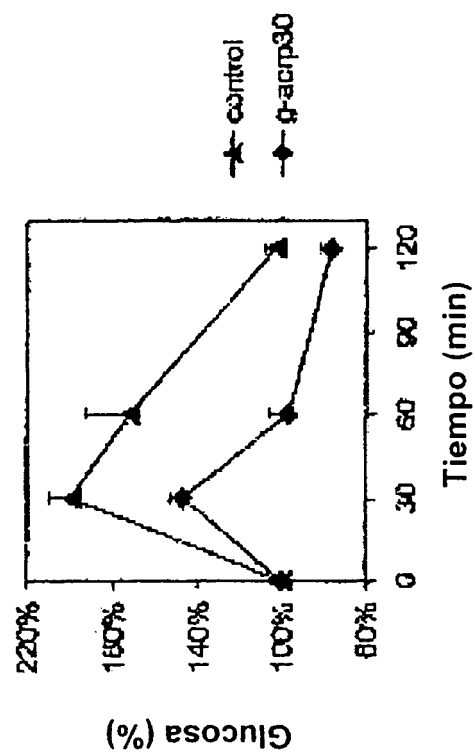
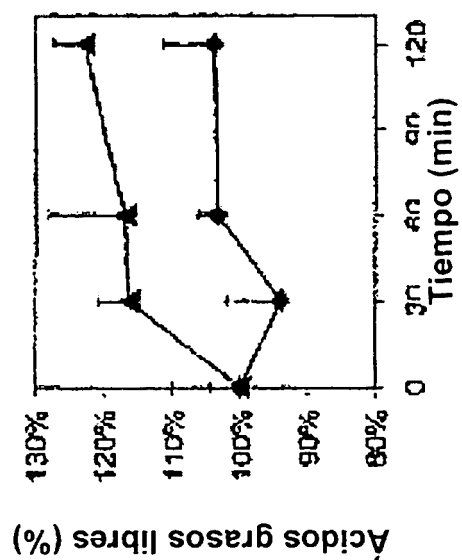


Fig. 18A



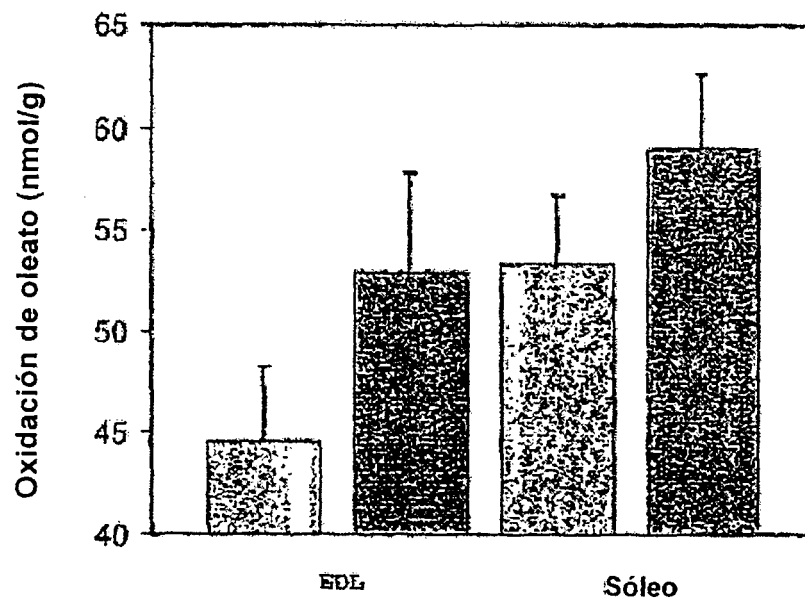


FIG. 19

Fig. 20B

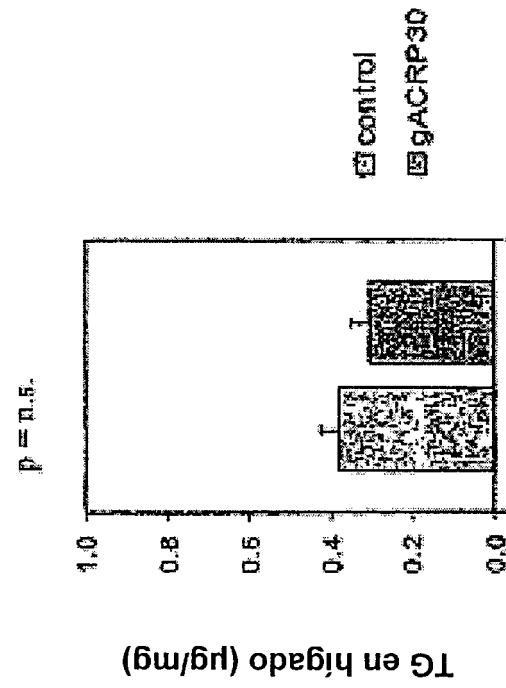
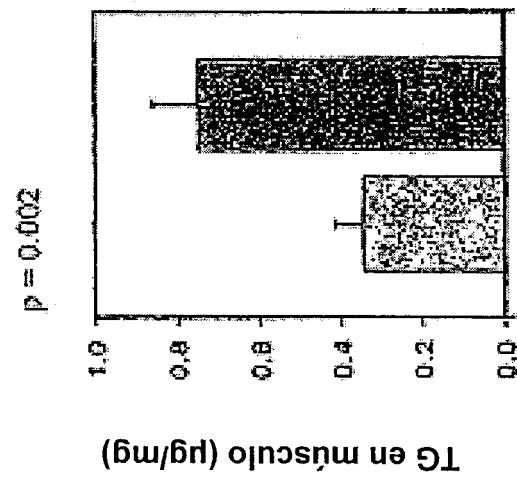


Fig. 20A



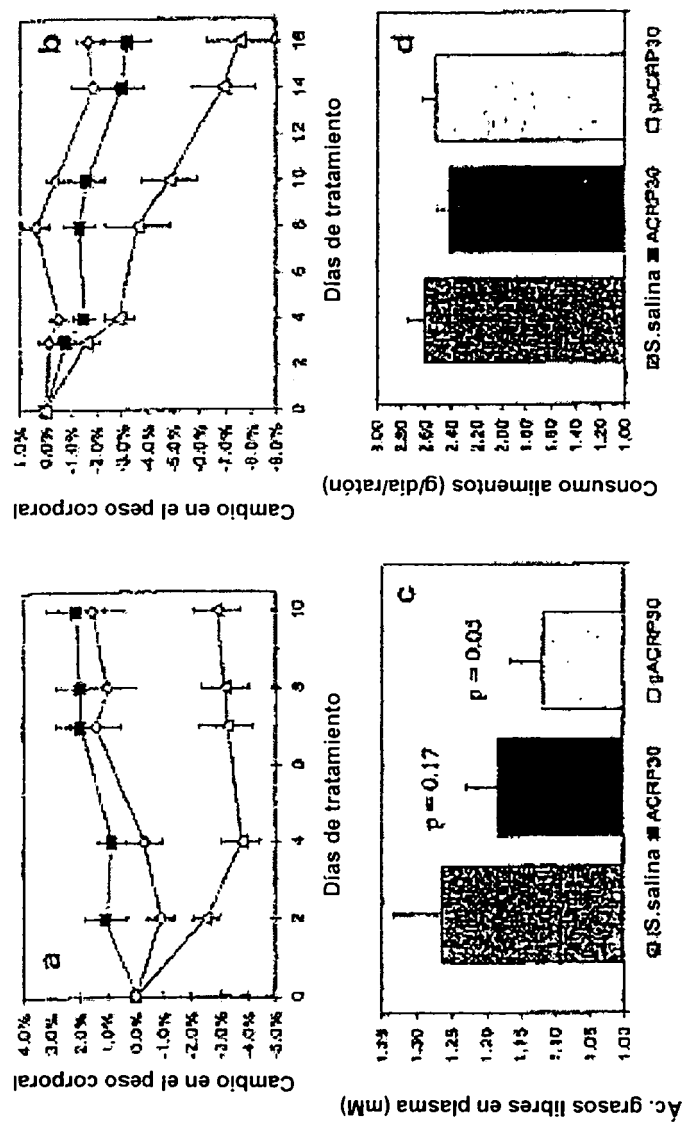


FIG. 21

Análisis bioquímico de sangre												
Ratón #	Plasma con EDTA Comentarios	Fosfatasa alcalina (U/L)	ALT (SGPT) (U/L)	AST (SGOT) (U/L)	Urea sanguínea (mg/dl)	Coolesterol (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Bilirrubina directa (mg/dl)	GGT (U/L)	Bilirrubina total (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Acido úrico (mg/dl)
Solución salina												
1	Hemolisis ligera	<20	107	23	34	116	0.2	0.0	<5	0.4	128	<0.5
2	Hemolisis ligera	<20	110	22	27	105	0.3	0.0	<5	0.5	107	0.0
3	Hemolisis ligera	<20	104	18	34	101	0.3	0.0	<5	0.5	183	1.2
4	Hemolisis ligera	<20	251	25	35	100	0.3	0.0	<5	0.3	122	0.7
5	Hemolisis ligera	<20	85	16	32	146	0.3	0.0	<5	0.0	185	2.1
6	Bajo volumen + diluido	<20	62	146	27	186	0.3	<0.1	<5	0.5	113	3.8
7	Hemolisis ligera	79	240	216	26	200	0.2	0.0	<5	0.4	120	1.6
8	Hemolisis ligera	80	160	345	29	202	0.2	0.0	<5	0.7	108	3.0
Acrp30												
9	Hemolisis ligera	<20	115	19	16	176	0.2	0.0	<5	0.4	129	2.0
10	Bajo volumen + diluido	<20	62	<3	12	120	0.2	ND	<5	0.6	291	ND
11	Hemolisis ligera	<20	43	8	18	140	0.2	0.0	<5	0.3	148	1.6
12	Ninguno	<20	114	20	26	192	0.2	0.0	<5	0.3	118	2.0
13	Bajo volumen + diluido	<20	169	227	27	216	0.3	<0.1	<5	0.5	137	3.0
14	Hemolisis ligera	46	99	234	28	160	0.2	0.0	<5	0.7	167	4.5
15	Bajo volumen + diluido	<20	176	173	18	234	0.3	<0.1	<5	0.6	168	2.7
16	Hemolisis moderada	39	85	171	16	193	0.2	0.0	6	1.4	125	4.0
gAcrp30												
17	Ninguno	<20	127	17	24	109	0.2	0.0	<5	0.1	147	0.8
18	Ninguno	<20	62	16	20	145	0.2	0.0	<5	0.2	123	1.2
19	Ninguno	<20	103	22	35	100	0.5	0.0	<5	0.2	142	0.5
20	Hemolisis ligera	<20	88	33	38	84	0.3	0.0	<5	0.5	143	1.1
21	Hemolisis marcada	66	194	294	21	208	0.1	0.0	17	2.8	127	8.1
22	Hemolisis marcada	74	289	381	19	227	0.1	0.0	7	1.9	123	6.5
23	Hemolisis marcada	49	100	250	19	179	0.1	0.0	7	1.4	128	4.2
24	Ninguno	ND	ND	ND	18	160	0.2	ND	ND	ND	198	ND
Ratón #												
Solución salina												
ave			159	101	31	109	0.28	0.00		0.40	141	1.03
Acrp30												
ave			107	121	20	162	0.23	0.00		0.58	137	2.90
gAcrp30												
ave			140	145	24	160	0.21	0.00		0.89	142	2.91

