

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 430**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04763138 .7**

96 Fecha de presentación: **08.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1644406**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Uso de productos de proteínas segregadas DG153 para prevenir y tratar enfermedades pancreáticas y/u obesidad y/o síndrome metabólico**

30 Prioridad:

11.07.2003 EP 03015883
22.07.2003 EP 03016710

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

10.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

73 Titular/es:

DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
MARIE-CURIE-STRASSE 7
37079 GÖTTINGEN, DE

72 Inventor/es:

ONICHTCHOUK, DARIA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 430 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de productos de proteínas segregadas DG153 para prevenir y tratar enfermedades pancreáticas y/u obesidad y/o síndrome metabólico.

Esta invención se refiere al uso de proteínas DG153 de bajo peso molecular, al uso de polinucleótidos que las codifican, en el diagnóstico, estudio, prevención y tratamiento de enfermedades pancreáticas seleccionadas de diabetes (por ejemplo, diabetes sacarina), obesidad y/o síndrome metabólico. También se describe el uso en regeneración de tejidos tales como tejidos pancreáticos y otros.

Muchas proteínas humanas sirven como compuestos farmacéuticamente activos. Diversas clases de proteínas humanas que sirven como tales compuestos activos incluyen hormonas, citocinas, factores de crecimiento celular y factores de diferenciación celular. La mayoría de las proteínas que se pueden usar como compuesto farmacéuticamente activo se encuentran dentro de la familia de las proteínas segregadas. Las proteínas segregadas se producen en general dentro de las células en el retículo endoplasmático rugoso, después se exportan al complejo de golgi y después se trasladan a vesículas secretoras o gránulos, donde se segregan al exterior de la célula vía exocitosis. Ejemplos de proteínas segregadas usadas comercialmente son: insulina humana, agentes trombolíticos, interferones, interleucinas, factores de estimulación de colonias, hormona del crecimiento humano, factor de crecimiento transformante beta, activador del plasminógeno de tejidos, eritropoyetina y otras diversas proteínas. Los receptores de proteínas segregadas, que son proteínas unidas a membranas, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Es importante, por lo tanto, desarrollar nuevos compuestos farmacéuticos para identificar proteínas segregadas en que se pueda ensayar la actividad en una variedad de modelos animales. Así, a la luz del papel dominante de las proteínas segregadas en la fisiología humana, existe la necesidad de identificar y caracterizar nuevas funciones para proteínas segregadas humanas y los genes que las codifican. Este conocimiento permitirá detectar, tratar y prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones por el uso de proteínas segregadas o los genes que las codifican.

El páncreas es un órgano esencial que posee tanto una función exocrina implicada en el suministro de enzimas al aparato digestivo como una función endocrina por la que se segregan diversas hormonas en el torrente circulatorio. La función exocrina se asegura por células acinares y centroacinares que producen diversas enzimas digestivas y conductos intercalados que transportan estas enzimas en disolución alcalina al duodeno. La unidad funcional del páncreas endocrino es el islote de Langerhans. Los islotes se dispersan por la porción exocrina del páncreas y están formados por cuatro tipos de células: alfa, beta, delta y células PP, revisado por ejemplo en Kim S. K. y Hebrok M., (2.001) *Genes Dev.* 15: 111-127. Las células beta producen insulina, representan la mayoría de las células endocrinas y forman el núcleo de los islotes, mientras que las células alfa segregan glucagón y se sitúan en la periferia. Las células delta y las células PP son menos numerosas y segregan somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente.

Se ha estudiado el desarrollo pancreático temprano en diferentes especies, incluyendo pollo, pez cebra y ratones (para una revisión detallada, véase Kim & Hebrock, 2.001, *supra*). El páncreas se desarrolla a partir de distintos depósitos dorsales y ventrales. El desarrollo del páncreas requiere especificación de la estructura del páncreas a lo largo de los dos ejes anterior-posterior y dorsal-ventral. Se ha identificado una serie de factores de transcripción, que son críticos para el desarrollo pancreático apropiado (véase Kim & Hebrok, 2.001, *supra*; Wilson M. E. et al., (2.003) *Mech Dev.* 120: 65-80).

En seres humanos postnatal/adultos, las células acinares y ductales retienen una capacidad proliferativa significativa que puede asegurar la renovación y el crecimiento celulares, mientras que las células de islotes llegan a ser en su mayoría mitóticamente inactivas. Esto contrasta con los roedores donde la replicación de células beta es un mecanismo importante en la generación de nuevas células beta. Se ha sugerido, que durante el desarrollo embrionario, los islotes pancreáticos de Langerhans se originan de la diferenciación de células ductales u otras células con morfología epitelial (Bonner-Weir S. y Sharma A., (2.002) *J Pathol.* 197: 519-526; Gu G. et al., (2.003) *Mech Dev.* 120: 35-43). En seres humanos adultos, surgen nuevas células beta en la proximidad de los conductos (Butler A. E. et al., (2.003) *Diabetes* 52: 102-110; Bouwens L. y Pipeleers D. G., (1.998) *Diabetologia* 41: 629-633). Sin embargo, también se ha sugerido una posición intraislote o un origen en la médula ósea para células precursoras de células beta adultas (Zulewski H. et al., (2.001) *Diabetes* 50: 521-533; Janus A. et al., (2.003) *J Clin Invest.* 111: 843-850). El crecimiento de los islotes pancreáticos es dinámico y responde a cambios en demanda de insulina, tales como durante el embarazo o durante el aumento de masa corporal que tiene lugar durante la infancia. En adultos, hay una buena correlación entre masa corporal y masa de los islotes (Yoon K. H. et al., (2.003) *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 2.300-2.308).

La insulina segregada en células beta pancreáticas, que se estimula por altos niveles de glucosa en sangre. La insulina entre otras hormonas desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo energético. La insulina conduce al almacenamiento de glucógeno y triglicéridos y a la síntesis de proteínas. La entrada de glucosa en los músculos y las células adiposas se estimula por la insulina. En pacientes que padecen de diabetes sacarina, la cantidad de insulina producida por las células de islotes pancreáticos es demasiado baja, dando como resultado

elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). En la diabetes de tipo 1 las células beta se pierden debido a destrucción autoinmunitaria. En pacientes diabéticos de tipo 2, las células hepáticas y musculares pierden su capacidad para responder a niveles de insulina en la sangre normales (resistencia a la insulina). Altos niveles de glucosa en sangre (y también altos niveles de lípidos en sangre) conducen a una deficiencia de función de las células beta y a un aumento en la muerte celular programada de células beta. Es interesante observar que la proporción de neogénesis de células beta no parece cambiar en diabéticos de tipo 2 (Butler et al., 2.003, supra), produciendo así una reducción en la masa total de células beta con el tiempo. Finalmente la aplicación de insulina exógena llega a ser necesaria en diabéticos de tipo 2.

Mejorar los parámetros metabólicos tales como los niveles de azúcar en sangre y lípidos en sangre (por ejemplo, por cambios en la dieta, ejercicio, medicación o combinaciones de los mismos) antes de que la masa de células beta haya caído por debajo de un umbral crítico conduce a una restauración relativamente rápida de la función de células beta. Sin embargo, después de dicho tratamiento la función endocrina pancreática permanecería afectada debido a la velocidad de regeneración sólo ligeramente aumentada.

En diabéticos de tipo 1, la vida de los islotes pancreáticos disminuye enormemente debido a la destrucción autoinmunitaria. Se han ideado tratamientos que modulan el sistema inmunitario y pueden detener o reducir mucho la destrucción de islotes (Raz I. et al., (2.001) Lancet 358: 1.749-1.753; Chatenoud L. et al., (2.003) Nat Rev Immunol. 3: 123-132). Sin embargo, debido a la regeneración relativamente lenta de células beta humanas dichos tratamientos sólo podían tener éxito completamente en la mejora de la afección diabética si se combinan con un agente que pueda estimular la regeneración de células beta. Así, tanto para diabetes de tipo 1 como de tipo 2 (estadios temprano y tardío) hay una necesidad de encontrar nuevos agentes que estimulen la regeneración de células beta.

La diabetes es una enfermedad muy invalidante, debido a que las medicaciones no controlan los niveles de azúcar en sangre suficientemente bien para evitar oscilaciones entre niveles de azúcar en sangre altos y bajos. Los pacientes con diabetes corren el riesgo de mayores complicaciones, incluyendo cetoacidosis diabética, insuficiencia renal terminal, retinopatía diabética y amputación. También hay una gran cantidad de afecciones relacionadas, tales como: síndrome metabólico, obesidad, hipertensión, cardiopatía, enfermedad vascular periférica e infecciones, para las cuales las personas con diabetes corren un riesgo sustancialmente aumentado. El tratamiento de estas complicaciones contribuye en un grado considerable al enorme coste que se impone por la diabetes en los sistemas de cuidado de la salud en el mundo.

La obesidad es uno de los trastornos metabólicos más común en el mundo. Aún es una enfermedad humana comprendida de manera deficiente que llega a ser un problema de salud principal cada vez más importante para la sociedad occidental. La obesidad se define como un peso corporal mayor que el 20% en exceso del peso corporal ideal, dando como resultado con frecuencia una deficiencia significativa de la salud. La obesidad se puede medir por el índice de masa corporal, un indicador de la adiposidad o gordura. Más parámetros para definir la obesidad son los contornos de cintura, el espesor de los pliegues cutáneos y la bioimpedancia. Se asocia con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes sacarina tipo II, hiperlipidemia y una tasa de mortalidad aumentada. La obesidad está influenciada por factores genéticos, metabólicos, bioquímicos, psicológicos y de comportamiento y que puede ser producida por diferentes razones tales como diabetes no dependiente de insulina, aumento de triglicéridos, aumento de energía ligada a los carbohidratos y bajo gasto de energía (Kopelman P. G., (2.000) Nature 404: 635-643).

El concepto de 'síndrome metabólico' (síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, cuarteto mortal) se describió por primera vez en 1.966 por Camus y se reintrodujo en 1.988 por Reaven (Camus JP, 1.966, Rev Rhum Mal Osteoartic 33: 10-14; Reaven et al. 1.988, Diabetes, 37: 1.595-1.607). Hoy, el síndrome metabólico se define comúnmente como agrupamiento de factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, obesidad abdominal, altos niveles en sangre de triglicéridos y glucosa en ayunas así como bajos niveles en sangre de colesterol HDL. La resistencia a la insulina aumenta enormemente el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico (Reaven, 2.002, Circulation 106: 286-288). El síndrome metabólico con frecuencia precede al desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Lakka H. M., 2.002, JAMA 288: 2.709-2.716). El control de niveles de lípidos en sangre y niveles de glucosa en sangre es esencial para el tratamiento del síndrome metabólico (véase, por ejemplo, Santomauro A. T. et al., (1.999) Diabetes, 48: 1.836-1.841).

Los factores moleculares que regulan la absorción de alimento y el equilibrio del peso corporal no se comprenden de manera completa. Incluso si se han descrito diversos genes candidatos que se supone que influyen en el sistema o los sistemas homeostáticos que regulan la masa/peso corporal, como leptina o el coactivador del receptor gamma activado del proliferador de peroxisoma, no se conocen los distintos mecanismos moleculares y/o moléculas que influyen en la obesidad o regulaciones de peso corporal/masa corporal.

Hay una necesidad en la técnica anterior de la identificación de genes candidatos que se expresen de manera específica en el desarrollo temprano en ciertos tejidos pancreáticos. Estos genes y las proteínas codificadas de ese modo pueden proporcionar herramientas para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos pancreáticos graves y

trastornos relacionados. Por lo tanto, esta invención describe proteínas segregadas que se expresan de manera específica en los tejidos pancreáticos temprano en el desarrollo. La invención se refiere al uso de estos genes y proteínas en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de disfunciones pancreáticas, tales como diabetes y otras enfermedades relacionadas tales como obesidad y/o síndrome metabólico. Estas proteínas y genes son especialmente útiles en procesos de regeneración, tales como regeneración de las células del páncreas.

En este documento, se describe un factor segregado referido como DG153 que está implicado en el desarrollo del páncreas, regeneración y en la regulación de la homeostasis energética.

Se describió que el ARNm que codifica la proteína DG153 de bajo peso molecular se expresaba en el hígado humano (véase Kawamoto et al., Gene 1.996 174: 151-158). Se demostró que la proteína rica en arginina altamente conservada mutaba en diferentes tumores malignos, tales como carcinomas de células renales, tumores malignos pancreáticos, de pulmón, mama y próstata y en carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (Shridhar et al., Oncogene 12, 1.931-1.939 (1.996), Shridhar et al. Cancer Res. 56, 5.576-5.578 (1.996), Shridhar et al., Oncogene 14, 2.213-2.216 (1.997)). Las mutaciones asociadas a estos tumores malignos parecen estar centradas en una repetición de trinucleótidos imperfecta que codifica supuestamente un tramo de 15 a 18 argininas. La asociación de estas mutaciones con el cáncer sugiere que la supuesta proteína puede ser un factor de crecimiento que desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y el desarrollo celular. No hay disponibles más datos funcionales en la técnica anterior científica para esta proteína.

Sin embargo, la proteína DG153 y los posibles usos adicionales en diferentes indicios de enfermedad se desvelan en diversas solicitudes de patente: Por ejemplo, se describe DG153 como proteína de respuesta a tensión por cizallamiento, humana, útil en el diagnóstico, tratamiento e investigación de enfermedades vasculares causadas por arteriosclerosis, incluyendo insuficiencia cardíaca, reestenosis post-PTCA e hipertensión (véase la patente internacional WO 01/25427). La solicitud de patente internacional WO 02/74956 describe una proteína idéntica en un 98% como útil para tratar enfermedades neurodegenerativas (tales como enfermedad de Parkinson o enfermedades de Alzheimer). Se describe una proteína idéntica en un 97% en la patente internacional WO 02/90541 útil para el diagnóstico de trastorno del comportamiento o evaluación de la probabilidad de desarrollo de trastorno de comportamiento (como Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad o trastornos intelectuales). La proteína precursora (179 aminoácidos) se describe en la solicitud de patente internacional WO 01/19851 para tratar enfermedades o trastornos del sistema nervioso (tales como enfermedad de Parkinson) y para trasplantar células en el sistema nervioso. Un fragmento de aminoácido 180 de DG153 se describe en la patente internacional WO 01/70174 como que es útil para modular la angiogénesis y/o muerte celular programada para prevenir o tratar el cáncer, infarto de miocardio y fomentar la curación, por modulación de la actividad de polipéptido del gen modulado por el factor de crecimiento endotelial vascular.

De acuerdo con esto, el presente documento se refiere a proteínas segregadas con nuevas funciones en los procesos de metabolismo humano, regeneración y desarrollo pancreático. El presente documento describe genes y proteínas específicos codificados de ese modo y efectores/moduladores de los mismos implicados en la regulación de la función pancreática y el metabolismo, especialmente en enfermedades pancreáticas tales como diabetes sacarina, por ejemplo diabetes sacarina dependiente de insulina y/o diabetes sacarina no dependiente de insulina, y/o síndrome metabólico, obesidad y/o trastornos relacionados tales como cardiopatía coronaria, trastorno de la alimentación, caquexia, hipertensión, hipercolesterolemia (dislipemia), fibrosis hepática y/o cálculos biliares. Además, se describen genes específicos y proteínas codificadas de ese modo y efectores/moduladores de los mismos implicados en la modulación, por ejemplo, estimulación de desarrollo pancreático y/o regeneración de células o tejidos pancreáticos, por ejemplo células que tienen funciones exocrinas tales como células acinares, células centroacinares y/o células ductales y/o células con funciones endocrinas, en particular células en islotes de Langerhans tales como células alfa-, beta-, delta- y/o PP, más en particular células beta.

En esta invención, usamos una criba para factores segregados expresados en el desarrollo de páncreas de mamífero (ratón), como se describe con más detalle en la sección Ejemplos (véase el Ejemplo 1). Esta criba identificó la DG153 como factor segregado expresado en el desarrollo de páncreas de ratón. La presente invención describe proteína DG153 de mamífero y el polinucleótido que codifica la misma, en particular DG153 humana, como que está implicada en las afecciones y los procedimientos mencionados anteriormente.

El presente documento se refiere a polinucleótidos de DG153 que codifican polipéptidos con nuevas funciones en el desarrollo y la regeneración de tejidos pancreáticos y así en enfermedades pancreáticas de mamíferos (por ejemplo diabetes) y también en la regulación del peso corporal, homeostasis energética y obesidad, fragmentos de dichos polinucleótidos, polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos o fragmentos de los mismos. También se describen vectores, células huésped y métodos recombinantes para producir los polipéptidos y polinucleótidos. Además se describen efectores/moduladores de polinucleótidos y/o polipéptidos de DG153, por ejemplo anticuerpos, ácidos nucleicos biológicamente activos, tales como moléculas antihebra complementaria, moléculas de ARNi o ribozimas, aptámeros, péptidos o compuestos orgánicos de bajo peso molecular que reconocen dichos polinucleótidos o polipéptidos.

Se puede obtener por lo tanto codificación de proteínas homólogas de DG153 y moléculas de ácidos nucleicos de especies vertebradas. Se prefieren en particular ácidos nucleicos que codifiquen las proteínas DG153 humanas y variantes de las mismas. La invención se refiere en particular a moléculas de ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos que contribuyan a la regulación de la homeostasis energética y el metabolismo de mamíferos, en el que dichas moléculas de ácidos nucleicos son como se define en la reivindicación 2. La función de la DG153 de mamífero en el metabolismo se validó por análisis de la expresión de las transcripciones en diferentes tejidos y por análisis del papel en la diferenciación de los adipocitos.

Estudios del perfil de expresión (véanse los Ejemplos para más detalle) confirman la relevancia particular de DG153 como regulador del metabolismo energético en los mamíferos.

El análisis PCR cuantitativo (Taqman) reveló que DG153 se expresa en diversos tejidos de mamífero, con los niveles de expresión más altos en los testículos. Además, DG153 se expresa altamente en tejido activo metabólico tal como tejido adiposo blanco (TAB) comparado con otros tipos de tejidos en ratones de cepa natural como se representa en la Fig. 2A. BAT es un tejido bien caracterizado que se desarrolla bien en mamíferos recién nacidos, incluyendo seres humanos. Un cometido importante del BAT es generar calor y mantener la homeostasis de temperatura corporal en el recién nacido. Así, una expresión de la proteína DG153 en tejidos adiposos es confirmar un papel en la regulación del metabolismo, en particular homeostasis energética y termogénesis.

Se usaron modelos de ratón de resistencia a la insulina y/o diabetes, tales como ratones que soportan destrucciones de genes en la ruta de la leptina (por ejemplo, ratones ob/ob (leptina) o db (receptor de leptina/ligando)) para estudiar la expresión de DG153. Tales ratones desarrollan síntomas típicos de la diabetes, muestran acumulación hepática de lípidos y con frecuencia presentan niveles de lípidos en plasma aumentados (véase Bruning et al, 1.998, Mol. Cell. 2: 559-569). Se encontró, por ejemplo, que la expresión de DG153 está fuertemente regulada hacia abajo en tejido activo metabólico (TAB) en ratones obesos inducidos de manera genética (ob/ob) comparado con ratones en ayunas (véase la Fig. 2B). Estos datos soportan además un papel esencial de DG153 en la regulación del metabolismo de los mamíferos, en particular en procedimientos relacionados con la obesidad o el síndrome metabólico.

La expresión de ARNm de DG153 se examinó también en ratones de cepa natural susceptibles (por ejemplo, C57Bl/6) que muestran síntomas de diabetes, acumulación de lípidos y altos niveles de lípidos en plasma, si se alimentan con una dieta rica en grasa. En esos ratones, la expresión de DG153 está significativamente regulada hacia abajo en TAB que soporta el hallazgo en ratones ob/ob. Además, la expresión de DG153 está regulada hacia arriba en BAT y tejidos musculares. Estos resultados confirman un papel de DG153, está implicada en la regulación del metabolismo de los mamíferos (véase la Fig. 2C).

Además, se demuestra (véanse los Ejemplos y las Figs. 2D-2F) que la proteína DG153 tiene que estar regulada hacia abajo para que los preadipocitos se diferencien en adipocitos maduros. Con respecto a cambios en la intensidad de la expresión durante la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, se puede observar una ligera reducción en la intensidad relativa de la señal para DG153 durante el programa de diferenciación in vitro de 3T3-L1 (véase la Fig. 2D). Por lo tanto, la proteína DG153 podía desempeñar un papel esencial en la adipogénesis. Los resultados sugieren un papel como modulador de la adipogénesis.

Las micromatrices son herramientas analíticas usadas de manera rutinaria en bioanálisis. Una micromatriz presenta moléculas distribuidas sobre, y asociadas de manera estable con, la superficie de un soporte sólido. El término "micromatriz" se refiere a una disposición de una pluralidad de polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos u otros compuestos químicos sobre un sustrato. Las micromatrices de polipéptidos, polinucleótidos y/o anticuerpos se han desarrollado y han encontrado uso en una variedad de aplicaciones, tales como control de la expresión de los genes, descubrimiento de fármacos, secuenciación de genes, cartografía genética, identificación bacteriana y química combinatoria. Un área en particular en que encuentran uso las micromatrices es en el análisis de la expresión de los genes (véase el Ejemplo 4). La tecnología de las matrices se puede usar para explorar la expresión de un único gen polimórfico o el perfil de expresión de un gran número de genes relacionados o no relacionados. Cuando se examina la expresión de un único gen, se emplean matrices para detectar la expresión de un gen específico o sus variantes. Cuando se examina un perfil de expresión, las matrices proporcionan una plataforma para identificar genes que son específicos del tejido, se ven afectadas por una sustancia que se esté ensayando en un ensayo de toxicidad, son parte de una cascada de señalización, realizan funciones de mantenimiento o están relacionadas de manera específica con una predisposición genética, afección, enfermedad o trastorno, particular.

Las micromatrices se pueden preparar, usar y analizar usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Brennan, T. M. et al. (1.995) Patente de EE.UU. N° 5.474.796; Schena, M. et al. (1.996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10.614-10.619; Baldeschweiler et al., solicitud de patente internacional PCT WO 95/251116; Shalon, D. et al., solicitud de patente internacional PCT WO 95/35505; Heller, R. A. et al. (1.997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 2.150-2.155; Heller, M. J. et al. (1.997) Patente de EE.UU. N° 5.605.662). Se conocen diversos tipos de micromatrices y se describen cuidadosamente en Schena, M., ed. (1.999; DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Londres).

Se pueden usar oligonucleótidos o fragmentos más largos procedentes de cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente memoria como elementos en una micromatriz. La micromatriz se puede usar en técnicas de formación de imágenes de transcripción que controlan los niveles relativos de expresión de grandes números de genes al mismo tiempo como se describe más adelante. También se puede usar la micromatriz para identificar variantes genéticas, mutaciones y polimorfismos. Esta información se puede usar para determinar la función de los genes, para comprender la base genética de un trastorno, para diagnosticar un trastorno, para controlar la progresión/regresión de la enfermedad como una función de la expresión genética y para desarrollar y controlar las actividades de agentes terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad. En particular, esta información se puede usar para desarrollar un perfil farmacogenómico de un paciente para seleccionar el tratamiento más apropiado y eficaz para ese paciente. Por ejemplo, se pueden seleccionar agentes terapéuticos que son muy eficaces y muestran los menores efectos secundarios para un paciente basándose en su perfil farmacogenómico.

Cuando se determina por análisis de micromatrices, DG153 muestra expresión diferencial en adipocitos primarios humanos. Se observa una regulación hacia abajo acerca de la expresión de DG153 es durante la diferenciación de 3T3-L1 de murina (Fig. 2E) y adipocitos humanos (véase la Fig. 2F). La proteína DG153 en los preadipocitos presenta el potencial para inhibir la diferenciación adiposa en una fase muy temprana. Por lo tanto, la proteína DG153 podía desempeñar un papel esencial en la adipogénesis. Los resultados sugieren un papel de la DG153 en la regulación en el metabolismo humano, por ejemplo, como efector/modulador (por ejemplo, inhibidor) de la adipogénesis. Así, DG153 es un fuerte candidato para la fabricación de una composición farmacéutica y un medicamento para el tratamiento de afecciones relacionadas con el metabolismo humano, tales como diabetes, obesidad y/o síndrome metabólico.

También se describen polinucleótidos que codifican la proteína DG153 y proteínas homólogas. De acuerdo con esto, cualquier secuencia de ácidos nucleicos, que codifique las secuencias de aminoácidos de la proteína DG153 y proteínas homólogas, se puede usar para generar moléculas recombinantes que expresen las proteínas. Se apreciará por los expertos en la materia que como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas, algunas soportando una homología mínima para las secuencias de nucleótidos de cualquier gen conocido y que se encuentra en la naturaleza.

También se describen secuencias de polinucleótidos que pueden hibridarse para las secuencias de nucleótidos y en particular, los del polinucleótido que codifica las proteínas DG153, en diversas condiciones de rigor. Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (T_f) del complejo o sonda de unión a ácido nucleico, como se explicó en Wahl & Berger (1.987; Methods Enzymol. 152: 399-407) y Kimmel (1.987; Methods Enzymol. 152: 507-511) y se puede usar a un rigor definido. Preferiblemente, la hibridación en condiciones rigurosas significa que después de lavar durante 1 h con 1 x SSC y SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 62°C y lo más preferiblemente a 65°C, en particular durante 1 h en 0,2 x SSC y SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 62°C y lo más preferiblemente a 65°C, se observa una señal de hibridación positiva. Las secuencias de ácidos nucleicos modificadas que codifican las proteínas incluyen deleciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos dando como resultado un polinucleótido que codifica la misma proteína o una funcionalmente equivalente.

Las proteínas codificadas también pueden contener deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos, que producen un cambio silencioso y dan como resultado proteínas funcionalmente equivalentes. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas se pueden hacer sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliicidad y/o la naturaleza anfipática de los restos siempre que se retenga la actividad biológica de la proteína. Además, se describen fragmentos peptídicos de las proteínas o derivados de las mismas tales como péptidos cíclicos, péptidos retro-inversos o miméticos peptídicos con una longitud de al menos 4, preferiblemente al menos 6 y hasta 50 aminoácidos.

También se describen alelos de los genes que codifican la proteína DG153 y proteínas homólogas. Como se usa en la presente memoria, un 'alelo' o 'secuencia alélica' es una forma alternativa del gen, que puede resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos. Los alelos pueden dar como resultado ARNm modificados o polipéptidos cuyas estructuras o función puede o puede no ser modificada. Cualquier gen determinado puede presentar ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios en las mutaciones comunes, que dan lugar a los alelos, se atribuyen en general a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede tener lugar solo o junto con los otros, una o más veces en una secuencia determinada.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican DG153 y proteínas homólogas se pueden extender utilizando una secuencia de nucleótidos parcial y empleando diversos métodos conocidos en la técnica para detectar secuencias aguas arriba tales como activadores y elementos reguladores.

Para expresar una proteína biológicamente activa, las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas o equivalentes funcionales, se pueden insertar en vectores de expresión apropiados, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los métodos,

que son conocidos para los expertos en la materia, se pueden usar para construir secuencias que contengan vectores de expresión que codifiquen las proteínas y los elementos de control de transcripción y traducción apropiados. Los elementos reguladores incluyen por ejemplo un activador, un codón de iniciación, un codón de detención, un elemento regulador de la estabilidad del ARNm y una señal de poliadenilación. La expresión de un polinucleótido se puede asegurar por (i) activadores constitutivos tales como la región del activador/potenciador de Citomegalovirus (CMV), (ii) activadores específicos de tejidos tales como el activador de insulina (véase Soria et al., 2.000, Diabetes 49: 157), activador de genes SOX2 (véase Li et al., (1.998) Curr. Biol. 8: 971-974), activador Msi-1 (véase Sakakibara et al., (1.997) J. Neuroscience 17: 8.300-8.312), activador de cadena pesada de miosina cardíaca alfa o activador del factor natriurético atrial humano (Klug et al., (1.996) J. Clin. Invest 98: 216-224; Wu et al., (1.989) J. Biol. Chem. 264: 6.472-6.479) o (iii) activadores inducibles tales como el sistema inducible de tetraciclina. Los vectores de expresión también pueden contener un agente de selección o gen marcador que confiere resistencia a los antibióticos tales como los genes resistentes a la neomicina, higromicina o puromicina. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. Tales técnicas se describen en Sambrook, J. et al. (1.989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. y Ausubel, F. M. et al. (1.989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

En una realización más de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas o recombinantes que codifican las proteínas pueden estar ligadas a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión.