FIG. 22

Fig. 23b

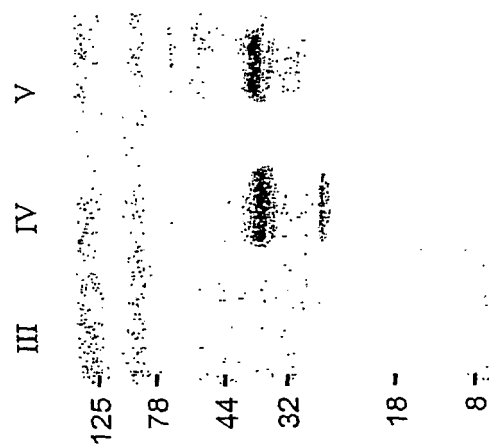
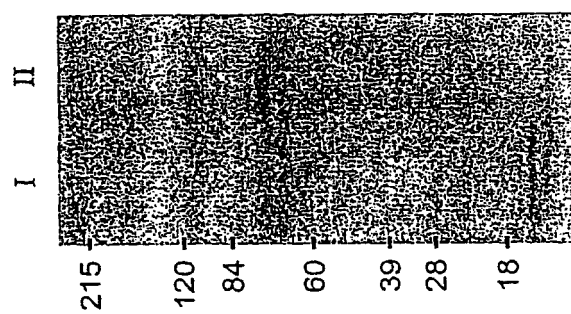


Fig. 23a



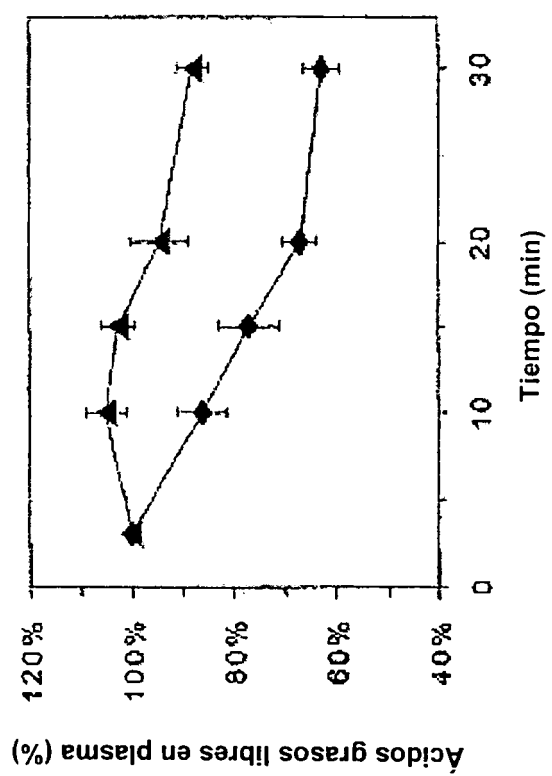


FIG. 24

ES 2 312 450 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<120> Cabeza globular de OBG3 y sus usos para reducir la masa corporal

5 <130> 341 627

<150> US 60/176,228

10 <151> 2000-01-14

<150> US 60/229,881

<151> 2000-09-01

15 <160> 7

<170> Patent.pm

20 <210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> *mus musculus*

25 <400> 1

```

gaattcggca cgaggg atg cta ctg ttg caa gct ctc ctg ttc ctc tta atc      52
Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile
1          5          10
ctg ccc agt cat gcc gaa gat gac gtt act aca act gaa gag cta gct      100
Leu Pro Ser His Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala
15          20          25
cct gct ttg gtc cct cca ccc aag gga act tgt gca ggt tgg atg gca      148
Pro Ala Leu Val Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala
30          35          40
ggc atc cca gga cat tct ggc cac aat ggc aca cca ggc cgt gat ggc      196
Gly Ile Pro Gly His Ser Gly His Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly
45          50          55          60
aga gat ggc act cct gga gag aag gga gag aaa gga gat tca ggt ctt      244
Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ser Gly Leu
65          70          75
ctt ggt cct aag ggt gag aca gga gat gtt gga atg aca gga gct gaa      292
Leu Gly Pro Lys Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu
80          85          90
ggg cct cgg ggc ttc ccc gga acc cct ggc agg aaa gga gag cct gga      340
Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly
95          100          105
gaa gcc gct tat gtg tat cgc tca ggc ttc agt gtg ggg ctg gag acc      388
Glu Ala Ala Tyr Val Tyr Arg Ser Gly Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr
110          115          120
cgc gtc act gtt ccc aat gta ccc att cgc ttt act aag atc ttc tac      436
Arg Val Thr Val Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr
125          130          135          140
aac caa cag aat cat tat gac aac agc act ggc aag ttc tac tgc aac      484
Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp Asn Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn
145          150          155
att ccg gga ctc tac tac ttc tct tac cac atc acg gtg tac atg aaa      532
Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys
160          165          170
gat gtg aag gtg agc ctc ttc aag aag gac aag gcc gtt ctc ttc acc      580

```

ES 2 312 450 T3

	Asp	Val	Lys	Val	Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Phe	Thr	
		175					180					185					
	tac	gac	cag	tat	cag	gaa	aag	aat	gtg	gac	cag	gcc	tct	ggc	tct	gtg	628
	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Gln	Glu	Lys	Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	
5		190					195					200					
	ctc	ctc	cat	ctg	gag	gtg	gga	gac	caa	gtc	tgg	ctc	cag	gtg	tat	ggg	676
	Leu	Leu	His	Leu	Glu	Val	Gly	Asp	Gln	Val	Trp	Leu	Gln	Val	Tyr	Gly	
	205					210					215				220		
	gat	ggg	gac	cac	aat	gga	ctc	tat	gca	gat	aac	gtc	aac	gac	tct	aca	724
10	Asp	Gly	Asp	His	Asn	Gly	Leu	Tyr	Ala	Asp	Asn	Val	Asn	Asp	Ser	Thr	
					225					230				235			
	ttt	act	ggc	ttt	ctt	ctc	ttc	cat	gat	acc	aac	tga	ctgcaactac				770
	Phe	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Phe	His	Asp	Thr	Asn	*					
				240					245								
15	tcatagccca	tacaccagga	gaatcatgga	acgtcgacac	actttcagct	tagtttgaga											830
	gattgatttt	attgcttagt	ttgagagtcc	tgagtattat	ccacacgtgt	actcacttgt											890
	tcattaaacg	actttataaa	aaataatttg	tggtcctagt	ccagaaaaaa	aggcactccc											950
	tggtctccac	gactcttaca	tggtagcaat	aacagaatga	aaatcacatt	tggtatgggg											1010
	gcttcacaat	attcgcatga	ctgtctggaa	gtagaccatg	ctatttttct	gctcactgta											1070
20	cacaaatatt	gttcacataa	accctataat	gtaaatatga	aatacagtga	ttatcttctc											1130
	aaaaaaaaact	cgtgccgaat	tc														1152

<210> 2

25 <211> 247

<212> PRT

<213> *mus musculus*

30 <400> 2

	Met	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	Pro	Ser	His	
	1				5				10					15			
	Ala	Glu	Asp	Asp	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Val	
35				20					25				30				
	Pro	Pro	Pro	Lys	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	
			35				40					45					
	His	Ser	Gly	His	Asn	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	
		50				55					60						
40	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Lys	
	65				70						75					80	
	Gly	Glu	Thr	Gly	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	
				85					90					95			
45	Phe	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Tyr	
				100					105					110			
	Val	Tyr	Arg	Ser	Gly	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	
50		130					135					140					
	His	Tyr	Asp	Asn	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	Tyr	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly	Leu	
	145				150					155						160	
	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Tyr	His	Ile	Thr	Val	Tyr	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Val	
				165					170						175		
55	Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Tyr	
				180				185						190			
	Gln	Glu	Lys	Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	His	Leu	
			195				200						205				
60	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	
	Leu	Leu	Phe	His	Asp	Thr	Asn										
65					245												