Se puede utilizar una variedad de sistemas vector de expresión/huésped, como se conoce en la técnica, para que contengan y expresen secuencias que codifiquen las proteínas o las proteínas de fusión. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos, recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus, retrovirus); sistemas celulares de plantas transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, VMC; virus del mosaico del tabaco, VMT) o con vectores de expresión de bacterias (por ejemplo, Ti o plásmidos PBR322) o sistemas celulares animales.

La presencia de secuencias de polinucleótidos en una muestra se puede detectar por hibridación y/o multiplicación de ADN-ADN o ADN-ARN usando sondas o porciones o fragmentos de dichos polinucleótidos. Los ensayos basados en la multiplicación de ácidos nucleicos implican el uso de oligonucleótidos u oligómeros basados en las secuencias específicas para el gen para detectar transformaciones que contienen ADN o ARN codificador de la correspondiente proteína. Como se usa en la presente memoria 'oligonucleótidos' u 'oligómeros' se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y tantos como aproximadamente 60 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 15 a 30 nucleótidos y más preferiblemente aproximadamente 20-25 nucleótidos, que se puede usar como sonda o amplímero.

Una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación son conocidas para los expertos en la materia y se pueden usar en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas PCR para detectar secuencias de polinucleótidos incluyen oligomarcado, traducción de un corte, marcado terminal de sondas de ARN, multiplicación PCR usando un nucleótido marcado o síntesis enzimática. Estos procedimientos se pueden realizar usando una variedad de estuches comercialmente disponibles (Farmacia & Upjohn, (Kalamazoo, Mich.); Promega (Madison Wis.) y U. S. Biochemical Corp., (Cleveland, Ohio).

La presencia de DG153 en una muestra se puede determinar por métodos inmunológicos o medición de actividad. Se conoce en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de proteínas, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína o los reactivos para determinar la actividad proteínica. Ejemplos incluyen (por sus siglas en inglés) inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoanálisis con base monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítomos no interferentes en la proteína, pero se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Se describen estos y otros ensayos, entre otros sitios, en Hampton, R. et al. (1.990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D. E. et al. (1.983; J. Exp. Med. 158: 1.211-1.226).

Moléculas informadoras o marcas adecuadas, que se pueden usar, incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Se pueden cultivar células huésped transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican una proteína DG153, en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de dicha proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede ser segregada o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como entenderán los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos, que codifican la proteína se pueden diseñar para que contengan secuencias señales, cuya secreción directa de la proteína por una membrana celular procariota o eucariota. Se pueden usar otras construcciones

- recombinantes para unir secuencias que codifiquen la proteína para secuencia de nucleótidos que codifique un dominio polipeptídico, que facilitará la purificación de proteínas solubles. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAG (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias de ligador divisibles tales como las específicas para Factor XA o Enterocinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y la proteína deseada se puede usar para facilitar la purificación.
- Los datos descritos en la presente memoria muestran que los ácidos nucleicos y las proteínas DG153 son útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas implicadas en enfermedades pancreáticas seleccionadas de diabetes (por ejemplo diabetes sacarina tal como diabetes sacarina dependiente de insulina y/o diabetes sacarina no dependiente de insulina), obesidad y/o síndrome metabólico. Además, los datos muestran que los ácidos nucleicos y las proteínas DG153 son útiles para la modulación, por ejemplo estimulación, de desarrollo pancreático y/o para la regeneración de células o tejidos pancreáticos, por ejemplo células con funciones exocrinas tales como células acinares, células centroacinares y/o células ductales y/o células con funciones endocrinas, en particular células en islotes de Langerhans tales como células alfa-, beta-, delta- y/o PP, más en particular células beta. Por lo tanto, los usos para diagnóstico y terapéutico para los ácidos nucleicos y las proteínas descritos son los siguientes: (i) regeneración de tejidos in vitro e in vivo (regeneración para todos estos tejidos y tipos de células que componen estos tejidos y tipos de células procedentes de estos tejidos), (ii) fármaco diana de moléculas pequeñas, (iii) anticuerpo diana (fármaco diana terapéutico, de diagnóstico/anticuerpo citotóxico), (iv) marcador de diagnóstico y/o pronóstico, (v) tratamiento de proteínas, (vi) tratamiento de genes (suministro de genes/ablación de genes) y/o (vii) herramientas de investigación.
- Por ejemplo, pero no limitado a, los ADNc que codifican las proteínas descritas y en particular sus homólogas humanas pueden ser útiles en la estimulación, potenciación o regulación de la regeneración de tejidos y las proteínas y en particular sus homólogas humanas pueden ser útiles cuando se administran a un individuo con necesidad de los mismos. Las composiciones de la presente invención tendrán eficacia para tratamiento de pacientes que padecen enfermedades pancreáticas seleccionadas de: diabetes, obesidad y/o síndrome metabólico, como se describió anteriormente.
- En una realización descrita en la presente memoria, la administración de ácidos nucleicos y proteínas DG153 en una composición farmacéutica a un individuo con necesidad de los mismos, en particular un paciente humano, conduce a una regeneración al menos parcial de, por ejemplo, células pancreáticas. La composición restablecerá entonces al menos parcialmente una función pancreática normal. En un ejemplo, estas células son células beta de los islotes que comienzan después a producir insulina por sí mismas. Después de la administración de esta composición, por ejemplo, sobre una base regular, las células beta de un individuo diabético volverán a crecer para aproximarse al tamaño y número normales presentes en un individuo no diabético. Este efecto sobre el cuerpo invierte la afección de la diabetes. A medida que mejora el nivel de azúcar en sangre del individuo, la dosis administrada se puede reducir en concentración. En al menos algunos casos se puede interrumpir completamente más administración y el individuo continúa produciendo una cantidad normal de insulina sin más tratamiento. El individuo no es tratado sólo de ese modo sino que se cura completamente de una afección diabética. Además, las células beta o los precursores de las mismas se pueden tratar in vitro e implantar o reimplantar en un individuo con necesidad de las mismas. Además, se pueden regenerar otras células del páncreas in vivo y/o in vitro para curar una cierta afección.
- Los ácidos nucleicos y las proteínas DG153 son útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas implicadas en diversas realizaciones como se describe a continuación. Por ejemplo, pero no limitándose a, los ADNc que codifican las proteínas y en particular sus homólogas humanas pueden ser útiles en tratamiento de genes y las proteínas y en particular sus homólogas humanas pueden ser útiles cuando se administran a un individuo con necesidad de las mismas. Las composiciones para uso según la presente invención tendrán eficacia para tratamiento de pacientes que padecen de enfermedades pancreáticas seleccionadas de: diabetes, obesidad y/o síndrome metabólico, como se describió anteriormente.
- Los ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos, pueden ser útiles además en aplicaciones de diagnóstico, en las que se tiene que evaluar la presencia o cantidad de los ácidos nucleicos o las proteínas.
- Como se mencionó anteriormente, se pueden obtener modificaciones de la expresión de genes por diseño de moléculas antihebra complementaria, por ejemplo ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos tales como PNA, para las regiones de control de los genes que codifican DG153 y/o proteínas homólogas, es decir, los activadores, potenciadores e intrones. Se prefieren oligonucleótidos procedentes del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 del sitio de partida. De manera similar, se puede conseguir inhibición usando metodología de apareamiento de bases de "triple hélice". El apareamiento de triple hélice es útil debido a que ocasiona inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrirse de manera suficiente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras. Se han descrito en la bibliografía recientes avances terapéuticos usando AND triple (Gee, J. E. et al. (1.994) Gene 149: 109-114; Huber, B. E. y Carr B. I., Molecular and

Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N. Y.). Las moléculas de hebra complementaria también se pueden diseñar para bloquear la traducción de ARNm evitando la transcripción de unión a ribosomas. Las ribozimas, moléculas de ARN enzimáticas, también se pueden usar para catalizar la división específica de ARN. El mecanismo de acción de ribozimas implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima para ARN diana complementario, seguido por división endonucleolítica. Ejemplos, que se pueden usar, incluyen moléculas de ribozima con motivos de cabeza de martillo de ingeniería que pueden catalizar de manera específica y de manera eficaz la división endonucleolítica de secuencias codificadoras de las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Sitios de división de ribozimas específicos dentro de cualquier ARN diana potencial se identifican inicialmente escaneando en la molécula diana sitios de división de ribozimas que incluyan las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondiendo a la región de los genes diana que contienen el sitio de división se pueden evaluar por las características estructurales secundarias que pueden hacer inoperable al oligonucleótido. La conveniencia de los candidatos diana también se puede evaluar ensayando la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando ensayos de protección de ribonucleasa.

Muchos métodos para introducir vectores en células o tejidos están disponibles y son igualmente adecuados para uso in vivo, in vitro y ex vivo. Para tratamiento ex vivo, se pueden introducir vectores en hemocitoblastos tomados del paciente y propagados de manera clonal para trasplante autólogo de nuevo en ese mismo paciente. El suministro por transfección y por inyecciones de liposomas se puede conseguir usando métodos que son conocidos en la técnica. Cualquiera de los métodos terapéuticos descritos anteriormente se puede aplicar a cualquier individuo adecuado incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y lo más preferiblemente, seres humanos.

Una realización adicional de la invención se refiere a la administración de una composición farmacéutica, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos discutidos anteriormente. Tales composiciones farmacéuticas pueden consistir en ácidos nucleicos y las proteínas DG153 y ácidos nucleicos o proteínas homólogas. Las composiciones se pueden administrar solas o junto con al menos otro agente, tal como, compuesto estabilizante, que se puede administrar en cualquier soporte farmacéutico biocompatible, estéril, incluyendo, pero no limitándose a, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solo o junto con otros agentes, fármacos u hormonas. Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención se pueden administrar por cualquier número de rutas incluyendo, pero no limitándose a, medio oral, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual o rectal.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener soportes farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que faciliten la elaboración de los compuestos activos en preparaciones, que se puedan usar de manera farmacéutica. Más detalles sobre técnicas para formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado. La determinación de una dosis eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular, por ejemplo, de líneas celulares de preadipocitos o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. También se puede usar el modelo animal para determinar el intervalo de concentración apropiado y la ruta de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis y rutas útiles para administración en seres humanos. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de ingrediente activo, por ejemplo los ácidos nucleicos o proteínas DG153 o fragmentos de los mismos, que es suficiente para tratar una afección específica. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos clásicos en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal al 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación, LD50/ED50. Se prefieren composiciones farmacéuticas que presenten grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se usan en la formulación de una serie de dosis para uso humano. La dosis contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluyen el ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. La dosis exacta se determinará por el profesional habilitado, a la luz de factores relativos al individuo que requiere tratamiento. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores, que se pueden tener en cuenta, incluyen la importancia de la enfermedad, la salud general del individuo, edad, peso y género del individuo, dieta, tiempo y frecuencia de administración, asociación o asociaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y la velocidad de eliminación de la formulación particular. Las cantidades normales de dosificación pueden variar desde 0,1 a 100.000

microg, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. Se proporciona guía en cuanto a las dosis y los métodos de suministro particulares en la bibliografía y en general están disponibles para los profesionales habilitados en la técnica. Los expertos en la materia emplean diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores.

5 De manera similar, el suministro de polinucleótidos o polipéptidos será específico para células particulares, afecciones, posiciones, etc.

10 Se conoce en la técnica una variedad de protocolos incluyendo ELISA, RIA y FACS para medir proteínas y proporcionan una base para diagnóstico de niveles modificados o anormales de expresión de los genes. Los valores normales o estándar para la expresión de genes se establecen por combinación de fluidos corporales o extractos celulares tomados de individuos mamíferos normales, preferiblemente el ser humano, con anticuerpos para la proteína en condiciones adecuadas para formación de complejo. La cantidad de formación de complejo estándar se puede cuantificar por diversos métodos, pero preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades de proteína expresada en muestras de control y enfermedad, por ejemplo de tejidos de biopsias, se comparan con los valores estándar. La desviación entre los valores estándar y del individuo establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad.

20 Los polinucleótidos específicos para las proteínas DG153 y proteínas homólogas se pueden usar para fines de diagnóstico. Los polinucleótidos, que se pueden usar, incluyen secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ARN y ADN hebra complementaria y los PNA. Los polinucleótidos se pueden usar para detectar y cuantificar la expresión de los genes en tejidos de biopsias en que la expresión de los genes se puede correlacionar con enfermedad. El ensayo de diagnóstico se puede usar para distinguir entre ausencia, presencia y exceso de expresión genética y para controlar la regulación de niveles de proteínas durante la intervención terapéutica.

25 En un aspecto, la hibridación con sondas que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas o moléculas muy relacionadas, se puede usar para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína respectiva. Las sondas de hibridación de la invención objeto pueden ser ADN o ARN y proceden preferiblemente de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que codifica las proteínas de la invención o de una secuencia genómica que incluye activador, elementos potenciadores e intrones del gen que se encuentra en la naturaleza. Las sondas de hibridación se pueden marcar por una variedad de grupos informadores, por ejemplo, radionúclidos tales como ³²P o ³⁵S o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda vía sistemas de acoplamiento de avidina/biotina y similares.

35 Las secuencias de polinucleótidos específicas para proteínas DG153 y ácidos nucleicos homólogos se pueden usar para el diagnóstico de afecciones o enfermedades, que están asociadas con la expresión de las proteínas, seleccionadas de: diabetes, obesidad y/o síndrome metabólico. Las secuencias de polinucleótidos específicas para las proteínas DG153 y proteínas homólogas también se pueden usar para controlar el progreso de pacientes que reciben tratamiento para enfermedades pancreáticas (por ejemplo, diabetes), obesidad y/o síndrome metabólico. Las secuencias de polinucleótidos pueden usar ensayos cualitativos o cuantitativos, por ejemplo en análisis de Southern o Northern, dot blot u otras tecnologías a base de membranas; en tecnologías PCR o en tira reactiva, pin, ELISA o ensayos de chip utilizando fluidos o tejidos de biopsias de pacientes para detectar la expresión de genes modificada.

45 En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos DG153 pueden ser útiles en ensayos que detecten la activación o inducción de diversas enfermedades metabólicas o disfunciones. Las secuencias de nucleótidos se pueden marcar por métodos clásicos y añadir a una muestra de fluido o tejido de un paciente en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, se lava la muestra y se cuantifica la señal y se compara con un valor estándar. La presencia de niveles modificados de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas en la muestra indica la presencia de la enfermedad asociada. Tales ensayos se pueden usar también para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico particular en estudios en animales, en ensayos clínicos o en el control del tratamiento de un paciente individual.

55 Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad asociada con la expresión de las proteínas DG153 y proteínas homólogas, se establece un perfil normal o estándar para la expresión. Esto se puede llevar a cabo combinando fluidos corporales o extractos de células tomados de individuos normales, animales o seres humanos, con una secuencia o un fragmento de los mismos, que sea específico para los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención y ácidos nucleicos homólogos, en condiciones adecuadas para hibridación o multiplicación. La hibridación estándar se puede cuantificar por comparación de los valores obtenidos de individuos normales con los de un experimento donde se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores estándar obtenidos de muestras normales se pueden comparar con valores obtenidos de muestras de pacientes que son sintomáticos para la enfermedad. La desviación entre los valores estándar y del individuo se usan para establecer la presencia de enfermedad. Una vez que se establece la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, se pueden repetir ensayos de hibridación sobre una base regular para evaluar si el nivel

de expresión en el paciente empieza a aproximarse al que se observa en el paciente normal. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos se pueden usar para mostrar la eficacia de tratamiento durante un periodo que oscila de varios días a meses.

5 Con respecto a la diabetes, obesidad y/o síndrome metabólico, la presencia de una cantidad inusual de transcripción en tejido de biopsia de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad previamente a la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir que los profesionales de la salud empleen medidas preventivas o tratamiento agresivo más temprano evitando de ese modo el desarrollo o más progreso de las enfermedades o trastornos metabólicos.

10 Los usos para diagnóstico adicionales para oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias que codifican las proteínas descritas en la presente memoria y proteínas homólogas pueden implicar el uso de PCR. Tales oligómeros se pueden sintetizar de manera química, generar de manera enzimática o producir a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferiblemente en dos secuencias de nucleótidos, una con orientación de hebra transcrita (5prime.fwdarw.3prime) y otra de hebra complementaria (3prime.rarw.5prime), empleadas en condiciones optimizadas para identificación de un gen o afección específica. Los mismos dos oligómeros, series anidadas de oligómeros o incluso un conjunto de oligómeros degenerado se pueden emplear en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN estrechamente relacionadas.

15 Las secuencias de ácidos nucleicos también se pueden usar para generar sondas de hibridación, que son útiles para la cartografía de la secuencia genómica que se encuentra en la naturaleza. Las secuencias se pueden cartografiar para un cromosoma particular o para una región específica del cromosoma usando técnicas conocidas. Tales técnicas incluyen FISH, FACS o construcciones de cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones P1 bacterianas o colecciones de ADNc de cromosoma único como se revisa en Price, C. M. (1.993) Blood Rev. 7: 127-134 y Trask, B. J. (1.991) Trends Genet. 7: 149-154. FISH (como se describe en Verma et al. (1.988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York, N. Y.). Los resultados se pueden correlacionar con otras técnicas de cartografía de cromosomas físicas y datos de mapas genéticos. Se pueden encontrar ejemplos de datos de mapas genéticos en el 1.994 Genome Issue of Science (265: 1.981f). La correlación entre la posición del gen que codifica las proteínas de la invención en un mapa de cromosomas físico y una enfermedad específica o predisposición a una enfermedad específica, puede ayudar a delimitar la región de ADN asociada con esa enfermedad genética.

20 Las secuencias de nucleótidos se pueden usar para detectar diferencias en las secuencias de genes entre individuos normales, portadores o afectados. Se puede llevar a cabo un análisis de polimorfismos, por ejemplo polimorfismos de un solo nucleótido. Además, la hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y técnicas de cartografía físicas tales como análisis de unión usando marcadores cromosómicos establecidos se pueden usar para extender mapas genéticos. Con frecuencia la colocación de un gen en el cromosoma de otra especie de mamífero, tal como un ratón, puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Se pueden asignar nuevas secuencias a brazos o partes cromosómicas de las mismas, por cartografía física. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que investigan genes de enfermedades usando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez que la enfermedad o el síndrome ha sido localizado groseramente por unión genética para una región genómica particular, por ejemplo, AT a 11 q22-23 (Gatti, R. A. et al. (1.988) Nature 336: 577-580), cualquier cartografía de secuencias para ese área puede representar genes asociados o reguladores para más investigación. Las secuencias de nucleótidos también se pueden usar para detectar diferencias en la posición cromosómica debido a traslocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

25 En otra realización descrita en la presente memoria, las proteínas para uso según la invención, sus fragmentos catalíticos o inmunogénicas u oligopéptidos de los mismos, un modelo in vitro, una célula o animal modificado de manera genética, se pueden usar para colecciones de investigación de compuestos en cualquiera de una variedad de técnicas de investigación de fármacos como se define en la reivindicación 9. Una vez que se pueden identificar efectores, por ejemplo, receptores, enzimas, proteínas, ligandos o sustratos que se unen a, modulan o imitan la acción de una o más de las proteínas DG153. La proteína o fragmento de la misma empleada en tal investigación puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, en suspensión sobre una superficie celular o situada intracelularmente. Se puede medir la formación de complejos de unión, entre las proteínas DG153 y el agente ensayado. Los agentes también podían influir directamente o indirectamente, en la actividad de las proteínas de la invención.

30 Además, la actividad de las proteínas frente a su sustrato o sus sustratos fisiológicos o derivados de los mismos se podía medir en ensayos basados en células o sin células. Los agentes también pueden interferir con modificaciones postraduccionales de la proteína, tales como fosforilación y desfosforilación, farnesilación, palmitoilación, acetilación, alquilación, ubiquitinación, procedimiento proteolítico, localización subcelular y degradación. Por otra parte, los agentes podían influir en la dimerización u oligomerización de las proteínas de la invención o, de una manera heteróloga, de las proteínas de la invención con otras proteínas, por ejemplo, pero no exclusivamente, proteínas de

acoplamiento, enzimas, receptores o factores de traducción. Los agentes también podían actuar sobre la interacción física de las proteínas de esta invención con otras proteínas, que se requieren para la función de las proteínas, por ejemplo, pero no exclusivamente, su señalización aguas abajo.

5 Los métodos para determinar la interacción proteína-proteína son conocidos en la técnica. Por ejemplo, unir un péptido marcado de manera fluorescente procedente de la interacción proteína a la proteína DG153, o viceversa, se podía detectar por un cambio en la polarización. En el caso de que las dos parejas de unión, que pueden ser las proteínas de longitud total así como una pareja de unión como la proteína de longitud total y la otra representada
10 justo como un péptido se marquen de manera fluorescente, la unión se podía detectar por transferencia de energía fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés) de un fluoróforo al otro. Además, una variedad de principios de ensayo comercialmente disponibles adecuados para detección de interacción proteína-proteína es conocida en la técnica, por ejemplo pero no exclusivamente AlphaScreen (PerkinElmer) o Ensayos de Centelleo por Proximidad (SPA, por sus siglas en inglés) por Amersham. Alternativamente, la interacción de las proteínas DG153 con proteínas celulares podía ser la base para un ensayo de investigación a base de células, en que ambas proteínas están marcadas de manera fluorescente y la interacción de ambas proteínas se detecta analizando la cotraslocación de ambas
15 proteínas con un lector de imagen celular, como se ha desarrollado por ejemplo, pero no exclusivamente, por Cellomics o EvotecOAI. En todos los casos las dos o más parejas de unión pueden ser proteínas diferentes siendo una la proteína de la invención o en el caso de dimerización y/u oligomerización la propia proteína de la invención.

20 Tienen particular interés los ensayos de investigación para agentes que presentan una baja toxicidad para células de mamíferos. El término "agente" como se usa en la presente memoria describe cualquier molécula, por ejemplo proteína o compuesto farmacéutico, con la capacidad de modificar o imitar la función fisiológica de una o más de las proteínas de la invención. Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños con un peso molecular mayor que 50 y menor que aproximadamente 2.500 Daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con las proteínas, en particular enlace de hidrógeno y típicamente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden con frecuencia estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores.

30 Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, ácidos nucleicos y derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes incluyendo colecciones de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para síntesis aleatoria y directa de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, colecciones de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales están disponibles o se producen fácilmente. Adicionalmente, las colecciones naturales o producidas de manera sintética y los compuestos se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y se pueden usar para producir colecciones combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas directas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. En el caso de que el ensayo de investigación sea un ensayo de unión, una o más de las moléculas puede estar unida a una marca, donde la marca puede proporcionar directamente o indirectamente una señal detectable.

45 Otra técnica para investigación de fármacos, que se puede usar, proporciona investigación de alto rendimiento de compuestos con afinidad de unión adecuada para la proteína de interés, como se describe en la solicitud de patente internacional PCT publicada WO 84/03564. En este método, cuando se aplica a las proteínas de la invención se proporcionan o se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de ensayo pequeños, por ejemplo aptámeros, péptidos, compuestos de bajo peso molecular etc., en un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con las proteínas o fragmentos de las mismas y se lavan. Las proteínas ligadas se detectan entonces por métodos conocidos en la técnica. Las proteínas purificadas también se pueden recubrir directamente en placas para uso en las técnicas de investigación de fármacos ya mencionadas. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en un soporte sólido. En otra realización, se pueden usar ensayos de investigación de fármacos competitivos en que los anticuerpos de neutralización capaces de unir la proteína compiten de manera específica con un compuesto de ensayo por la unión de la proteína. De esta manera, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de cualquier péptido, que comparte uno o más determinantes antígenicos con la proteína.

60 Los compuestos que unen proteínas DG153, por ejemplo anticuerpos, son útiles para la identificación o el enriquecimiento de las células, que son positivas para la expresión de las proteínas de la invención, a partir de mezclas de células del complejo. Tales poblaciones de células son útiles en el trasplante, para evaluación experimental, y como fuente de linaje y productos específicos celulares, incluyendo especies de ARNm útiles en la identificación de genes expresados de manera específica en estas células y como diana para la identificación de factores de moléculas que les pueden afectar. Las células que expresan la proteína o que se han tratado con la proteína son útiles en el trasplante para proporcionar un receptor con células de islotes pancreáticos, incluyendo

65

- 5 células beta productoras de insulina, para investigación de fármacos, modelos experimentales de diferenciación de islotes e interacción con otros tipos de células; ensayos de investigación in vitro para definir factores de crecimiento y diferenciación y para caracterizar de manera adicional genes implicados en el desarrollo y regulación de islotes y similares. Las células naturales se pueden usar para estos fines o se pueden modificar de manera genética para proporcionar capacidades modificadas. Las células de un páncreas de regeneración, de intestino anterior, estómago y duodeno embrionicos u otras fuentes de células progenitoras pancreáticas se pueden usar como población de partida. Las células progenitoras se pueden obtener de cualquier especie de mamífero, por ejemplo equino, bovino, porcino, canino, felino, roedor, por ejemplo ratones, ratas, hámster, primate, etc. en particular ser humano.
- 10 En otra realización, en un método de investigación de alto rendimiento, las células se transfectan con una construcción de ADN, por ejemplo un vector vírico o no vírico que contiene un gen informador, por ejemplo el gen lacZ o el gen GFP, bajo control regulador de un activador de un gen implicado en, por ejemplo, diferenciación de células beta, por ejemplo un activador de una diferenciación de células beta para estimulación de genes, preferiblemente un activador Pax4. Las células transfectadas se dividen en alícuotas y cada alícuota se pone en contacto con una sustancia de ensayo, por ejemplo, candidato 1, candidato 2 y candidato 3. La actividad del gen informador corresponde a la capacidad del compuesto de ensayo para inducir diferenciación de células beta.
- 15 En una realización más, que se puede combinar con la investigación de alto rendimiento como se describió anteriormente, se realiza una validación de rendimiento medio. En la misma, el compuesto de ensayo se añade a hemocitoblastos que se cultivan y se determina la producción de insulina. Después de un ensayo de rendimiento alto inicial, tal como el ensayo basado en células indicado en líneas generales anteriormente en el caso de que se use por ejemplo un activador de Pax4 como marcador para regeneración de células beta, la actividad de las moléculas candidato para inducir la diferenciación de células beta se ensaya en un ensayo de validación que comprende añadir dichos compuestos al medio de cultivo de los cuerpos embrionicos. La diferenciación en células productoras de insulina se evalúa entonces, por ejemplo por comparación con células ES que expresan tipo natural y/o Pax4 para evaluar la eficacia de un compuesto.
- 20 Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas DG153 se pueden usar para generar líneas celulares transgénicas y animales. Estos animales no humanos transgénicos son útiles en el estudio de la función y la regulación de las proteínas de la invención in vivo. Los animales transgénicos, en particular los animales transgénicos mamíferos en particular, pueden servir como un sistema modelo para la investigación de muchos procesos de desarrollo y celulares comunes a los seres humanos. Una variedad de modelos no humanos de trastornos metabólicos se puede usar para ensayar moduladores de la proteína de la invención. La expresión anómala (por ejemplo, sobreexpresión o ausencia de expresión) de la proteína, condiciones de alimentación particulares y/o la administración de compuestos biológicamente activos pueden crear modelos de trastornos metabólicos.
- 30 Tales ensayos pueden usar modelos de ratones de resistencia a la insulina y/o diabetes, tales como ratones que soportan destrucciones de genes en la ruta de la leptina (por ejemplo, ratones ob (leptina) o db (receptor de leptina)), como se describió anteriormente. Además de ensayar la expresión de las proteínas en tales cepas de ratones (véanse los Ejemplos), estos ratones se podían usar para ensayar si la administración de un modulador candidato modifica por ejemplo la acumulación de lípidos en el hígado, en plasma o tejidos adiposos usando ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como FPLC, ensayos colorimétricos, ensayos de nivel de glucosa en sangre, ensayos de tolerancia a la insulina y otros.
- 40 Los animales transgénicos se pueden fabricar por recombinación homóloga en hemocitoblastos embrionicos no humanos, en el caso de que se modifique el sitio normal del gen que codifica la proteína. Alternativamente, una construcción de ácidos nucleicos que codifica una proteína se inyecta en oocitos y se integra de manera aleatoria en el genoma. Los vectores para integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus de animales, cromosomas artificiales de levaduras (los YAC) y similares. Las células o los animales modificados son útiles en el estudio de la función y regulación de la proteína. Por ejemplo, se puede hacer una serie de pequeñas deleciones y/o sustituciones en el gen que codifica la proteína para determinar el papel de los dominios particulares de la proteína, funciones en diferenciación pancreática, etc.
- 45 Además, las variantes de los genes descritos como construcciones específicas de interés incluyen moléculas de hebra complementaria, que bloquearán la expresión de la proteína de la invención o expresión de mutaciones negativas dominantes. Un marcador detectable, tal como lac Z o luciferasa se puede introducir en el sitio de los genes de la invención, en el caso de que la regulación hacia arriba de la expresión de los genes de la invención de como resultado un cambio fácilmente detectable en el fenotipo.
- 50 También se puede proporcionar expresión de los genes o variantes de los mismos en células o tejidos en que no se expresan normalmente o en tiempos anormales de desarrollo. Además, proporcionando expresión de la proteína en las células en que no se producen normalmente, se pueden inducir cambios en el comportamiento celular.
- 55 Las construcciones de ADN para recombinación homóloga comprenderán al menos porciones de los genes de la invención con la modificación genética deseada e incluirán regiones de homología para el sitio diana. Las
- 60
- 65

construcciones de ADN para integración aleatoria no requieren que contengan regiones de homología para mediar la recombinación. Convenientemente, se incluyen marcadores para la selección positiva y negativa. Las construcciones de ADN para integración aleatoria consistirán en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención, un elemento regulador (activador), un intrón y una señal de poliadenilación. Los métodos para generar células con modificaciones de genes diana por recombinación homóloga son conocidos en la técnica. Para hemocitoblastos (ES) embrionarios no humanos, se puede emplear una línea celular de ES o se pueden obtener células embrionarias recientemente de un huésped, por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias, etc. Tales células se cultivan en una capa de alimentador de fibroblastos apropiada y se cultivan en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés).