<210> 3

<211> 1276

ES 2 312 450 T3

<212> DNA

<213> *mus musculus*

5 <400> 3

```

ctctaaagat tgtcagtgga tctgacgaca ccaaaagggc tcagg atg cta ctg ttg      57
                                     Met Leu Leu Leu
                                     1
10  caa gct ctc ctg ttc ctc tta atc ctg ccc agt cat gcc gaa gat gac      105
    Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His Ala Glu Asp Asp
    5                                     10                                     20
    gtt act aca act gaa gag cta gct cct gct ttg gtc cct cca ccc aag      153
    Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val Pro Pro Pro Lys
    15                                     25                                     30                                     35
    gga act tgt gca ggt tgg atg gca ggc atc cca gga cat cct ggc cac      201
    Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly His
    40                                     45                                     50
    aat ggc aca cca ggc cgt gat ggc aga gat ggc act cct gga gag aag      249
    Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu Lys
    55                                     60                                     65
    gga gag aaa gga gat gca ggt ctt ctt ggt cct aag ggt gag aca gga      297
    Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys Gly Glu Thr Gly
    70                                     75                                     80
    gat gtt gga atg aca gga gct gaa ggg cca cgg ggc ttc ccc gga acc      345
    Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Thr
    85                                     90                                     95                                     100
    cct ggc agg aaa gga gag cct gga gaa gcc gct tat atg tat cgc tca      393
    Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr Met Tyr Arg Ser
    105                                     110                                     115
    gcg ttc agt gtg ggg ctg gag acc cgc gtc act gtt ccc aat gta ccc      441
    Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val Pro Asn Val Pro
    120                                     125                                     130
    att cgc ttt act aag atc ttc tac aac caa cag aat cat tat gac ggc      489
    Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp Gly
    135                                     140                                     145
    agc act ggc aag ttc tac tgc aac att ccg gga ctc tac tac ttc tct      537
    Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Ser
    150                                     155                                     160
    tac cac atc acg gtg tac atg aaa gat gtg aag gtg agc ctc ttc aag      585
    Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe Lys
    165                                     170                                     175                                     180
    aag gac aag gcc gtt ctc ttc acc tac gac cag tat cag gaa aag aat      633
    Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Lys Asn
    185                                     190                                     195
    gtg gac cag gcc tct ggc tct gtg ctc ctc cat ctg gag gtg gga gac      681
    Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly Asp
    200                                     205                                     210
    caa gtc tgg ctc cag gtg tat ggg gat ggg gac cac aat gga ctc tat      729
    Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His Asn Gly Leu Tyr
    215                                     220                                     225
    gca gat aac gtc aac gac tct aca ttt act ggc ttt ctt ctc tac cat      777
    Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr His
    230                                     235                                     240
    gat acc aac tga ctgcaactac ccatagccca tacaccagga gaatcatgga      829
    Asp Thr Asn *
    245
    acagtcgaca cactttcagc ttagtttgag agattgattt tattgcttag tttgagagtc      889
    ctgagtatta tccacacgtg tactcacttg ttcattaaac gactttataa aaaataattt      949
    gtgttcctag tccagaaaaa aaggcactcc ctggtctcca cgactcttac atggttagcaa      1009
    taacagaatg aaaatcacat ttggtatggg ggcttcacaa tattcgcatg actgtctgga      1069

```

ES 2 312 450 T3

```

agtagaccat gctatTTTTtC tgctcactgt acacaaatat tgttcacata aaccctataa 1129
tgtaaatatg aaatacagtg attactcttc tcacaggctg agtgtatgaa tgtctaaaga 1189
cccataagta ttaaagtggT agggataaat tggaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaaaact 1249
ttagagcaca ctggcggccg ttactag 1276

```

5

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

10

<213> *mus musculus*

<400> 4

15

```

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His
1      5      10      15
Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val
20      25      30
Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
35      40      45
His Pro Gly His Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr
50      55      60
Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys
65      70      75      80
Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly
85      90      95
Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr
100     105     110
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
His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu
145     150     155     160
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
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
195     200     205
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
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
245

```

25

30

35

40

45

<210> 5

50

<211> 4517

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

55

<400> 5

```

ctgattccat accagagggg ctcagg atg ctg ttg ctg gga gct gtt cta ctg 53
Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu
1      5
cta tta gct ctg ccc ggg cat gac cag gaa acc acg act caa ggg ccc 101
Leu Leu Ala Leu Pro Gly His Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro
10     15     20     25
gga gtc ctg ctt ccc ctg ccc aag ggg gcc tgc aca ggt tgg atg gcg 149
Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala
30     35     40
ggc atc cca ggg cat ccg ggc cat aat ggg gcc cca ggc cgt gat ggc 197
Gly Ile Pro Gly His Pro Gly His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly

```

ES 2 312 450 T3

		45		50		55		
		aga gat ggc acc cct ggt gag aag ggt gag aaa gga gat cca ggt ctt						245
		Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu						
5		60		65		70		
		att ggt cct aag gga gac atc ggt gaa acc gga gta ccc ggg gct gaa						293
		Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu						
		75		80		85		
10		ggg ccc cga ggc ttt ccg gga atc caa ggc agg aaa gga gaa cct gga						341
		Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly						
		90		95		100		105
		gaa ggt gcc tat gta tac cgc tca gca ttc agt gtg gga ttg gag act						389
		Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr						
				110		115		120
15		tac gtt act atc ccc aac atg ccc att cgc ttt acc aag atc ttc tac						437
		Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr						
				125		130		135
20		aat cag caa aac cac tat gat ggc tcc act ggt aaa ttc cac tgc aac						485
		Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn						
				140		145		150
		att cct ggg ctg tac tac ttt gcc tac cac atc aca gtc tat atg aag						533
		Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys						
				155		160		165
25		gat gtg aag gtc agc ctc ttc aag aag gac aag gct atg ctc ttc acc						581
		Asp Val Lys Val Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr						
				170		175		180
		tat gat cag tac cag gaa aat aat gtg gac cag gcc tcc ggc tct gtg						629
		Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val						
30				190		195		200
		ctc ctg cat ctg gag gtg ggc gac caa gtc tgg ctc cag gtg tat ggg						677
		Leu Leu His Leu Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly						
				205		210		215
35		gaa gga gag cgt aat gga ctc tat gct gat aat gac aat gac tcc acc						725
		Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr						
				220		225		230
		ttc aca ggc ttt ctt ctc tac cat gac acc aac tga tcaccactaa						771
		Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn *						
40		235		240		245		
		ctcagagcct cctccaggcc aaacagcccc aaagtcatt aaaggctttc agtacggtta						831
		ggaagttgat tattatttag ttggaggcct ttagatatta ttcattcatt tactcattca						891
		tttattcatt cattcatcaa gtaactttta aaaaatcata tgctatgttc ccagtcctgg						951
45		ggagcttcac aaacatgacc agataactga ctagaaagaa gtagttgaca gtgctatttt						1011
		gtgcccactg tctctcctga tgctcatatc aatcctataa ggcacagga acaagcattc						1071
		tectgttttt acagattgta tectgagget gagagagtta agtgaatgta taaggtcaca						1131
		cagtattaag tgacagtgtc agaaatcaaa cccagagctg tggactttgt tcactagact						1191
		gtgccccttt atagaggtac atgttctctt tggagtgttg gtaggtgtct gtttccacc						1251
50		tcacctgaga gccattgaat ttgccttcct catgaattaa aacctcccc aagcagagct						1311
		tcctcagaga aagtgtttct atgatgaagt cctgtcttg aaggactact actcaatggc						1371
		ccctgcaacta ctctacttcc tcttacctat gtcccttctc atgcctttcc ctccaacggg						1431
		gaaagccaac tccatctcta agtgctgaac tcatccctgt tctcaaggc cacctggcca						1491
55		ggagcttctc tgatgtgata tccacttttt tttttttttg agatggagtc tcaactctgtc						1551
		acccaggtct gactacagt acacgacctc ggctcactgc agcctccttc tctgggtcc						1611
		aagcaattat tgtgcctcag cctcccgagt agctgagact tcaggtgcat tccaccacac						1671
		atggctaatt tttgtatttt tagtagaaat ggggtttcgt catgttgcc aggtgtgtct						1731
		cgaactcctg gcctaggtga tccaccgcc tccgacctcc aaagtgtggt gattacaggc						1791
60		atgagccacc atgcccagtc gatattctcac tttttatttt gccatggatg agagtctgtg						1851
		gtgtgaggaa cacctccac caggctagag gcaactgccc aggaaggact gtgcttccgt						1911
		cacctctaaa tcccttgag atccttgata aatgcctcat gaagaccaat ctcttgaatc						1971
		ccatatctac ccagaattaa ctccattcca gtctctgcat gtaatcagtt ttatccacag						2031
		aaacattttc atttttaggaa atccctggtt taagtatcaa tccctgttca gctggacaat						2091
65		atgaatcttt tccactgaag ttagggatga ctgtgatttt cagaacacgt ccagaatttt						2151
		tcacaaagaa ggtagcttga gcctgaaatg caaaacccat ggaggaattc tgaagccatt						2211

ES 2 312 450 T3

```

gtctccttga gtaccaacag ggtcagggaa gactgggcct cctgaattta ttattgttct 2271
ttaagaatta caggttgagg tagttgatgg tggtaaacad tctctcagga gacaataact 2331
ccagtgatgt ttttcaaaga ttttagcaaa aacagagtaa atagcattct ctatcaatat 2391
ataaatttaa aaaactatct ttttgcttac agttttaaat tctgaacaat ttctcttata 2451
5 tgtgtattgc taatcattaa ggtattatct tttccacata taaagctttg tctttttgtt 2511
gttgttgttg tttttaagat ggagtttccc tctgttgcca ggctagagtg cagtggcatg 2571
atctcggctt actgcaacct ttgcctccca ggtttaagcg attcttctgc ctcagcctcc 2631
cgagtagctg ggaccacagg tgcctaccac catgccaggc taatttttgt attttttagta 2691
aagacagggt ttcaccatat tggccaggct ggtctcgaac tccctgacct gtgatctgcc 2751
10 cgcctccatt gtgttgttat ttgtgagaaa gatagatatg aggttttagag agggatgaag 2811
aggtgagagt aagccttgtg ttagtcagaa ctctgtgttg tgaatgtcat tcacaacaga 2871
aaacccaaaa tattatgcaa actactgtaa gcaagaaaaa taaaggaaaa atggaaacat 2931
ttattccttt gcataataga aattaccaga gttgttctgt ctttagataa ggtttgaacc 2991
15 aaagctcaaa acaatcaaga cccttttctg tatgtccttc tgttctgcct tccgcagtgt 3051
aggctttacc ctcaggtgct acacagtata gttctagggg ttccctcccg atatcaaaaa 3111
gactgtggcc tgcccagctc tcgtatcccc aagccacacc atctggctaa atggacatca 3171
tgttttctgg tgatgcccaa agaggagaga ggaagctctc tttcccagat gccccagcaa 3231
gtgtaacctt gcatctcatt gctctggctg agttgtgtgc ctgtttctga ccaatcactg 3291
20 agtcaggagg atgaaatatt catattgact taattgcagc ttaagttagg ggtatgtaga 3351
ggatattttcc ctaaagcaaa attgggacac tgttatcaga aataggagag tggatgatag 3411
atgcaaaata atacctgtcc acaacaaact cttaatgctg tgtttgagct ttcatgagtt 3471
tcccagagag acatagctgg aaaattccta ttgattttct ctaaaatttc aacaagtagc 3531
25 taaagtctgg ctatgctcac agtctcacat ctggtggggg tgggctcctt acagaacacg 3591
ctttcacagt taccctaaac tctctggggc agggttattc ctttgtggaa ccagaggcac 3651
agagacagtc aactgaggcc caacagaggc ctgagagaaa ctgagggtcaa gatttcagga 3711
ttaatggctc tgtgatgctt tgaagtacaa ttgtggattt gtccaattct ctttagttct 3771
gtcagctttt gcttcatata ttttagcgct ctattattag atatatacat gtttagtatt 3831
30 atgtcttatt ggtgcattta ctctcttate attatgtaat gtccttcttt atctgtgata 3891
attttctgtg ttctgaagtc tactttgtct aaaaataaca tacgcaactca acttcctttt 3951
ctttcttctt tcttttcttt ctctcttctt ttctttctct ctctctcttt ccttctcttc 4011
tctctctttt tctctctctc tctctctctc tctcttttct tgacagactc tcgttctgtg 4071
gacctggctg gagttcagtg gtgtgatctt ggctcactgc tacctctacc atgacgaatt 4131
35 ctctgcctc agcctcccaa gttagctggaa ctacaggctc atgccactgc gccagctaa 4191
tttttgtatt tttcgtagag acgggggttt accacattcg tcagggttgg ttcaaaactc 4251
tgactttgtg atccaccgcg ctcggcctcc caaagtgtg ggattacagg catgagccat 4311
cacacctggg caactttctt ttgattagtg tttttgtgg atatatcttt ccatcatgtt 4371
40 actttaataa tatctatatt attgtattta aaatgtgttt cttacagact gcatgtagtt 4431
gggtataatt tttatccagt ctaaaaatat ctgtctttta attggtgttt agacaattta 4491
tatttaataa aatgggtgaa tttaaa 4517

```

<210> 6

<211> 244

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 6

```

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His
1 5 10 15
Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro
20 25 30
55 Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly
35 40 45
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
Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110
65 Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met

```

ES 2 312 450 T3

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

20 <210> 7
 <211> 20966
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 1..4811

30 <223> 5' región reguladora

<220>
 <221> exón

35 <222> 4812..4851
 <223> exón 1

<220>
 <221> exón
 <222> 15144..15365
 <223> exón 2

45 <220>
 <221> exón
 <222> 16277..20559

50 <223> exón 3

<220>
 <221> característica_misc

55 <222> 20560..20966
 <223> 3' región reguladora

<220>
 <221> alelo
 <222> 3787
 <223> 9-27-261: base polimórfica G o C

65 <220>
 <221> alelo

ES 2 312 450 T3

<222> 11118
 <223> 99-14387-129: base polimórfica A o C
 5 <220>
 <221> alelo
 <222> 15120
 <223> 9-12-48: base polimórfica C o T
 10 <220>
 <221> alelo
 <222> 15196
 15 <223> 9-12-124: base polimórfica G o T
 <220>
 <221> alelo
 20 <222> 15427
 <223> 9-12-355: base polimórfica G o T
 <220>
 <221> alelo
 25 <222> 15500
 <223> 9-12-428: base polimórfica A o G
 30 <220>
 <221> alelo
 <222> 15863
 35 <223> 99-14405-105: base polimórfica A o G
 <220>
 <221> alelo
 40 <222> 17170
 <223> 9-16-189: base polimórfica delección de A
 <220>
 45 <221> unión_cebador
 <222> 3528..3545
 <223> 9-27.pu
 50 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 3928..3946
 55 <223> 9-27.complemento rp
 <220>
 <221> unión_cebador
 60 <222> 10990..11008
 <223> 99-14387.pu
 <220>
 65 <221> unión_cebador
 <222> 11423..11442

ES 2 312 450 T3

<223> 99-14387.complemento rp
 <220>
 5 <221> unión_cebador
 <222> 15073..15092
 <223> 9-12.pu
 10 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 15503..15520
 <223> 9-12.complemento rp
 15 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 15759..15776
 20 <223> 99-14405.pu
 <220>
 <221> unión_cebador
 25 <222> 16191..16211
 <223> 99-14405.complemento rp
 30 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 16892..17001
 <223> 9-16.pu
 35 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 17384..17402
 40 <223> 9-16.complemento rp
 <220>
 <221> unión_misc
 45 <222> 3775..3799
 <223> 9-27-261.sonda
 50 <220>
 <221> unión_misc
 <222> 11106..11130
 <223> 99-14387-129.sonda
 55 <220>
 <221> unión_misc
 <222> 15108..15312
 60 <223> 9-12-48.sonda
 <220>
 <221> unión_misc
 65 <222> 15184..15208
 <223> 9-12-124.sonda

ES 2 312 450 T3

<220>
<221> unión_misc
<222> 15415..15439
5 <223> 9-12-355.sonda

<220>
<221> unión_misc
10 <222> 15488..15512
<223> 9-12-428.sonda

<220>
15 <221> unión_misc
<222> 15851..15875
<223> 99-14405-105.sonda

<220>
20 <221> unión_misc
<222> 17158..17182
25 <223> 9-16-189.sonda

<220>
<221> unión_cebador
30 <222> 3768..3786
<223> 9-27-261.mis

<220>
35 <221> unión_cebador
<222> 3788..3806
<223> 9-27-261.complemento mis

<220>
40 <221> unión_cebador
<222> 11099..11117
45 <223> 99-14387-129.mis

<220>
<221> unión_cebador
50 <222> 11119..11137
<223> 99-14387-129.complemento mis

<220>
55 <221> unión_cebador
<222> 15101..15119
<223> 9-12-48.mis

<220>
60 <221> unión_cebador
<222> 15121..15139
65 <223> 9-12-48.complemento mis

ES 2 312 450 T3

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> 15177..15195
 5 <223> 9-12-124.mis

 <220>
 <221> unión_cebador
 10 <222> 15197..15215
 <223> 9-12-124.complemento mis

 <220>
 15 <221> unión_cebador
 <222> 15408..15426
 <223> 9-12-355.mis

 20 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 15428..15446
 25 <223> 9-12-355.complemento mis

 <220>
 <221> unión_cebador
 30 <222> 15481..15499
 <223> 9-12-428.mis

 <220>
 35 <221> unión_cebador
 <222> 15501..15519
 <223> 9-12-428.complemento mis

 40 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 15844..15862
 45 <223> 99-14405-105.mis

 <220>
 <221> unión_cebador
 50 <222> 15864..15882
 <223> 99-14405-105.complemento mis

 <220>
 55 <221> unión_cebador
 <222> 17151..17169
 <223> 9-16-189.mis

 60 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 17171..17189
 65 <223> 9-16-189.complemento mis