Cuando se han transfectado hemocitoblastos ES o células embrionarias o hemocitoblastos pluripotentes somáticos, no humanos, se pueden usar para producir animales transgénicos. Después de la transfección, se ponen las células en placas en una capa de alimentador en un medio apropiado. Las células que contienen la construcción se pueden seleccionar empleando un medio selectivo. Después de tiempo suficiente para que las colonias crezcan, se recogen y se analizan para el caso de recombinación homóloga o integración de la construcción. Esas colonias que son positivas se pueden usar después para transfección embrionaria y agregación de mórula. En pocas palabras, las mórulas se obtienen a partir de hembras superovuladas de 4 a 6 semanas, se retira la Zona Pelúcida y se ponen las mórulas en pequeñas depresiones de una placa de cultivo de tejido. Las células de ES se tripsinizan y las células modificadas se ponen en la depresión próximas a las mórulas. Al día siguiente se transfieren los agregados a las trompas uterinas de hembras pseudopreñadas. Se deja entonces que las hembras vayan a término. Las crías quiméricas se pueden detectar fácilmente por un cambio en el color del pelaje y se investiga con posterioridad la transmisión de la mutación en la siguiente generación (generación F1). En la cría de la generación F1 se investiga la presencia del gen modificado y machos y hembras con la modificación son apareados para producir progenie homocigótica. Si las modificaciones de los genes acusa mortalidad en algún punto del desarrollo, los tejidos u órganos se pueden mantener como injertos o trasplantes alogénicos o congénicos o cultivo in vitro. Los animales transgénicos pueden ser cualquier mamífero no humano, tal como animal de laboratorio, animales domésticos, etc., por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias, oveja, vaca, cerdo y otros. Los animales transgénicos se pueden usar en estudios funcionales, investigación de fármacos y otras aplicaciones y son útiles en el estudio de la función y regulación de las proteínas de la invención in vivo.

Las Figuras muestran:

La Fig. 1 muestra ácido nucleico y proteínas DG153 humanas.

La Fig. 1A muestra la secuencia de ácidos nucleicos de proteína DG153 humana (SEC ID N°: 1; Número de Acceso GenBank M83751).

La Fig. 1B muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de proteína DG153 humana, variante más larga (SEC ID N°: 2; Número de Acceso GenBank AAB08753).

La Fig. 1C muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de proteína DG153 humana, variante más corta (SEC ID N°: 3; Número de Acceso Swiss-Prot P55145).

La Fig. 2 muestra el análisis de expresión de proteína DG153 en tejidos y células de mamíferos. La expresión de ARN relativa se muestra en el eje de las Y, en la Fig. 2A a 2C, los tejidos ensayados se proporcionan en el eje de las X. TAB se refiere a tejido adiposo blanco, BAT se refiere a tejido adiposo pardo. En la Fig. 2D a 2F, el eje de las X representa el eje del tiempo. 'd0' se refiere al día 0 (comienzo del experimento), 'd10' se refiere al día 10 de diferenciación de adipocitos, 'd12' se refiere al día 12 de diferenciación de adipocitos.

La Fig. 2A muestra el análisis cuantitativo (PCR de tiempo real) de expresión de DG153 en tejidos de tipo natural de ratón.

La Fig. 2B muestra el análisis cuantitativo (PCR de tiempo real) de expresión de DG153 en ratones genéticamente obesos (ratones ob/ob) y ratones en ayunas (ratones en ayunas) comparado con ratones de cepa natural (ratones cn).

La Fig. 2C muestra el análisis cuantitativo (PCR de tiempo real) de expresión de DG153 en ratones alimentados con una dieta alta en grasa comparado con ratones alimentados con una dieta de control.

La Fig. 2D muestra el análisis cuantitativo (PCR de tiempo real) de expresión de DG153 en células de fibroblastos (3T3-L1) de ratón durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

La Fig. 2E muestra el análisis de micromatriz de expresión de DG153 en células de fibroblastos (3T3-L1) de ratón durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

La Fig. 2F muestra el análisis de micromatriz de expresión de DG153 en células de adipocitos abdominales humanas durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

Los ejemplos ilustran la invención:

5

Ejemplo 1: Identificación de factores segregados expresados en el páncreas.

10

Se realizó una criba para factores segregados expresados en el desarrollo de páncreas de ratón según métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo Pera E. M. y De Robertis E. M., (2.000) Mech Dev 96: 183-195) con diversas modificaciones.

Colección de ADNc de expresión:

15

Durante la organogénesis, el brote pancreático se rodea y se ve influenciado por el mesénquima asociado. (véase por ejemplo, Madsen O. D. et al., (1.996) Eur. J. Biochem. 242: 435-445 y Slack, J. M., (1.995) Development 121: 1.569-1.580). Recientemente, se sugirió que los adipocitos blancos se originaban directamente de las células mesenquimales (Atanossova P. K., (2.003) Folia Med. 45: 41-45). Durante la embriogénesis, se puede observar la inervación y vascularización del páncreas. Por lo tanto, el tejido usado en la criba podía haber contenido además de células pancreáticas algunos precursores de adipocitos, vasos sanguíneos, así como células neuronales.

20

Se preparó una colección de brotes pancreáticos 9,5-15 embrionicos de ratón en vector pCMVSPORT-6 usando Sistema de Plásmido PERSCRIPT de Invitrogen según las instrucciones de los fabricantes. Se electroporó la colección no multiplicada en células MaxEff DH10B (Invitrogen).

25

Clonación de secreción

30

Se recogieron clones de bacterias con palillos estériles de placas de agar y se cultivaron en placas de microtítulo de 96 pozos profundos en ampicilina LB (véase Sambrook et al., supra). Se mezclaron alícuotas de 8 cultivos y se aisló ADN de plásmido usando el aparato BioRobot_9600 según las instrucciones del fabricante (Qiagen; Estuche Turbo BioRobot QIAprep(r)). Se cultivaron células de cultivo celular 293 humanas en matraces para el cultivo de tejidos de 75 ml en DMEM y suero fetal bovino al 10%. A confluencia de 90-99%, se dividieron las células a una relación 1:3 y se pusieron en placas en placas de 96 pozos recubiertas de poli-D-lisina (Sigma). Se transinfectaron las células con 100-500 ng de plásmido usando lipofectamina 2.000 (Invitrogen). Después de 6 horas, se intercambió el medio por medio de crecimiento completo fresco. 24 horas después de la transfección, se lavaron las células dos veces con DMEM sin cisteína y metionina (Invitrogen), se enriqueció con suero Bovino dializado al 1% (Sigma) con 50 microgramos por ml de Heparina (Sigma) y glutamina. Se marcaron de manera radiactiva las células ('S35 Met-label', de Hartmann Analytic GmbH). Después de 12 horas, se recogieron alícuotas de los sobrenadantes en placas PCR de 96 pozos y se sometieron a electroforesis de gel SDS en geles (Biorad) Criterion de poliacrilamida de gradiente de 420% prefundidos usando condiciones de reducción, usando cámara (Biorad) de funcionamiento de gel Criterion Dodeca Cell. Se fijaron los geles en ácido acético al 10%, isopropanol al 25% durante 30 min, se remojó 15-30 min en reactivo AMPLIFY (Amersham), se secó y se expuso a película X-OMAT (AR) (Kodak). Se identificaron clones positivos y se volvieron a cultivar en placas de 96 pozos. Se preparó ADN de clones individuales y se usaron para transfección como se describió anteriormente. Si uno de los clones proporcionaba proteínas del mismo tamaño que el de la mezcla original, se identificó un clon positivo. Se secuenciaron parcialmente clones positivos desde el extremo 5' (SEQLAB, Goettingen).

45

Ejemplo 2: Identificación del ácido nucleico homólogo y proteínas DG153

50

El término "polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en el número de Acceso GenBank" se refiere al gen expresable de las secuencias de nucleótidos depositadas en el correspondiente número de Acceso GenBank. El término "número de Acceso GenBank" se refiere a entradas de bases de datos NCBI GenBank (Ref.: Benson et al., Nucleic Acids Res. 28 (2.000) 15-18).

55

Las moléculas de proteínas homólogas DG153 y ácidos nucleicos codificadores se pueden obtener por lo tanto de insectos o especies vertebradas, por ejemplo mamíferos o pájaros. En particular se prefieren ácidos nucleicos que comprenden homólogos de DG153 humanos. Las siguientes secuencias de ratón fueron identificadas en la criba de factor segregado: Mus musculus rica en arginina, mutada en tumores de fase temprana (Armet), Número de Acceso GenBank NM_029103 (ARNm de 838 pares de bases) y Número de Acceso GenBank NP_083379" (proteína de 179 aminoácidos)) y Mus musculus tipo folistatina 1 (Fst1), Número de Acceso GenBank NM_008047 y Número de Acceso GenBank NP_032073.

60

65

Se identificaron secuencias homólogas para DG153 de ratón usando el programa BLASTP 2.2.3 disponible públicamente de la base de datos de proteínas no superfluas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (véase, Altschul et al., 1.997, Nucleic Acids Res. 25: 3.389-3.402). Los mejores homólogos humanos de DG153 de ratón son genes de proteína rica en arginina de Homo sapiens (ARP) Número de

Acceso GenBank M83751 (ARNm de 1.103 pares de bases; SEC ID N°: 1; véase la Fig. 1A), Número de Acceso GenBank AAB08753.1 (proteína de 234 aminoácidos; SEC ID N°: 2; véase la Fig. 1B) y Número de Acceso Swiss-Prot P55145 (proteína de 179 aminoácidos; SEC ID N°: 3; véase la Fig. 1C). La proteína de 234 aminoácidos es una secuencia mayor con regiones ricas en arginina que se pensaba que era la diana de la mutación que causaba el cáncer.

Ejemplo 3: La expresión de los polipéptidos en tejidos de mamíferos

Para analizar la expresión del polipéptido descrito en esta invención en tejidos de mamíferos, se adquirieron diversas cepas de ratón (preferiblemente cepas de ratones C57Bl/6J, ratones ob/ob C57Bl/6 y db/db C57Bl/KS y Diabéticos No Obesos (NOD, por sus siglas en inglés) que son sistemas modelo estándar en investigación de obesidad y diabetes) de Harlan Winkelmann (33178 Borcheln, Alemania) y Taconic M & B (Germantown, NY 12526, U.S.A.), respectivamente, y se mantuvieron a temperatura constante (preferiblemente 22°C), humedad del 40 por ciento y un ciclo de luz/oscuridad de preferiblemente 14/10 horas. Se alimentaron los ratones con un pienso estándar (por ejemplo, de ssniff Spezialitäten GmbH, número de orden ssniff M-Z V1126-000). Durante el experimento en ayunas ("ratones de cepa natural en ayunas"), se privaron ratones de cepa natural durante 48 h de alimento, pero sólo se suministró agua a voluntad (véase, por ejemplo, Schnetzler et al., (1.993) J Clin Invest 92: 272-280, Mizuno et al., (1.996) Proc Natl Acad Sci 93: 3.434-3.438). En un experimento más se alimentaron ratones de cepa natural (cn) con una dieta de control (preferiblemente control mod Altromin C1057, grasa bruta al 4,5%) o dieta alta en grasa (preferiblemente alta en grasa Altromin C1057mod., 23,5% de grasa bruta). Se sacrificaron los animales a una edad de 6 a 8 semanas. Se aislaron los tejidos de los animales según procedimientos estándar conocidos para los expertos en la materia, se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se requirieron.

Para analizar el papel de las proteínas descritas en esta invención en la diferenciación in vitro de diferentes células de cultivo celular de mamífero para la conversión de preadipocitos en adipocitos, se obtuvieron células de fibroblastos de mamíferos (3T3-L1) (por ejemplo, Green & Kehinde, Cell 1: 113-116, 1.974) de la Colección Americana de Cultivo de Tejidos (ATCC, Hanassas, VA, USA; ATCC- CL 173). Se mantuvieron células 3T3-L1 como fibroblastos y se diferenciaron en adipocitos como se describe en la técnica anterior (por ejemplo, Qiu. et al., J. Biol. Chem. 276: 11.988-11.995, 2.001; Sliker et al., BBRC 251: 225-229, 1.998). En pocas palabras, se pusieron las células en placas en DMEM/FCS al 10% (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) a 50.000 células/pozo por duplicado en placas de plástico de 6 pozos y se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C. A confluencia (definida como el día 0: d0) se transfirieron células a medio sin suero (SF), conteniendo DMEM/HamF12 (3:1; Invitrogen), fetuina (300 µg/ml; Sigma, Munich, Alemania), transferrina (2 µg/ml; Sigma), pantotenato (17 µM; Sigma), biotina (1 µM; Sigma) y EGF (0,8 nM; Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza). Se indujo diferenciación por adición de dexametasona (DEX; 1 µM; Sigma), 3-metil-isobutil-1-metilxantina (MIX; 0,5 mM; Sigma) e insulina bovina (5 µg/ml; Invitrogen). Cuatro días después de confluencia (d4), se mantuvieron las células en medio SF, que contenía insulina bovina (5 µg/ml) hasta que se completó la diferenciación. A diversos instantes de tiempo del procedimiento de diferenciación, comenzando el día 0 (día de confluencia) y el día 2 (adición de hormonas; por ejemplo, dexametasona y 3-isobutil-1-metilxantina), hasta 10 días de diferenciación, se tomaron alícuotas adecuadas de células cada dos días.