ES 2 312 450 T3

<400> 7

	gctgatctgc	tgcctcagcc	ttcccaaagt	gctgtaattt	attaggcata	agccactgtg	60
5	cctgcctagt	gttgtagatt	ctgtgggttt	tgacaattgt	atgcatctac	atgtatgtac	120
	catttatagt	attcctgttt	ttaatttttag	ccattctagt	aggcatgtag	tgatatctca	180
	tggtgatttt	aatttgcggt	tccgtaatgg	ttaataatgc	tgaacatctt	tgcatgtgct	240
	tgtttgatcat	ttgtgtttcc	tacttggtga	aataattggt	catgtccttt	gtccattttc	300
	taattgaatt	tttttttacc	atttaggttt	gagattttctt	tatacaatct	agatccaaat	360
10	ctcttgatctc	aaatatgggt	tgcaaataca	ttcctctaata	tcataatattg	cctttttctc	420
	ctcttaacag	gatgtttcac	agagcaaaag	tttttagtttt	gttgaaatct	cacttttcat	480
	ttttttcttt	agtggattgt	gcttttggtg	tcataatgtaa	gaactcttca	ctggccctag	540
	atccttgat	tggtttccta	agattgccat	agcaaatcac	catgaactta	gtgacaaaaa	600
15	gacagaaatt	tatttttact	tctactgtg	ggcagactag	acgttaatta	ttttcatgta	660
	tgctcattcc	tatgacatct	ttctgatata	ataattatag	ttattcttaa	gcttcaccct	720
	ttttttctatt	agctttgtta	ccttggtgtg	cactttttct	tttttgacat	tgtagcctat	780
	gccagatcat	gtctgttagt	ccttagccct	ccattcacct	ctccataatc	ccttttgat	840
	tccgtggagct	tgatgcctga	aatgacacat	cctacattcc	tttgccagat	gggtaccagt	900
20	tagcttggtgc	acatgggaga	caaccgtgaa	aagactgaag	tggggaagaa	gggaggagct	960
	gttggtgtttc	agttagcgcc	cttggtgagt	gcggtgacag	tggtctctgt	tcagtggcaa	1020
	tggtggagca	gctagcaaga	catgcagtaa	gcgcaggctc	ataggctatg	gtccaggagc	1080
	agtcaccgat	tcctggtctt	taggcaatat	catctccctt	tgcttctcca	gcctttctaa	1140
	aattattgta	ccttgactag	tacaattttt	tagtattggg	ggtagtccaa	ggacacaggc	1200
25	tttaaaaagt	atgaattcag	ggttgccctac	ctgcattgac	tgcgcttgaa	tcatgatggc	1260
	cttctgggtcg	gtggcaggag	gtgacagtcc	aaatcatgca	gtagcaaacc	agatacttaa	1320
	attatcatct	gagatacttc	agaagtacag	ccgtagccat	accttcagaa	gagataaaga	1380
	aatgttctcc	tgccagggcg	cggtggctca	cgctgtcat	tccagcactt	tgggaggccg	1440
	agggggtgga	tcacctgagg	tcgggagttc	gagaccagcc	tgaccaacat	ggggaaaccc	1500
30	tgtctctact	aaaaatacaa	aatttagcggg	gcgtgggtggc	acatgcccat	aatcccagct	1560
	actcggggagg	ctaaggcagg	ataatcgctt	gaacctgaga	ggcagagggt	gcggtgaaact	1620
	gagatcatgc	catagtactc	cagcctgggc	aacaagagtg	aaactccatc	tcaaaaaaaa	1680
	aaaaaagaaa	aaaagataaa	gaaatgttct	cctttcttgc	catttctagg	ggtttgggga	1740
35	tggcgtacat	tgctgcaggg	cgtgctcact	ctaccatctt	gctccaatct	ttatttttca	1800
	aaatacagtg	cttatgcttg	gttacttcag	ttaagattat	ttttaaaaaat	cataattaag	1860
	caaaaatata	tgccatgct	taaacatatt	taagataaat	taagtgattt	ggcctgtttc	1920
	agtatcccaa	ctcacatgct	aacaggggct	tgacctgtag	ctacgggtacc	ctggaggaaa	1980
	tgatcgcat	tatttggtta	tttcgggtcta	agtagtaata	gttctgtcct	gggaaaaaga	2040
40	ctagcctcaa	ggcattttctg	attgaatggt	tttcaattac	agtctttaaa	ccagtatgcc	2100
	acagaactgg	ctctttccac	atgacggcct	ttgtgggtggg	tggcagattg	ccctgaggcc	2160
	tcgcaaaatg	ctaggctttc	acaatgtcac	tgactgacag	ccaggcccag	cacagtcttg	2220
	gtgtgattgt	ggggctaaag	ttattccacc	ttgtgcaata	gctacagcct	tctctaacca	2280
	gctgcattct	tataaaagta	gaagaaaata	cttttttttt	tttgagatgg	attctcgctc	2340
45	tggtgcccag	gctggagtgc	aatggtgcga	tctcggtctg	ctgcaacctc	cgctcctggg	2400
	gttcaaacga	ttctcctccc	tcagaccccc	gagtagctgg	gattgcaggt	gcctgccacc	2460
	acgcccgggt	aacttttttg	tatttttagt	ggagacgggg	tttcaccatc	ttcgtcaggc	2520
	tggtctcaga	ctcctgacct	caagtgatct	gcccgcctca	gcctcccaaa	atgctgggat	2580
50	tacaggcatg	agctactgtg	cccggccaaa	gaaaaatactt	tttatgccag	ccctgaaact	2640
	accctgaagc	acatacatca	accttgaggc	ctcacactcc	atcaagaggg	gtgaagggca	2700
	tgagggaatta	gaaagcatag	ggatttttag	ttagacagat	ctggttcaaa	tcctagactt	2760
	gtgccttgaa	caaattattt	accctcattg	aactctagat	tcattatttg	taaaatgaaa	2820

55

60

65

ES 2 312 450 T3

	gacaataata	gttatctcca	aaggaaagtt	gaatatgata	attcatttat	tcattaattc	2880
	aacattttatt	attgcctact	ttgtgccagg	ttctattcta	ggaactaagg	gatacaactt	2940
	tgaataggca	aaatctctgc	tctcctgaag	tttacttttt	tttttttttt	ttgagacaga	3000
5	gtttcactct	tgtaacccag	gctggagcgc	aatgggtgctc	ttggctcact	gcaacctcca	3060
	cctcctgggt	tcaagtgatt	ctcttgcttc	agcctcccaa	gtagctggga	ctacaggtat	3120
	gtgccaccac	gcccggctat	ttctgcattt	ttagtagaga	tggggtttca	ccatggtggc	3180
	cagactgggc	tcaaactcct	gatctcaggt	gatatgcctg	tcttggcctt	ccaaagtact	3240
10	gggattacag	gcctgagcca	ctgcacctga	cctgaagttt	atgttctatt	aaatagcaac	3300
	agacagtaac	ataaaccaaa	aataaatagg	aaaacacccat	aacaaaaatc	aaacagtgat	3360
	ataattgaga	gttgcttcta	tttctttttg	ttgtcttctt	ggttcaatca	gcctgctaaa	3420
	ctatatggaa	cctcattttc	atgggccact	tatttaagcc	gggggacctt	ggaaagtctc	3480
	tcatgtctct	catctcaacg	gcctaattgtg	acttctcttg	aaatatttgg	acatttagcag	3540
15	gaagctgagg	ctttacatca	gatctttact	ttaatgggtg	acttgacttt	actggtagat	3600
	ttttaggctc	tgtgtggact	gtggagatga	tatctggggg	gcaggcagac	acttgccttg	3660
	cctctgtctg	agaaaattct	gttttggtatg	tcttgttgaa	gttgggtgctg	gcacccctaag	3720
	cccttgctgg	ggctcgtaatt	taattcatca	gaatgtgtgg	cttgcaagaa	cgggctcaga	3780
	tcttgcscct	caaaaaacaaa	acatgagcgt	gccaaagaa	tccaaggtgt	tgaatgttgc	3840
20	cacttcaagc	ctaaactttc	taggaacacc	taagtgggtg	gcagcttcca	gttctccagg	3900
	ctgcttctag	gccagagctg	ggttccacaa	gagacagaat	aggcatatat	atgcttaagg	3960
	aactggaaaa	acaggctctc	tctctctcac	aaacacacac	acacacatac	taaggtagct	4020
	gtcaaaatgt	tatccgaaat	tttgaacca	aaaaatcttg	aaagatggta	ttccaatc	4080
25	acatttttat	taagttttct	attatatttg	attcaaatca	cgattcgagg	ccacaagctt	4140
	taagaattca	gggccttttt	aacttgccaa	gccccacacc	actccaggaa	cttccccaca	4200
	ccccagttct	cagaattcat	gtgcaaggtc	tttctctaat	ccagggtcca	ggtcagagag	4260
	tggaggatgt	gctctatttc	ttacctgatt	gcagaccctt	ctgacagtgc	tcccttctga	4320
	agcactcact	gtctgaacgt	acacagtctc	agacttaatc	atgcacagtg	agcaagactg	4380
30	tgggtgtgata	attggcgctc	ctgacttatt	agggcaaatc	tatgggaggg	ggagacctcc	4440
	tggaccactg	agcaattaat	tcattttacat	taggaagtgt	ctccgtcaga	tgcaggaaaa	4500
	aaatcttggt	ttcctgctgt	ggttttgact	tttgcccat	cttctgttgc	tgttgttagga	4560
	ggcaaaataa	gggtcaaggc	ctggaacac	aagtgccttg	actgaagctc	cacttggtct	4620
35	ccgaagccca	agctgggttg	taccaggttc	cctagggtgc	aggtgtgtgg	caactgccag	4680
	ggacatgtgc	ctgcccaccg	gcctctggcc	ctcactgagt	tggccaatgg	gaaatgacaa	4740
	ttgtgagggtg	gggactgcct	gcccccgctga	gtaccaggct	gttgaggctg	ggccactctc	4800
	tcctcacttc	cattctgact	gcagtctgtg	gttctgattc	cataccagag	ggtaagagca	4860
	attctgtgaa	gttccaggct	gggtggggga	tgcattgcata	gcctctggct	gggatcacc	4920
40	aggctctccc	gtccgtagta	gtgtgggagt	ggatcacagt	ggatactctg	gtcagagcag	4980
	cactggtgga	ggcagatatg	cactgggctt	cttctccgt	tctccacacg	ccccagaga	5040
	gaaagggtta	tttcagacat	tccttctaag	atgcatggaa	ccattctgaa	ttttaccag	5100
	ttcgctctgt	agcaggatac	ctattgagaa	aaagttaggg	tcagtaaggt	ggaagggtct	5160
	gtccacagat	gaagtccaat	tcgattaagg	gggataaggg	aatacattgt	ctcttagctt	5220
45	gaccaggtag	ggcaaaggaa	gaagcatata	tgaaggcagc	ttcagaaaag	tcaagctgag	5280
	cactgacttc	agactggaat	taggaatcca	gctctgccac	tttattctac	tcagcaata	5340
	tttactgagc	aaattctatg	ggctagacag	tggattgggt	tcacaagata	caatgagtgt	5400
	gacatgggtg	ttgtctatgg	atttggggat	atatgtaggt	atagggatat	cttacaaggt	5460
50	aatcaagagg	ttctaattgag	gccagccatg	gtggctcaca	cctgtaatcc	cagcaatttg	5520
	ggagaccgag	gcgggtggat	cacctgaggt	caggagttcc	agactagcct	gaccaacatg	5580
	gtgaaacccc	gcctctacca	aaaatacaaa	aattagtttg	gcgtgatggc	aggtgcctgt	5640
	aatcccagct	tctcgggagg	ctgaggcagg	agaattgtct	gaacctggga	ggcagaggtt	5700
	gcagtgagcc	gagattgttg	ccactgcatt	ccagcctggg	tgacagagcg	agactttgtg	5760
55	tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaag	aaagaaaaga	aaaagaggct	ctaattgagat	aaaatgagaa	5820
	aagcctggca	tgtagtggca	acttatgaaa	aattgtaatt	aaaaaaaaaac	atcttctgac	5880
	agaagaaaact	ggatctacct	ggtttttctg	aagcctaate	ctgctcgccc	cagtgagtgc	5940
	tgtttctgag	gcaccttggt	tgttttgagc	tgtggatgct	gaaggtaga	gtgggaggga	6000
60	tttttagagg	taggtctgcc	cctcttgtgt	tagaggacat	ggatccctgg	tctggagagg	6060
	ttctgggttt	tggatcaagc	ctcacaaggg	gtggcaccac	ctcactccta	ggaactccgc	6120
	tagaagggaag	gccagctctg	cctaattcgg	ttggggagat	gggggtccct	ttatgctagc	6180
	agaatatgtc	cgaaggagca	tgatggtgtc	agctttgttc	atgaaggcca	gtggtacaca	6240
	gggagcccgg	cagcttccct	agcagtcctt	gctgccactc	ttccttaagt	cttgaggagt	6300
65	cttttttttg	cacaatctca	gctcactgca	acctccgctt	cccaggttca	agcgattctc	6360
	ctgcctcagt	ctcccaagta	gctgagacta	caggcatgcg	ccaccacgcc	cagctaattt	6420
	ttatatTTTT	agtagagatg	gggttcacca	tattggccag	gatggtctcg	atctcttgac	6480

ES 2 312 450 T3

	ctcatattcc	acctgcctcg	gcctcccaaa	gtgctgggtat	tacagggtgtg	agccactgcg	6540
	cctggccgag	gagtcttaag	ctgagatcac	agcattgcac	tccagcctgg	gcaaaaagag	6600
	caaaaactcca	tctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	tagacacaag	actggctcct	tgtctttttt	6660
5	ggggacaggg	tctcactcta	tcacccaggc	tggagtgcag	tgggtgcaatc	acagctcact	6720
	gcagcctcga	tttcccaggc	tcaagtgacc	ctcccactctt	agcctcctga	gtagctggga	6780
	ctacagggtgt	gtgcaaccat	gcctggctaa	tttttaaaaa	ttttttgtag	agatgagggtc	6840
	tcactatatt	ggctgggggg	cctcaaaactc	ctgggctcag	cagtccctccc	acctcagcct	6900
	cccaaaaggc	tgggattata	tgcttgctct	ttttaagggtg	gctgtaggga	caaactttcc	6960
10	acctactcct	tgtcaagcca	gtggaccggg	gggtcccagac	atacggctaa	agtcaagagg	7020
	tgatgtcttt	tggagagata	ctttcaatca	ggaatttcaa	tcagaaattc	aatcatgtgg	7080
	agagagactt	atcctaaaaa	tgtggtgggtg	cgtgggatgc	tctgttttat	tagttccttg	7140
	acagtatgta	tgtgtgtgag	tgtgtgtgtg	tgcgcgcgca	cactcatattg	gatgggtgtg	7200
15	tatgtgtgtg	gggggggtgg	gcgtacgtat	gtggatgtgt	ggatgtgggtg	tgtgggtgtg	7260
	cgcgtgcata	ggtggagggtg	tgtgtatggg	tgcgggtatg	tgtgtgtgtt	gggcatggag	7320
	atattgacag	ctctcccagg	gctgagtga	ggctttcggg	caaagctcct	gggagctagg	7380
	caaagctgag	ttgattcctg	gttatgccat	ttattattgg	gttgaccctg	gtgaaactgc	7440
	caatatctta	cactttgact	tttattttatt	tttatttttta	ttttttttga	gacagagttt	7500
20	cacattgtgc	aacctaggctg	gagtgcagtg	cgcgcactctc	agctcactgc	aacctctgcc	7560
	tcatggattc	agtgattctt	cctgcctcag	ccctcccaagt	agctggaatt	acaggtgcc	7620
	gctaccacgc	ctgactaatt	tttgtattttt	tggtagagac	gggatttcac	catgttgtcc	7680
	aggctggctc	gaaactcctg	acatcaggta	atccaccac	ctcagcctcc	caaagtgtctg	7740
25	ggattacagg	catgagccac	tgcgcccggc	ccattttgac	ttttaaaaat	gggagtttga	7800
	tataattcaa	tccagtgggt	gaattagcta	gcctcgttcc	ctctccaagt	ctcaggttct	7860
	cctacacgtt	agagtcaaaa	gcagggctat	gggaagatta	agtaaaataa	attttgaaaa	7920
	tgccttatga	aaattacact	ccaaagaact	cgcgccagtg	tcagtgttct	catgttcctc	7980
	atctcacatg	atcacatttc	gcggattagg	aagctgagtc	tgagaagctc	cgtgtagtgc	8040
30	tttttcggag	gcaccgtgat	gtgatggaag	gctcactcgt	taggaagtca	gaacagagtc	8100
	tctgagggat	catttcctta	atctgtcagt	ttcctcatct	ctgaagtgtg	gctcatttcc	8160
	ttccttcatg	gagttattgt	aaagatgaag	ataaataacg	tgtaaaatct	agcatgggaa	8220
	ctggcttcta	taaggttcta	ataagtgcac	tcctactcct	tcccctcagc	cttcccattt	8280
35	gtaaaagcaa	ggcaggggtg	aggtgatttc	tggggctcct	tttggtctctg	acatttgagg	8340
	attttgtatc	cttttttttt	tcagagtcct	gctctgtcac	ccaggttggg	gtgcagctca	8400
	atgcaaatc	cgcctcccag	gctcaagcaa	ttcttatgtc	tcagcctcct	gagtacctgg	8460
	gattacaggc	aggcaaccac	acccccagct	aattttttgt	attttcagta	gagacgggg	8520
	tttgccatat	tggccagggt	ggctctgaac	tcctgacttc	atgtgaccca	cccatctcag	8580
40	cctcccaaa	tgtctgagatg	acagggtgtga	gctaccgtgc	ctggccaatt	ttgtgtgctt	8640
	taatgccctt	ttctgtctgga	agagttggca	ccaggtttgg	tgatctcttt	ccccacacg	8700
	gctctgcctc	ctgccagtc	cagaggggac	cctgtccttg	catttcacag	gattctgctg	8760
	ttgcaactga	aattccagta	ggtcaaagtg	aaatttctca	tacactttaa	catgaagata	8820
	aatgatcaca	gtatggccct	ttaggatcct	gagaacatca	cggtcacccc	ctggtataat	8880
45	tttaaaagca	gatgaatcca	tgcctgtgcg	aggtttgcca	ggaaagccag	tgctgggatt	8940
	acagtggaa	tcttttttatg	ctactttttt	cttgtatccc	tcaccccatg	gggtggcata	9000
	ttgaaaggca	ggatgtgtga	ccacgatact	tttctcctcc	tggactatgt	ctaagagtct	9060
	gttattgggt	tctgaagatc	agagtttaat	ttccgactcc	tctctgtgta	gctctgggat	9120
50	cttgaaagc	cacttaacct	ttctgaagtc	cccttctctc	atctctaata	tgcatacact	9180
	catcactaac	atttactgag	cactgacatg	tgcagacac	cattctaagc	attttacaca	9240
	gactacacca	tttgatcttc	caacaaacag	aacactgaaa	cgcattacag	gtcagaacaa	9300
	atgattttgtg	cctaagcacc	aagaccgtag	agcccgctg	ccctattcta	ccctatcctg	9360
	tctctcaaaa	tgattgtgag	aatcgaatga	gacactaggt	gagaaaagg	ttttataaat	9420
55	agcattttta	aaattttttta	aagtccacaa	aattttttaat	tttaatacag	ataaaaataga	9480
	tccctttgtt	ttataaaaaag	taacaaaatt	tgttatataa	caactatgtt	atttattaat	9540
	tttgccctttt	tgtatgctgc	caggaaagaa	acattaagaa	atcttaaat	gattatgggtg	9600
	aatcagaagg	tctgcctgga	ctttttattg	ctctaactgt	acagctgatc	atactacctc	9660
60	attttttttt	atgacacttc	aagggtgcgc	ttagcttcat	cactccttcg	ttgcaaaaag	9720
	ctttgtgacc	aaaaacaatt	aagcagattc	ctgagtcact	aaatgacaca	taaccagagt	9780
	tgagacttag	gaactttttag	tgccatgcta	agccacacag	gacacaacaa	atagcattttt	9840
	acaaaggcaa	agaattgtga	cacttgagat	ttagcttggt	gatccttgta	aaagttttct	9900
	ttttaggcat	aattgagttt	tagatcatag	tactcactat	tacttagtaa	taattttttt	9960
65	ctgatagaaa	tacagtgtaa	caggccgggc	gcagtggctc	atgcctgtaa	tcccagcact	10020
	ttgggaggcc	gaggcgggcg	gatcacttga	ggtcaggagt	ttgagaccag	cccggccaac	10080
	atggtgaaat	cccatctcta	ctaaaaatac	aaaaaattag	ccaggtgtgg	tcgtggattc	10140