Se aisló ARN de tejidos de ratón o células de cultivo celular usando Reactivo Trizol (por ejemplo, de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se purificó además con el Estuche RNeasy (por ejemplo, de Qiagen, Alemania) junto con un tratamiento de ADNasa según las instrucciones de los fabricantes y como conocen los expertos en la materia. El ARN total se transcribió de manera inversa (preferiblemente usando Transcriptasa Inversa ARNasaH- Superscript II, de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se sometieron a análisis Taqman usando preferiblemente la Mezcla Patrón 2xPCR Taqman (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania; la Mezcla contiene según el Fabricante por ejemplo ADN Polimerasa AmpliTaq Gold, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, referencia pasiva Rox y componentes del tampón optimizados) en un Sistema de Detección de Secuencias GeneAmp 5700 (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).

Los siguientes pares cebador/sonda se usaron para el análisis TaqMan (Número de Acceso GenBank NM_029103 para la secuencia DG153 de ratón): cebador delantero de DG153 de ratón (SEC ID N°: 6): 5'- AGA GAA TCG GTT GTG CTA CTA CAT TG -3'; cebador inverso de DG153 de ratón (SEC ID N°: 7): 5'- GGC TTC GAC ACC TCA TTG ATG -3'; sonda Taqman de DG153 de ratón (SEC ID N°: 8): (5/6-FAM) AGC CAC AGA TGA TGC TGC CAC CAA (5/6-TAMRA).

La función de la DG153 de mamífero en el metabolismo se validó además analizando la expresión de las transcripciones en diferentes tejidos y analizando el papel en la diferenciación de adipocitos.

Los estudios del perfil de expresión confirman la relevancia particular de DG153 como reguladores del metabolismo energético en los mamíferos. El análisis PCR (Taqman) cuantitativo reveló que la DG153 se expresa en diversos tejidos de mamífero, con los niveles de expresión más altos en los testículos en ratones de cepa natural. Además, la DG153 se expresa mucho en tejido activo metabólico tal como tejido adiposo blanco (TAB) y a niveles menores en

tejido adiposo pardo (BAT) comparado con otros tipos de tejidos en ratón de cepa natural como se representa en la Fig. 2A.

5 Usamos modelos de ratón de resistencia a la insulina y/o diabetes, tales como ratones que soportan destrucciones de genes en la ruta de la leptina (por ejemplo, ratones ob/ob (leptina) o db (receptor de leptina/ligando)) para estudiar la expresión de la DG153. Tales ratones desarrollan síntomas típicos de diabetes, muestran acumulación hepática de lípidos y con frecuencia presentan niveles de lípidos en plasma aumentados (véase Bruning et al, 1.998, Mol. Cell. 2: 559-569). Se encontró, por ejemplo, que la expresión de DG153 está regulada hacia abajo en tejido activo metabólico (TAB) en ratones obesos inducidos de manera genética (ob/ob) comparado con ratones de cepa natural (véase la Fig. 2B).

15 La expresión de ARNm de DG153 también se examinó en ratones de cepa natural susceptibles (por ejemplo, C57Bl/6) que muestran síntomas de diabetes, acumulación de lípidos y altos niveles de lípidos en plasma, si se alimentan con una dieta rica en grasa. En esos ratones, la expresión de DG153 está significativamente regulada hacia abajo en TAB y regulada hacia arriba en BAT y el músculo (véase la Fig. 2C) que soporta que la DG153 esté implicada en la regulación del metabolismo de los mamíferos.

20 Se muestra en esta invención que la DG153 se expresa y disminuye durante la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros (Fig. 2D). Por lo tanto, la proteína DG153 también podía desempeñar un papel esencial en la adipogénesis.

Ejemplo 4. Análisis de la expresión diferencial de transcripciones de las proteínas de la invención en tejidos de mamíferos.

25 Se hizo la preparación de ARN de células 3T3-L1 murinas y tejidos adiposos primarios humanos como se describe en el Ejemplo 3. La preparación diana, la hibridación y el barrido se realizó como se describe en el manual de los fabricantes (véase Affymetrix Technical Manual, 2.002, obtenido de Affmetrix, Santa Clara, USA).

30 El análisis de expresión (usando Affymetrix GeneChips) del gen de DG153 usando 3T3-L1 y diferenciación de adipocitos abdominales primarios humanos muestra claramente la expresión diferencial de DG153 murina y humana en adipocitos. Se hicieron dos experimentos independientes, respectivamente. Los experimentos mostraron que las transcripciones de DG153 eran las más abundantes el día 0 comparado con el día 10 / día 12 durante la diferenciación (Fig. 2E y Fig. 2F). Estos datos confirman además los datos de diferenciación de 3T3-L1 de ratón mostrados en la Fig. 2D.

35 Así, la proteína DG153 tiene que disminuirse ligeramente para diferenciar los preadipocitos en adipocito maduro. La proteína DG153 en preadipocitos presenta el potencial para inhibir la diferenciación adiposa. Por lo tanto, la proteína DG153 podía desempeñar un papel esencial en la regulación del metabolismo humano, en particular en la regulación de la adipogénesis y así podía ser un papel esencial en enfermedades pancreáticas (por ejemplo diabetes), obesidad y/o síndrome metabólico.

40 Para el propósito de la presente invención, se entenderá por la persona con destreza media en la técnica que cualquier combinación de cualquier característica mencionada por toda la memoria descriptiva se describe explícitamente con la misma.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Develogen Aktiengesellschaft fur entwicklungsbiolo

50 <120> Uso de productos de proteínas segregadas DG153 o DG177 para prevenir y tratar enfermedades pancreáticas y/u obesidad y/o síndrome metabólico.

<130> 31130PWO WWHC

55 <140> Patente PCT/EP2004/007531

<141> 08-07-2004

60 <150> Patente europea EP03015883.6

<151> 11-07-2003

<150> Patente europea EP03016710.0

65 <151> 22-07-2003

ES 2 392 430 T3

<160> 11
<170> PatentIn Ver. 2.1
5 <210> 1
<211> 1.103
10 <212> ADN
<213> humano
<220>
15 <223> secuencia de nucleótidos de proteína DG153 humana
<400> 1
cttcggctcct gctgtagtgc cttctgcgcc aggcccggtt caatcagcgg ccacaactgt 60
ctagggctca gaccaccacca gccaatgagg gagggcacgt ggagccgcgt ctgggctcgc 120
ggctcctgac caatggggaa gtggcatgtg ggagggcgcc ggggttcccc cgcacaatgg 180
ggagctacgg cgcgcggccg ggacttgag gcggtgcggc gcggcgggtg cggttcagtc 240
ggtcggcggc gccagcggag gaggaggagg aggaggagga tgaggaggat gaggaggatg 300
tgggccacgc aggggctggc ggtgcgcgtg gctctgagcg tgctgccggg cagccgggcg 360
ctgcggcccg gcgactgcga agtttgatt tcttatctgg gaagatttta ccaggacctc 420
aaagacagag atgtcacatt ctcaccagcc actattgaaa acgaacttat aaagtctctc 480
cgggaagcaa gaggcaaaga gaatcggttg tgctactata tccggggccac agatgatgca 540
gccacaaaa tcatcaatga ggtatcaaag cctctggccc accacatccc tgtggagaag 600
atctgtgaga agcttaagaa gaaggacagc cagatatgtg agcttaagta tgacaagcag 660
atcgacctga gcacagtga cctgaagaag ctccgagtta aagagctgaa gaagattctg 720
gatgactggg gggagacatg caaaggctgt gcagaaaagt ctgactacat ccggaagata 780
aatgaactga tgcctaaata tgcccccaag gcagccagt caccgaccga tttgtagtct 840
gctcaatctc tgttgcacct gagggggaaa aaacagttca actgcttact cccaaaacag 900
20 cctttttgta atttatttt taagtgggct cctgacaata ctgtatcaga tgtgaagcct 960
ggagctttcc tgatgatgct ggcctacag taccacctg aggggattcc cttccttctg 1020
ttgctgggtg actctaggac ttcaaagtgt gtctgggatt tttttattaa agaaaaaaaa 1080
tttctagctg tcaaaaaaaaa aaa 1103
<210> 2
25 <211> 234
<212> PRT
30 <213> humano
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de proteína DG153 humana, variante mayor
35 <400> 2

ES 2 392 430 T3

Met Gly Lys Trp His Val Gly Gly Arg Arg Gly Ser Pro Arg Gln Trp
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Ala Arg Gly Arg Asp Leu Glu Ala Val Arg Arg Gly Gly
 20 25 30

Cys Gly Ser Val Gly Arg Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 35 40 45

Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val
 50 55 60

Arg Val Ala Leu Ser Val Leu Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly
 65 70 75 80

Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu
 85 90 95

Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu
 100 105 110

Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr
 115 120 125

Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val
 130 135 140

Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln
 165 170 175

Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu
 180 185 190

Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu
 195 200 205

Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala
 210 215 220

Pro Lys Ala Ala Ser Ala Pro Thr Asp Leu
 225 230

5

<210> 3

<211> 179

10

<212> PRT

<213> humano

<220>

15

<223> secuencia de aminoácidos de proteína DG153 humana, variante menor

<400> 3

ES 2 392 430 T3

ggacagagg atcgcgagg ctccacctc cgettacagc tcgctgccgc cgtcctgccc 60
 cgcgccccca ggagacctgg accagaccac gatgtggaaa cgctggctcg cgctcgcgct 120
 cgcgctggtg gcgctcgcct gggctccgcg cgaggaagag ctaaggagca aatccaagat 180
 ctgtgccaat gtgtttgtg gagccggccg ggaatgtgca gtcacagaga aaggggaaacc 240
 cacctgtctc tgcattgagc aatgcaaacc tcacaagagg cctgtgtgtg gcagtaatgg 300
 caagacctac ctcaaccact gtgaactgca tcgagatgcc tgcctcactg gatccaaaat 360
 ccaggttgat tacgatggac actgcaaaga gaagaaatcc gtaagtccat ctgccagccc 420
 agttgtttgc taccagcca accgtgatga gctccgacgt cgcatcatcc agtggctgga 480
 agctgagatc attccagatg gctgtttctc taaaggcagc aactacagtg aaatcctaga 540
 caagtatttt aagaactttg ataatggtga ttctcgcctg gactccagtg aattcctgaa 600
 gtttgggaa cagaatgaaa ctgccatcaa tattacaacg tatccagacc aggagaacaa 660
 caagttgctt aggggactct gtgttgatgc tctcattgaa ctgtctgatg aaaatgctga 720
 ttggaaactc agcttccaag agtttctcaa gtgcctcaac ccatcttca accctcctga 780
 gaagaagtgt gccctggagg atgaaacgta tgcagatgga gctgagaccg aggtggactg 840
 taaccgctgt gctctgctc gtggaattg ggtctgtaca gccatgacct gtgacggaaa 900
 gaatcagaag gggggccaga cccagacaga ggaggagatg aaccagatag tccaggagct 960
 ccaaaaagcat caggaaaacag ctgaaaagac caagagagtg agcaccaaa agatctaata 1020
 aggaggcaca gaccagtgtc tggatcccag catcttctcc acttcagcgc tgagttcagt 1080
 atacacaagt gtctgttaca gtcgccaaat caccagtatt tgcttatata gcaatgagtt 1140
 ttatttgtt tatttgttt gcaataaagg atatgaagg ggtggctag gaagggaag 1200
 gccacagcct tcatctctag gagtgcttta agagaaactg taaatggtgc tctggggctg 1260
 gaggctagta aggaaactgc atcacgattg aaagaggaa agacccaaat ctgaacctct 1320
 tttgagttta ctgcatctgt cagcaggctg cagggagtgc acacgatgcc agagagaact 1380
 tagcagggtg tccccggagg agaggtttgg gaagctccac ggagaggaa gctctctgct 1440
 tccagcctct ttccattgccc gtcagcatga cagacctcca gcatccacgc atctcttgg 1500