ES 2 312 450 T3

	ctgtgatccc	agctacttgg	gaggggtgagg	caggagcatc	agttgaaccc	aggaggcgga	10200
	ggttgacagt	agccaagatg	gtgccattgc	actccagcct	gggccacaaa	gcgagactcc	10260
	acttcagaaa	caaaaaaaaa	aagagagaga	gagaaaaaaa	ggaaggaaag	aaggaaggaa	10320
5	ggaaaagaagg	aaggaaggaa	ggaaaagaagg	aaggaaggaa	ggaaggaaag	aaggaaggaa	10380
	ggaaaagaagg	aaggaaggaa	agaaggaaagg	aaggaaggaa	ggaagggttaa	caagcaaagt	10440
	gtaacaatgg	caatatctaa	aaaaataggt	atTTTTtata	gtttgtcgtt	ttatatatat	10500
	gacccccact	ttagagatga	ggaaactgag	agattaagga	aacgatccct	gagagactct	10560
	gttctgactt	ccaaatcggg	gagctttcca	tcgcatcacg	gtgcctccga	aagcatgaca	10620
10	cggagcttct	cagacttagc	ttcctaatac	gctaaccggg	attatgtgag	atgaggaaca	10680
	tgagaacgct	gacatgggtg	aggggtccct	ggagtatcat	tttcatgttg	catttttcaa	10740
	acttatttta	cctaatactt	ccaaagccct	gcttttgact	ctaagtgtgc	tcctgagact	10800
	tggagagcgc	aagatgctag	cgacagagca	agactccatc	tccagataaa	taaataagta	10860
15	aaataaaaaa	gaacacaaat	aattttgaaa	atTTTTttga	aaattaggca	cgtttgact	10920
	gaccttcaat	tgttattaat	tgctggtttc	ccaccagaaa	ttaagttgga	atgcaacttt	10980
	cttttacaat	cagagtccgt	tcttggtctt	ggaaacttct	gaggtcctg	tgctaataccc	11040
	actcttgat	ttttggcacc	tctaccccg	gccactgtca	tggaacccag	gctgatcgca	11100
	cctattagtg	gagaaatmtg	tcataatac	tgaagtttgg	ggacaaacag	tgttccctta	11160
20	gggtaggaga	aagagatctt	tatttttaac	aaagggggag	gagccagaaa	actccagaga	11220
	cccctgagtt	tgccctctct	ccaaggtttg	gggtaagccc	cccgtcacc	tttatctctg	11280
	gggctttcac	atattctgga	ttctctcttc	ctgtttccca	gcagaaaagg	atggagcctc	11340
	acagattctt	cccatttctg	gagaaaaaca	tgcatggagc	tcaaagttct	tctcaggagt	11400
25	tttattgcca	aagccataat	aagaaagggt	ggaggtgaca	agcagtgagg	aagtttaaa	11460
	atgcatgaaa	tctgtaaagt	ctcagaacaa	gaattctcct	aaaatgcaaa	aggggctttg	11520
	ctggtctccc	cttggtctct	catgtagctc	acctcttttt	tcttatcttg	agactagtca	11580
	aacctaagct	gtttctcatt	ttatttccag	aagctattga	gaacactctc	ctgaattctt	11640
	caaattcagt	agagggcgac	aaatgtacat	ataaatgatg	gtagtgggtc	ttaaataaag	11700
30	actcatgaca	cctaaagggg	cagcacctga	gtctgattgc	acctgtttct	gttgctgttt	11760
	ctgtctctct	tctctctgtc	tgccatttca	ttatcaatgg	ttactttact	tataagatca	11820
	tattagaacc	tgatatttga	ttaatgatgc	atcagatcta	tagtgagaga	aaaaattaat	11880
	gcaattaaag	gtgttgtaac	agctagtctt	caagtgggga	gaaatcattt	gagtacctta	11940
35	ggtcacagct	tacatcaaaa	caaaaaatca	gagctacatt	aaaaagtga	attttaacta	12000
	tatcaaacaa	tagaaaaaaa	cagaagaaaa	ttgaatactt	actaaatctt	agcatgata	12060
	agaactgttt	aacacttaga	ggcaaggact	ggcgtggtg	gctcatgctt	ttaatcccag	12120
	gactttggga	gccaaggcg	ggcggatcac	ctgaggtcag	gagtttgaga	ctagcctggc	12180
	caacatgggtg	aaaccccgct	tctactaaaa	aatgcaaaaa	ttagctgcgt	gtgggtggtg	12240
40	atgcctgtaa	tctcagctac	ttgggaggct	aaggcatgag	aatcgcttga	acctgggagg	12300
	tggaggctgt	agtgagccga	gattgtgcca	ctgcactaca	gcctgggtga	cagtgtgaaa	12360
	tcctctctct	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agcaaaactag	agcagtgagg	taccattatt	12420
	tcctttgctc	actaaactga	caacacacaa	atgtttttta	taatacccaa	agctgatgag	12480
	ggtagttaag	gtatgccctt	ttatacacac	actaatgatg	tactactggt	tggcagtata	12540
45	acatatgctg	ccatgtgggg	atatgtatca	ggagacttaa	aaatgtgcat	accttttggt	12600
	ccagtaattt	acttctggga	atctgtcata	acagaataat	aatcttgggg	aaagctacat	12660
	gcctaaggat	attttaaaata	ttatttaaaa	atcaaagtat	aatttcttac	agaatataaa	12720
	ataatatttt	aaaatgaaaa	tatgctaaaa	gtttgatgaa	atataaatgg	tcaaataat	12780
50	attgattata	tccacttact	agactgacac	tcactctgag	acgttaaaaa	tagtcattat	12840
	aaaaactaga	aaatgccaaa	gacaaaataa	aggaataaag	ttttacataa	agtatgattc	12900
	cactatgttt	aaaaataaac	agagacattc	ttggagttga	gtattgtttt	cttttctgtc	12960
	atgtccaaag	aactatataa	ctattatttt	taatgaacta	tatatgtaat	atatacatat	13020
	agttttatat	tatatacaaa	atttatctca	tatatatgat	aaagatgaaa	gatgagttgg	13080
55	atgtgccacg	tgaagtgggt	agtatagaaa	cccaggtaat	ggggcatagg	agtgggattc	13140
	cagataccag	gcccattgtt	ttgggggtgag	attgccaatc	acggctcttc	ttccatccct	13200
	cacagaggag	taggtttgtc	ttcaacaaac	cttcagttgt	cctgaagaca	aacctaatc	13260
	tggagacttc	atataatcta	gaagagacaa	gcaaactgat	gaaaaatagt	gaatttttaa	13320
60	ggtaaaaata	agtacatgga	ctacactttg	tttagaatca	gattcttggg	attaaccaca	13380
	tttaaccaca	gagggcttta	gtgatgcttc	taatccagga	tcctaggacc	tatttctctc	13440
	tgtgagatgc	tttctcccaa	ctccttggtg	agagtgggaa	gactaagacc	tcagcaatct	13500
	gaggtggagg	cctaagatcc	ccctaagatc	ggaggcagaa	tctgagaggg	gataaaagtc	13560
	cctataccctg	tattgggccc	tttctgggga	gggggatatc	aaagaatgat	tttgagacag	13620
65	ggaggctttt	gactacctgt	gccacttgag	ctcttttgcta	gggctccaga	atcatatttt	13680
	caaatacatt	ccccctccct	ccttctcttc	ctcttccact	cttctctttt	atcttctctt	13740
	cttcttttcc	ttctctcttc	ccttctcttc	tctggctctc	tcatgatttc	ttttctctcat	13800

ES 2 312 450 T3

	tataaaagtg	cttatttagt	ccctactctg	ctattagtgt	gttagtcttt	gtcccctggt	13860
	acttgctggt	taatggagaa	atgggtgagc	aaaacagaaa	ttacagcaga	gtgcaataat	13920
	agagctaagc	caggtgtata	aatccattct	cacactgctg	taaaaaacta	ctgggtaatt	13980
5	tataaagaaa	agaggtttaa	ttgactcaca	gttccacagg	ctgtacagga	agcatggctg	14040
	gggaggcctc	agaaaactta	caatcatggt	ggaagaaaga	gcgaagggga	agcaagcaca	14100
	tcacacagca	gcaggagaga	gagagagaaa	gagagagaga	gagaatatag	gggaagtgtc	14160
	acacactttc	aaccagatct	tgtgagaatt	cacctactat	catgagaaca	gcaagggata	14220
	agtctgcctc	catgattcag	tcacctcta	ccaggcccct	tctccaacac	atgtcgacgt	14280
10	gctatttggg	tggggacaca	gacccaaacc	atattaccag	ggcactggag	aaacacagag	14340
	gggaaagaac	cagccaagga	gtgagatgga	gaacaaggag	gacttcttga	aacagatgac	14400
	atccaaactg	ggtcctgaaa	gctgaataga	gattagacag	gggaggaggg	gcagctaaag	14460
	atggctcagg	caaacaaagg	gccaggggat	atgttcattg	gatgatgtgt	ctctcggtgt	14520
15	ctgcttaaca	caaggtgagt	ctctccctcc	ctctctctct	ctttttctct	gtgtgtgttt	14580
	gtgtgtgtgc	atgtgtgcaa	atgtaatata	cccaatagtc	aaacatgtgc	cccaggagag	14640
	gggtagagga	agaaagagaa	tgagagagta	agaaggagga	atagacacag	aaaatgagag	14700
	agaagggggg	aaagaaaaag	aagaaaggag	ccagaggaga	gaagctgggt	agcattgaat	14760
	ggagcaatct	gtgtcatcgt	acttgggaaa	cccaaggatg	gattcttggc	aagtcgactc	14820
20	ttggagcttt	cctgtgcttt	ggtcctgtgc	tcagacatgg	gaaaattaga	ggagtgtcat	14880
	ctgtgcaatc	actgaattca	taatcttggg	gaggaaagga	gactacacac	agggaataat	14940
	gctaagtatt	acagatttca	gggcagaaag	agatcaaggt	gggctgcaat	attcagaaaa	15000
	gtcttcctgg	aaaagttgaa	tacttagaaa	gcagctccta	gaagtagact	ctgctgagat	15060
25	ggacggagtc	ctttgtaggt	cccaactggg	tgtgtgtgtg	gggtctgtct	ctccatggcy	15120
	gacagtgcac	atgtggattc	cagggctcag	gatgctgttg	ctgggagctg	ttctactgct	15180
	attagctctg	cccgkcatg	accaggaaac	cacgactcaa	gggcccgag	tcctgcttcc	15240
	cctgcccaag	ggggcctgca	caggttggat	ggcgggcac	ccagggcac	cgggccataa	15300
	tggggcccca	ggcctgtatg	gcagagatgg	cacccctggt	gagaaggggt	agaaaggaga	15360
30	tccaggtaag	aatgtttctg	gcctctttca	tcacagacct	cctacactga	tataaactat	15420
	atgaagkcat	tcattattaa	ctaaggccta	gacacaggga	gaaagcaaag	cttttttatg	15480
	ttaaccataa	gcaacctgar	gtgatttggg	gttggtcttc	caaggatgag	tgtagatggg	15540
	gcctctataa	ccaagacttt	ggctttgctg	catctgcagc	tccttttcca	tcaccttccc	15600
35	catcttcacc	ctcatcccta	ttcccagtac	attcatattc	tgattcctct	ttctgtctgc	15660
	ttaacttcca	tttcacccag	tggcattcaa	ccacatttac	tgcacacccc	ctgaaaggct	15720
	cagtccctgcc	tttggggaac	tcttgatcta	ggtaagatgt	ctaattgtga	aggctctggt	15780
	ggtggttacc	acaagaaagt	ctactctaaa	aatgtcaaac	tgaatgtgaa	caagtattca	15840
	aagtattggag	catagagaaa	atrtactcac	cgtggacctg	atgaagaatg	aaggcttcaa	15900
40	ggaggaggca	gagcttcagc	taggccttga	atgatgggta	ggcagaatag	aggaggagag	15960
	acatcctaga	tggagggggt	agaattgcaa	aaccaggggt	gatggtgcca	gcacataaag	16020
	ggctggcagg	gtggagggtc	tatgatagag	acctatagga	gataaagata	gagttgaaat	16080
	tatgggagcc	tccatgtctg	tgggagatat	agaaggagga	ggtaacacct	ctctcctttt	16140
	gggagctctt	attggtttct	tgatctataa	gtcaagaagg	ttgtgagtgg	gagccacagg	16200
45	gatggtaatt	taggctgtaa	ccaacctagg	caggagtctc	gttctttgta	gtcactgagg	16260
	tcttctcatt	ccttaggtct	tattggctct	aaggagagaca	tcggtgaaac	cggagtaccc	16320
	ggggctgaag	gtcccggagg	cttccgggga	atccaaggca	ggaaaggaga	acctggagaa	16380
	ggtgcctatg	tataccgctc	agcattcagt	gtgggatttg	agacttacgt	tactatcccc	16440
50	aacatgccca	ttcgctttac	caagatcttc	tacaatcagc	aaaaccacta	tgatggctcc	16500
	actggtaaat	tccactgcaa	cattcctggg	ctgtactact	ttgectacca	catcacagtc	16560
	tatatgaagg	atgtgaagg	cagcctcttc	aagaaggaca	aggctatgct	cttcacctat	16620
	gatcagtacc	aggaaaataa	tgtggaccag	gcctccggct	ctgtgctcct	gcactctggag	16680
	gtgggcgacc	aagtctggct	ccagggtgat	ggggaaggag	agcgtaatgg	actctatgct	16740
55	gataatgaca	atgactccac	cttcacaggc	tttcttctct	accatgacac	caactgatca	16800
	ccactaactc	agagcctcct	ccaggccaaa	cagccccaaa	gtcaattaaa	ggctttcagt	16860
	acgggttagga	agttgattat	tatttagttg	gaggccctta	gatattattc	attcatttac	16920
	tcattcattt	attcattcat	tcatcaagta	actttaaaaa	aatcatatgc	tatgttccca	16980
	gtcctgggga	gcttcacaaa	catgaccaga	taactgacta	gaaagaagta	gttgacagtg	17040
60	ctattttgtg	cccactgtct	ctcctgatgc	tcatatcaat	cctataaggc	acagggacaa	17100
	agcatttctc	gttttttaca	gattgtatcc	tggaggtgag	agagttaagt	gaatgtctaa	17160
	ggtcacacaa	gtattaagtg	acagtgcctg	aaatcaaacc	cagagctgtg	gactttgttc	17220
	actagactgt	gcccttttat	agaggtaacat	gttctctttg	gagtgttggt	aggtgtctgt	17280
	ttcccacctc	acctgagagc	cattgaattt	gccttcctca	tgaattaaaa	cctcccccaa	17340
65	gcagagcttc	ctcagagaaa	gtggttctat	gatgaagtcc	tgtcttgtaa	ggactactac	17400
	tcaatggccc	ctgcactact	ctacttcctc	ttacctatgt	cccttctcat	gcctttccct	17460

ES 2 312 450 T3

	ccaacgggga	aagccaactc	catctcctaag	tgctgaactc	atccctgttc	ctcaaggcca	17520
	cctggccagg	agcttctctg	atgtgatata	cacttttttt	tttttttgag	atggagtctc	17580
	actctgtcac	ccaggctgga	gtacagtgac	acgacctcgg	ctcactgcag	cctccttctc	17640
5	ctgggtccaa	gcaattattg	tgccctcagc	tcccagtag	ctgagacttc	aggtgcattc	17700
	gctggtctcg	ggctaatttt	tgtattttta	gtagaaatgg	ggtttcgtca	tgttgccag	17760
	ttacaggcat	aactcctggc	ctaggtgate	caccgcctc	gacctccaa	agtgtcggga	17820
	agtccctgggt	gagccaccat	gccagtcga	tatctcactt	tttattttgc	catggatgag	17880
10	gcttccgtca	gtgaggaaca	cctcccacca	ggctagaggc	aactgcccag	gaaggactgt	17940
	cttgaatccc	cctctaaatc	ccttgcatat	ccttgataaa	tgccctcatga	agaccaatct	18000
	atccacagaa	gtatctaccc	agaattaact	ccattccagt	ctctgcatgt	aatcagtttt	18060
	ctggacaata	acattttcat	tttaggaaat	ccctgggttt	aagtatcaat	ccttgttcag	18120
	cagaattttt	tgaatctttt	ccactgaagt	tagggatgac	tgtgattttc	agaacacgtc	18180
15	gaagccattg	catcaagaag	gtagcttgag	cctgaaatgc	aaaacccatg	gaggaattct	18240
	tattgttctt	tctccttgag	taccaacagg	gtcaggggag	actgggcctc	ctgaatttat	18300
	acaataactc	taagaattac	aggttgagg	agttgatggg	ggtaaacatt	ctctcaggag	18360
	tatcaatata	cagtgtatgt	cttcaaagat	tttagcaaaa	acagagtaaa	tagctattctc	18420
20	ctctcttaca	taaatttaaa	aaactatctt	tttgcttaca	gttttaaatc	ctgaacaatt	18480
	tctttttgtt	tgtgtattgc	taatcattaa	tgtattattt	tttccacata	taaagctttg	18540
	cagtggcatg	gttgttgttg	tttttaagat	ggagtttccc	tctgttgcca	ggctagagt	18600
	ctcagcctcc	atctcggctt	actgcaacct	ttgcctccca	ggttcaagcg	attcttctgc	18660
	attttttagta	cgagtagctg	ggaccacagg	tgccaccac	catgccaggc	taatttttgt	18720
25	gtgatctgcc	aagacagggt	ttcaccatat	tggccaggct	ggctctgaac	tcctgacctt	18780
	agagggatga	cacctccatt	tttgttggtt	ttttttgaga	aagatagata	tgagggttag	18840
	attcacaaca	agaggtgaga	gtaagccttg	tgttagtcag	aactctgtgt	tgtgaatgtc	18900
	aatggaaac	gaaaacccaa	aatattatgc	aaactactgt	aagcaagaaa	aataaaggaa	18960
30	cttccgcagt	atttattcct	ttgcataata	gaaattacca	gagttgttct	gtccttagat	19020
	cgatatcaaa	ccaaagctca	aaacaatcaa	gacccttttc	tgtatgtcct	tctgttctgc	19080
	aaatggacat	gtaggcttta	ccctcagggt	ctacacagta	tagttctagg	gtttccctcc	19140
	atgccccagc	aagactgtgg	cctgcccagc	tctcgtatcc	ccaagccaca	ccatctggct	19200
35	gaccaatcac	catgttttct	gggtgatgcc	aaagaggaga	gaggaagctc	cttttccag	19260
	ggggatgta	aatgttaacc	ttgcatctca	ttgctctggc	tgagttgtgt	gcctgttctt	19320
	agtgatgat	tgagtcagg	ggatgaaata	ttcatattga	cttaattgca	gcttaagtta	19380
	ctttcatgag	gaggtatttt	ccctaaagca	aaattgggac	actgttatca	gaaataggag	19440
40	tcaacaagta	agatgcaaaa	taatacctgt	ccacaacaaa	ctcttaatgc	tgtgtttgag	19500
	ttacagaaca	tttccagag	agacatagct	ggaaaattcc	tattgatttt	ctctaaaatt	19560
	aaccagaggc	gctaaagtct	ggctatgctc	acagtctcac	atctgggttg	gggtgggctcc	19620
	agatttcagg	cgctttcaca	gttaccctaa	actctctggg	gcagggttat	tcctttgtgg	19680
	tcttttagttc	acagagagag	tcaactgagg	ccaaaagagg	cctgagagaa	actgaggtca	19740
45	tgtttagtat	attaatgggtc	ctgtgatgct	ttgaagtaca	attgtggatt	tgtccaattc	19800
	tatctgtgat	tgtcagcttt	tgcttcataat	attttagcgc	tctattatta	gatatataca	19860
	aaettccctt	tggtgcattt	tggtgcattt	actctcttat	cattatgtaa	tgtccttctt	19920
	tttcccttct	aattttctgt	gttctgaagt	ctactttgtc	taaaaataac	atacgcactc	19980
	ctctccttct	tctttcttcc	ttcctttctt	tcttccctcc	tttctttctc	tctctctctc	20040
50	accatgagca	tttcccttcc	tttcttctct	ctctctctct	ctctctctct	ttttgacaga	20100
	tgccgccagc	gtggccctgg	ctggagttca	gtggtgtgat	cttggctcac	tgctacctct	20160
	ggtttcaaac	attctcctgc	ctcagcctcc	caagttagctg	gaactacagg	ctcatgccac	20220
	agggatgagc	taatttttgt	atttttcgtt	gagacggggg	ttcaccacat	tcgtcagggt	20280
55	tttccatcat	gtgatccacc	cgccctcgcc	tccttgcagg	ctgggattac	20340	
	actgcatgta	catcacacct	gggtcaactt	cttttgatta	gtgtttttgt	gggtatatctt	20400
	tttagacaat	gttactttta	atatacttat	attattgtat	ttaaaatgtg	tttcttacag	20460
	ttgctgttca	ggtgggtata	atttttatcc	agtctaaaaa	tatctgtctt	tttaattggtg	20520
	ttcataatat	ttatatctta	tttattttatt	gaattttaaga	tggtatgactg	ttttatttgt	20580
60	atattttgcc	ccacttctgt	tttattctct	ttccagaatt	cttttggatt	gtttaaatat	20640
	ctttctttta	tttatctttaa	tttattttatt	gggtattttgc	ctatatctct	ttgtgggtatt	20700
	caatgttatg	tttttagtgg	tgcttgaggg	attacaatgt	acttaacttt	tcacagtgtg	20760
	aaaatacata	acttgtaggt	gtcattatata	ggcttataat	catatttagta	cctctatcca	20820
		atattttgag	gtcattatata	ttacatctat	atacactgaa	acattatagg	20880
65		ttcagatatt	catcat	tatatatatt	ttaaagaatt	taagaggaga	20940
							20960