 cccaataact gcctctagat acatagccat actgctagtt aaccagtggt ccctcagact 1560
 tggatggagt ttctgggagg gtacacccaa atgatgcaga tacttgtata ctttgagccc 1620
 cttagcgacc taaccaaatt ttaaaaatc tttttacca aggtgctatt tctctgtaa 1680
 acacttttt tttggcaagt tgactttatt cttcaattat tatcattata ttattgttt 1740
 ttaataattt atttcttga ctaggtatta agcttttga attattttc agtagtccca 1800
 ccacttcata ggtggaagga ttttggggtt ctctctgggt caggggctga aataaccag 1860
 atgccccac cctgccacat actagatgca gcccatagtt ggcccccta gcttccagca 1920
 gtccactatc tgcagagga gcaagggtgc cttagaccga agccagggga agaagcatct 1980
 tcataaaaaa cttcaagat ccaaacatta atttgtttt atttattctg agaagttgag 2040
 gcaaatcagt attcccaagg atggcgacaa gggcagccaa gcagggctta ggatatcca 2100
 gcctaccaat atgctcattc gactaactag gaggtgagtt tggccctgct tcttctttt 2160
 tctggacctc agtttctca gtgagctggt aagaatgcac taacctttt atttgataag 2220
 ttataaatc tgtggtctg atcattggtc cagaggggag ataggttctc gtgattttc 2280
 cttcttctc atagaataa tgaatcttg ttactagaac aagaaatgct agatggccaa 2340
 aaacaagatg accagattg atctcagcct gatgacccta caggtcgtgc tatgatagtg 2400
 agtctcatg ggtaaagcag gaagagagtg gaaaagagaa cccccact ctgtcttcat 2460
 atttgcatc catgtttaac ctccggctg aaatagaaag cattccctta gagatgagga 2520
 taaaagaaag tttcagattc aacaggggga agaaaatgga gatttaatcc taaaactgtg 2580
 acttggggag gtcagtcatt tacagttagt cctgtgtctt tgcactctg tgattattaa 2640
 cccactcac tacctgttt cagatgcatt tggaaacca aagattaat ccttgacata 2700
 agatctcatt tgcagaaagc agattaaaga ccatcagaag gaaattatt aggttgaat 2760
 gcacaggcaa ctgtgagaaa ctgttgtgcc aaaaatagaa ttcttctag ttttcttgt 2820
 tctcatttga aaggagaaaa ttccactttg tttagcatt caagcttta tgtatccatc 2880
 ccaatcaaaa actcttcaaa ctccacttgt tcagctgtaa atgcagctcc ctgtccaagt 2940
 gccttgagga actcacagca gcacgcctta atcaaaggtt ttaccagccc ttggacacta 3000
 tgggaggagg gcaagagtac accaatttgt taaaagcaag aaaccacagt gtctcttcac 3060
 tagtcattta gaacatggtt atcatocaag actactctac cctgcaacat tgaactccca 3120
 agagcaaatc cacattctc ttgagttctg cagcttctgt gtaaataggg cagctgtcgt 3180
 ctatgccgta gaatcacatg atctgaggac cattcatgga agctgctaaa tagcctagtc 3240
 tggggagtct tccataaagt tttgcatgga gcaaacaaac aggattaaac taggtttgg 3300
 tccttcagcc ctctaaaagc atagggtta gcctgcagge ttcttgggc tttctctgtg 3360
 tgtgtagttt tctaaccact atagcatctg ttaagatcca gctgcatg aaacattccc 3420
 acatgccgtg actctgact atatcagttt ttggaaagca ggttctctc gcctgctaac 3480
 aagcccagct ggaccagtct gaatgtcttt cctttacacc tatgttttta agtagtcaaa 3540
 cttcaagaaa caatctaacc aagtttctgt tgcatatgtg tttgtgaact tgtatttga 3600
 tttagtaggc ttctatattg catttaactt gttttgttaa ctctgatcc ttcctttctg 3660
 gatactattg atgaataaag aaattaaagt gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaa 3714

<210> 5

ES 2 392 430 T3

<211> 308

<212> PRT

5

<213> humana

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos de proteína DG177 humana

<400> 5

```

Met Trp Lys Arg Trp Leu Ala Leu Ala Leu Val Ala Val Ala
  1           5           10           15

Trp Val Arg Ala Glu Glu Glu Leu Arg Ser Lys Ser Lys Ile Cys Ala
          20           25           30

Asn Val Phe Cys Gly Ala Gly Arg Glu Cys Ala Val Thr Glu Lys Gly
          35           40           45

Glu Pro Thr Cys Leu Cys Ile Glu Gln Cys Lys Pro His Lys Arg Pro
  50           55           60

Val Cys Gly Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn His Cys Glu Leu His
  65           70           75           80

Arg Asp Ala Cys Leu Thr Gly Ser Lys Ile Gln Val Asp Tyr Asp Gly
          85           90           95

His Cys Lys Glu Lys Lys Ser Val Ser Pro Ser Ala Ser Pro Val Val
          100           105           110

Cys Tyr Gln Ser Asn Arg Asp Glu Leu Arg Arg Arg Ile Ile Gln Trp
          115           120           125

Leu Glu Ala Glu Ile Ile Pro Asp Gly Trp Phe Ser Lys Gly Ser Asn
          130           135           140

Tyr Ser Glu Ile Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn Phe Asp Asn Gly Asp
          145           150           155           160

Ser Arg Leu Asp Ser Ser Glu Phe Leu Lys Phe Val Glu Gln Asn Glu
          165           170           175

Thr Ala Ile Asn Ile Thr Thr Tyr Pro Asp Gln Glu Asn Asn Lys Leu
          180           185           190

Leu Arg Gly Leu Cys Val Asp Ala Leu Ile Glu Leu Ser Asp Glu Asn
          195           200           205

Ala Asp Trp Lys Leu Ser Phe Gln Glu Phe Leu Lys Cys Leu Asn Pro
          210           215           220

Ser Phe Asn Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Leu Glu Asp Glu Thr Tyr
          225           230           235           240

Ala Asp Gly Ala Glu Thr Glu Val Asp Cys Asn Arg Cys Val Cys Ala
          245           250           255
    
```

ES 2 392 430 T3

Met Trp Lys Arg Trp Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Val Ala Val Ala
 1 5 10 15

Trp Val Arg Ala Glu Glu Glu Leu Arg Ser Lys Ser Lys Ile Cys Ala
 20 25 30

Asn Val Phe Cys Gly Ala Gly Arg Glu Cys Ala Val Thr Glu Lys Gly
 35 40 45

Glu Pro Thr Cys Leu Cys Ile Glu Gln Cys Lys Pro His Lys Arg Pro
 50 55 60

Val Cys Gly Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn His Cys Glu Leu His
 65 70 75 80

Arg Asp Ala Cys Leu Thr Gly Ser Lys Ile Gln Val Asp Tyr Asp Gly
 85 90 95

His Cys Lys Glu Lys Lys Ser Val Ser Pro Ser Ala Ser Pro Val Val
 100 105 110

Cys Tyr Gln Ser Asn Arg Asp Glu Leu Arg Arg Arg Ile Ile Gln Trp
 115 120 125

Leu Glu Ala Glu Ile Ile Pro Asp Gly Trp Phe Ser Lys Gly Ser Asn
 130 135 140

Tyr Ser Glu Ile Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn Phe Asp Asn Gly Asp
 145 150 155 160

Ser Arg Leu Asp Ser Ser Glu Phe Leu Lys Phe Val Glu Gln Asn Glu
 165 170 175

Thr Ala Ile Asn Ile Thr Thr Tyr Pro Asp Gln Glu Asn Asn Lys Leu
 180 185 190

Leu Arg Gly Leu Cys Val Asp Ala Leu Ile Glu Leu Ser Asp Glu Asn
 195 200 205

Ala Asp Trp Lys Leu Ser Phe Gln Glu Phe Leu Lys Cys Leu Asn Pro
 210 215 220

Ser Phe Asn Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Leu Glu Asp Glu Thr Tyr
 225 230 235 240

Ala Asp Gly Ala Glu Thr Glu Val Asp Cys Asn Arg Cys Val Cys Ala
 245 250 255

ES 2 392 430 T3

Cys Gly Asn Trp Val Cys Thr Ala Met Thr Cys Asp Gly Lys Asn Gln
260 265 270

Lys Gly Ala Gln Thr Gln Thr Glu Glu Glu Met Thr Arg Tyr Val Gln
275 280 285

Glu Leu Gln Lys His Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Lys Arg Val Ser
290 295 300

Thr Lys Glu Ile
305

<210> 6

5 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

15

<220>

<223> cebador delantero de DG153 de ratón

<400> 6

20

agagaatcgg ttgtgtact acattg 26

<210> 7

25

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

35

<220>

<223> cebador inverso de DG153 de ratón

<900> 7

40

ggcttcgaca cctcattgat g 21

<210> 8

45

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

55

<220>

<223> sonda Taqman de DG153 de ratón
<900> 8
5 agccacagat gatgctgccca ccaa 24
<210> 9
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador
<220>
20 <223> cebador delantero de DG177 de ratón
<400> 9
25 gaagtctgcg agtccatctg c 21
<210> 10
<211> 15
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador
<220>
40 <223> cebador inverso de DG177 de ratón
<400> 10
45 gcgccgtcgg agctc 15
<210> 11
<211> 29
50 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador
<220>
60 <223> sonda Taqman de DG177 de ratón
<400> 11
65 agcccagttg tctgctatca agctaaccg 29

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína DG153 como se define en la SEC ID N°: 3 y/o un fragmento funcional de la misma y/o una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína DG153 como se define en la SEC ID N°: 3 y/o un fragmento funcional de la misma, en la que la composición contienen opcionalmente portadores, diluyentes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables para uso en el diagnóstico o tratamiento de enfermedades pancreáticas, seleccionadas del grupo que consiste en diabetes, tal como diabetes sacarina dependiente de insulina y/o diabetes sacarina no dependiente de insulina, obesidad y/o síndrome metabólico.
2. La composición como se define en la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se muestra en la SEC ID N°: 3 o fragmento funcional del polipéptido como se muestra en la SEC ID N°: 3;
- (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o es la molécula de ácido nucleico como se muestra en la SEC ID N°: 1;
- (c) una molécula de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético para las secuencias de ácidos nucleicos como se define en (a) o (b),
- (d) una molécula de ácido nucleico que se hibrida a 50°C en una disolución que contiene 1 x SSC y SDS al 0,1% para una molécula de ácido nucleico como se define en (a) a (c) y/o una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la misma;
- (e) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% y hasta 99,6% idéntica a Dug153 como se define en la SEC ID N°: 3 o a un polipéptido como se define en (a).
3. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para el uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN, en particular un ADNc o un ADN genómico.
4. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico recombinante y en la que dicho polipéptido es un polipéptido recombinante, por ejemplo un polipéptido de fusión.
5. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico es un vector, en particular un vector de expresión.
6. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para el uso según la reivindicación 1, en el que dicha molécula de ácido nucleico se selecciona de las sondas de hibridación, cebadores y oligonucleótidos de hebra complementaria.
7. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para el uso según la reivindicación 1 para:
- (a) el tratamiento, alivio y/o prevención de enfermedades pancreáticas seleccionadas del grupo que consiste en diabetes tales como diabetes sacarina dependiente de insulina o diabetes sacarina no dependiente de insulina, obesidad y/o síndrome metabólico o
- (b) la regeneración de tejidos o células pancreáticas, en particular células beta pancreáticas.
8. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para el uso según la reivindicación 1 para aplicación in vivo o in vitro.
9. Un método para investigación de un agente para el tratamiento de enfermedades pancreáticas seleccionadas del grupo que consiste en diabetes tales como diabetes sacarina dependiente de insulina o diabetes sacarina no dependiente de insulina, obesidad y/o síndrome metabólico, que efectúa/modula la actividad de un polipéptido de DG153 como se define en SEC ID N°: 3, que comprende las etapas de:
- (a) incubar una mezcla que comprende:
- (aa) un polipéptido de DG153 como se define en la SEC ID N°: 3 o un fragmento del mismo y

(ab) un agente candidato

en condiciones según las cuales dicho polipéptido de DG153 o fragmento del mismo presenta una actividad de referencia,

- 5
- (b) detectar la actividad de dicho polipéptido de DG153 o fragmento del mismo para determinar una actividad para el agente y
 - (c) determinar una diferencia entre actividad para el agente y actividad de referencia.

```

1 cttcggctct gctgtagtgc cttctgcgcc aggcccgggt caatcagcgg ccacaactgt
61 ctagggtctca gacaccacca gccaatgagg gagggcacgt ggagccgcgt ctgggctcgc
121 ggctcctgac caatggggaa gtggcatgtg ggagggcgcc ggggttcccc cgcacaatgg
181 ggagctacgg cgcgcggccg ggacttggag gcggtgcggc gcggcgggtg cggttcagtc
241 ggtcggcggc ggcagcggag gaggaggagg aggaggagga tgaggaggat gaggaggatg
301 tgggccacgc aggggctggc ggtgcgcgtg gctctgagcg tgctgccggg cagccggggc
361 ctgcggccgg gcgactgcga agtttgtatt tcttatctgg gaagatttta ccaggacctc
421 aaagacagag atgtcacatt ctcaccagcc actattgaaa acgaacttat aaagtctgc
481 cgggaagcaa gaggcaaaga gaatcggtt tgctactata tcggggccac agatgatgca
541 gccacaaaa tcatcaatga ggtatcaaag cctctggccc accacatccc tgtggagaag
601 atctgtgaga agcttaagaa gaaggacagc cagatatgtg agcttaagta tgacaagcag
661 atcgacctga gcacagtggg cctgaagaag ctccgagtta aagagctgaa gaagattctg
721 gatgactggg gggagacatg caaaggctgt gcagaaaagt ctgactacat ccggaagata
781 aatgaactga tgcctaaata tgcccccaag gcagccagtg caccgaccga tttgtagtct
841 gctcaatctc tgttgcacct gagggggaaa aaacagttca actgcttact cccaaaacag
901 cctttttgta atttatttt taagtgggct cctgacaata ctgtatcaga tgtgaagcct
961 ggagctttcc tgatgatgct ggcctacag taccctcatg aggggattcc cttcctctg
1021 ttgctgggtg actctaggac ttcaaagtgt gtctgggatt tttttattaa agaaaaaaaa
1081 tttctagctg tcaaaaaaaaa aaa

```

Fig. 1A

```

1 mgkwhvggrr gsprqwata rgrdleavrr ggcgsvgrrr qrrrrrrrm rrmrrmwatg
61 glavrvalsv lpgsralrpg dcevcsylyg rfyqdlkdrd vtfspatien elikfcrear
121 gkenrlcyyi gatddaarki inevskplah hipvekicek lkkkdsqice lkydkqidls
181 tvdlkklrvk elkkilddwg etckgcaeks dyirkinelm pkyapkaasa ptdl

```

Fig. 1B

```

1 mwatgglava lalsvlpgsr alrpgdcevc isylgrfyqd lkdrdvtfsp atienelikf
61 creargkenr lcyygatdd aatkiinevs kplahhipve kiceklkkkd sqicelkydk
121 qidlstvdlk klrvkelkki lddwgetckg caeksdyirk inelmpkyap kaasartdl

```

Fig. 1C

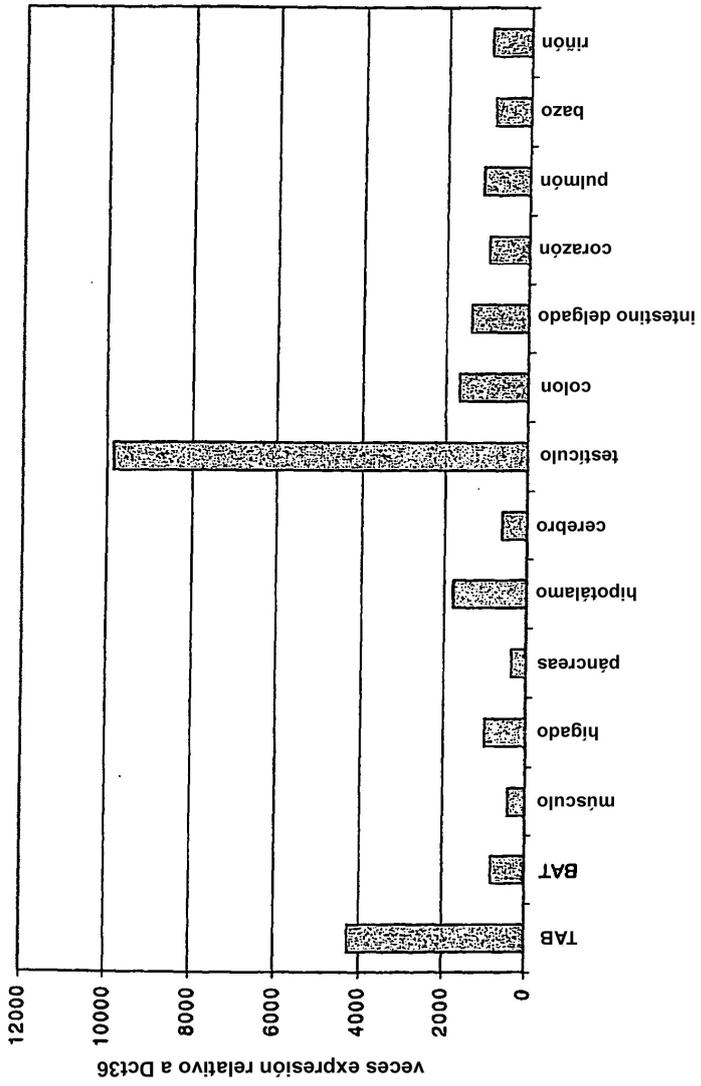


Fig. 2A

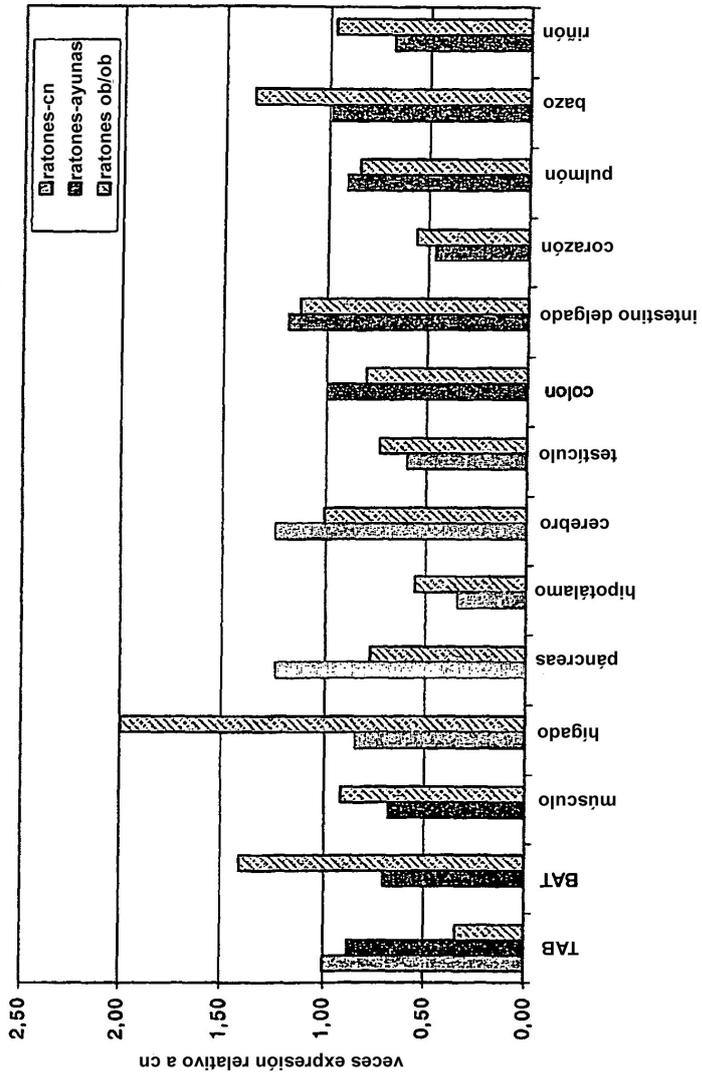


Fig. 2B

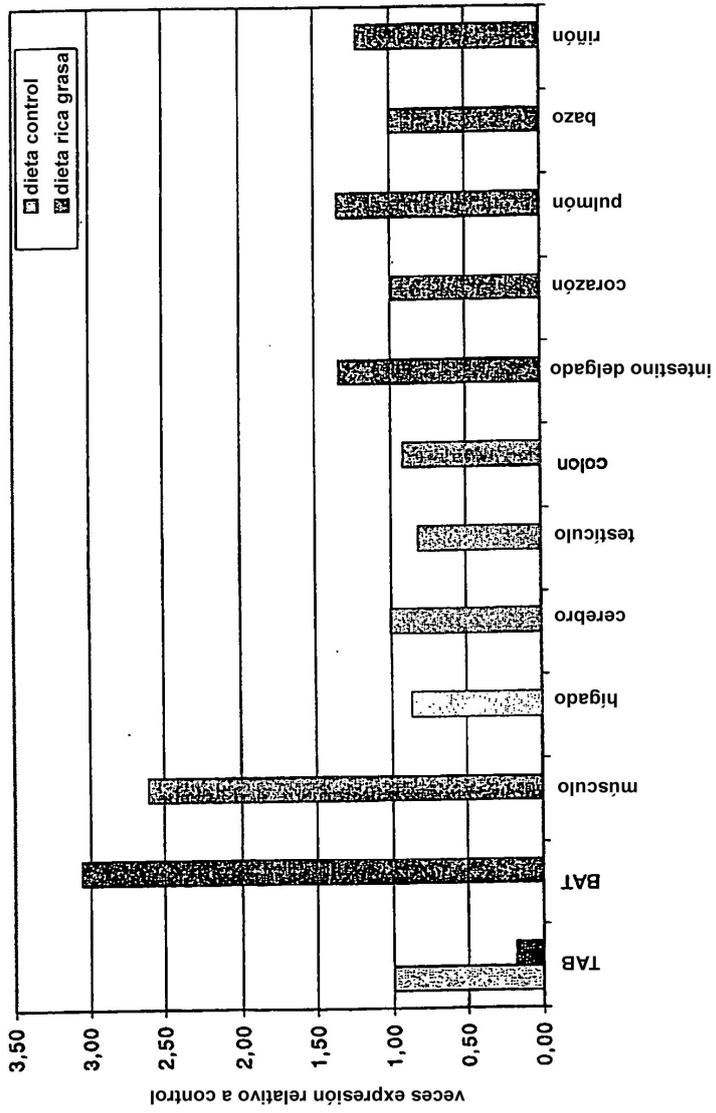


Fig. 2C

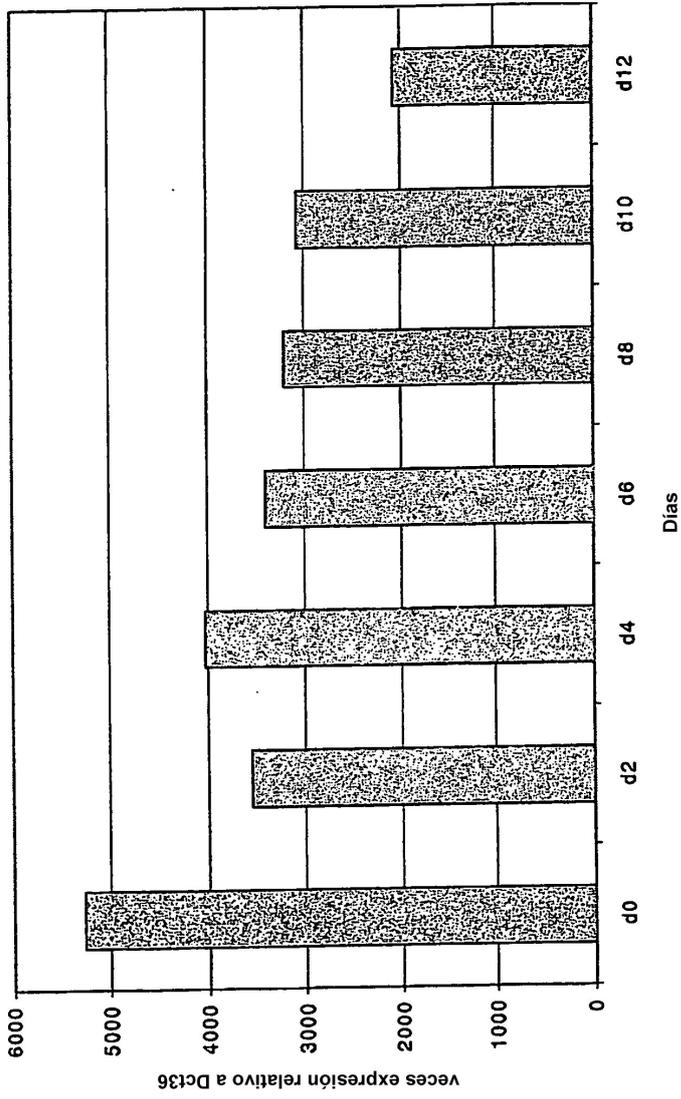


Fig. 2D

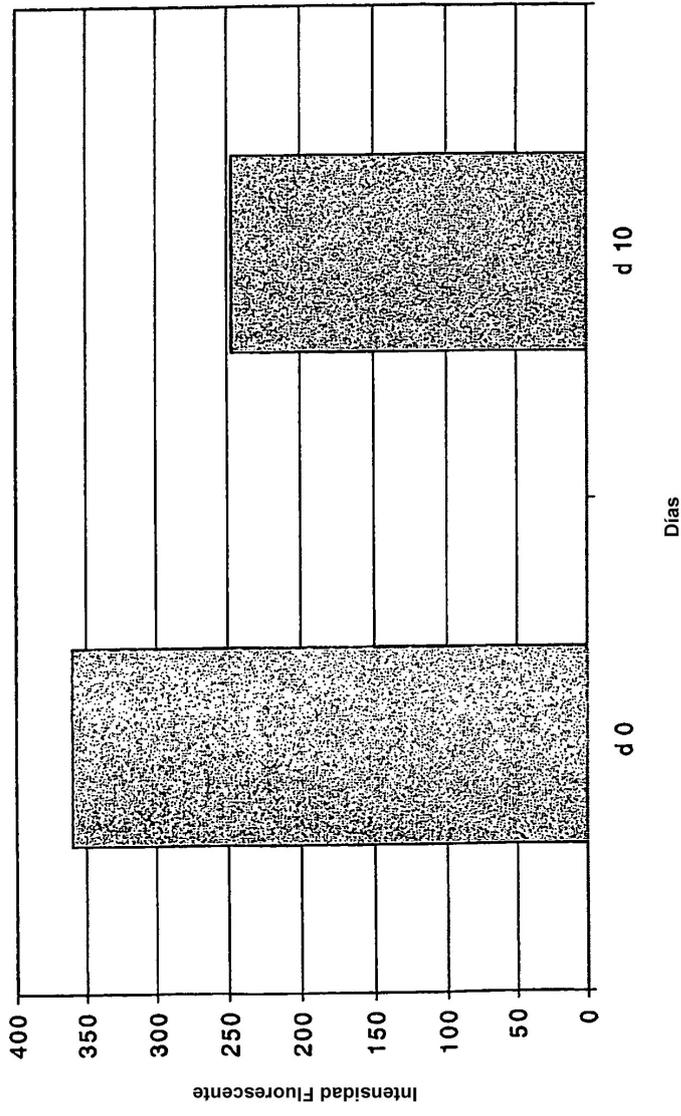


Fig. 2E

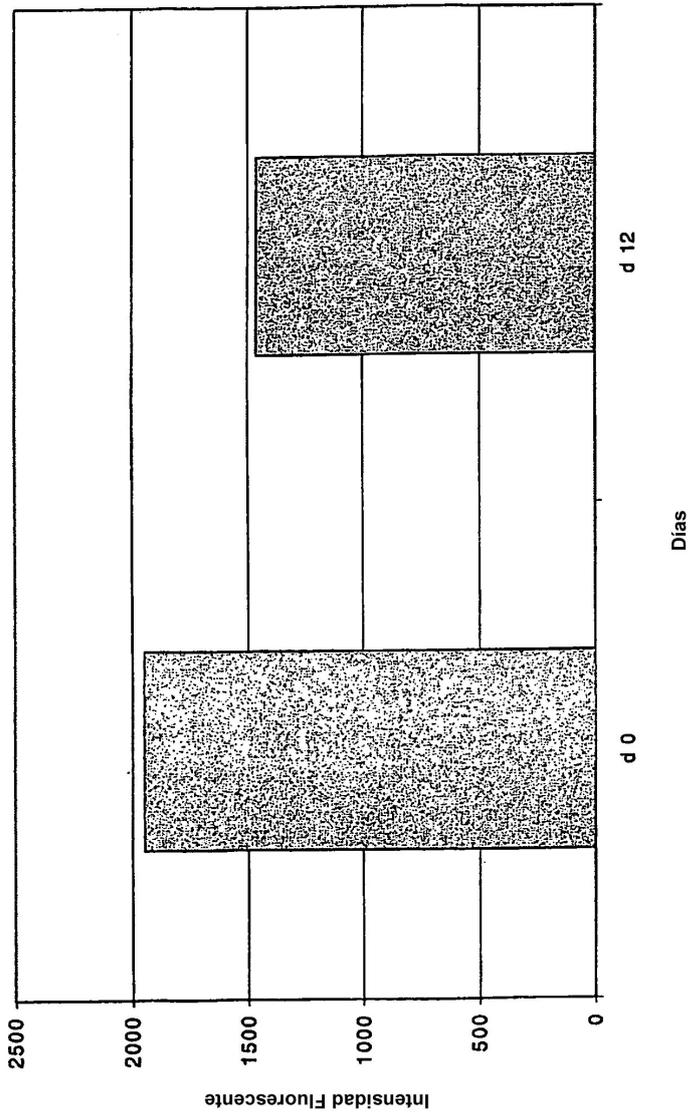


Fig. 2F