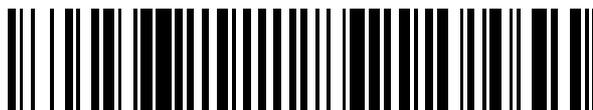


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 096**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

**A01K 67/00** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2004 E 04739073 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1605965**

54 Título: **Uso de proteínas relacionadas con saposina para prevenir y tratar la obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico**

30 Prioridad:

**26.03.2003 EP 03006948**

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

**26.04.2013**

73 Titular/es:

**EVOTEC INTERNATIONAL GMBH (100.0%)  
Essener Bogan 7  
22419 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**ONICHTCHOUK, DARIA;  
EULENBERG, KARSTEN;  
NGUYEN, TRI y  
BURK, ULRIKE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 402 096 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 proteínas relacionadas con saposina para prevenir y tratar la obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico

- 5 Esta invención se refiere al uso de proteínas relacionadas con saposina, al uso de polinucleótidos que las codifican en el diagnóstico, estudio, prevención y tratamiento de la obesidad y/o diabetes mellitus y/o síndrome metabólico.

10 Muchas proteínas humanas sirven como compuestos farmacéuticamente activos. Varias clases de proteínas humanas que sirven como este tipo de compuestos activos incluyen hormonas, citoquinas, factores del crecimiento celular y factores de diferenciación celular. La mayoría de las proteínas que se pueden utilizar como un compuesto farmacéuticamente activo caen dentro de la familia de proteínas secretadas. Las proteínas secretadas se producen generalmente dentro de células en el retículo endoplasmático rugoso, luego se exportan al complejo de Golgi y luego son desplazadas a vesículas o gránulos secretores en donde son secretadas al exterior de la célula vía exocitosos. Ejemplos de proteínas secretadas comercialmente utilizadas son insulina humana, agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, factores estimulantes de colonias, hormona del crecimiento humano, factor de crecimiento transformante beta, activador de plasminógeno tisular, eritropoyetina y otras diversas proteínas. Receptores de proteínas secretadas, que son proteínas unidas a la membrana, también tienen un potencial en calidad de agentes terapéuticos o de diagnóstico.

20 Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos compuestos farmacéuticos para identificar proteínas secretadas que puedan someterse a ensayo en cuanto a la actividad en una diversidad de modelos de animales. Así, a la vista del papel generalizado de proteínas secretadas en la fisiología humana, existe la necesidad de identificar y caracterizar nuevas funciones para proteínas secretadas humanas y los genes que las codifican. Este conocimiento permitirá detectar, tratar y prevenir enfermedades médicas, trastornos y/o afecciones utilizando proteínas secretadas o los genes que las codifican.

30 La obesidad es uno de los trastornos metabólicos más preponderantes en el mundo. Sigue siendo una enfermedad humana poco comprendida que se convierte en un problema de salud principal cada vez más relevante para la sociedad occidental. La obesidad se define como un peso corporal más de un 20% en exceso del peso corporal ideal, que resulta frecuentemente en una deficiencia o problema importante de salud. La obesidad se puede medir por el índice de masa corporal, un indicador de la adiposidad o gordura. Parámetros adicionales para definir la obesidad son las circunferencias de la cintura, el grosor de los pliegues de la piel y la bioimpedancia. Está asociada con un riesgo incrementado de una enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes mellitus tipo II, hiperlipidemia y una tasa de mortalidad incrementada.

35 La obesidad viene influenciada por factores genéticos, metabólicos, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento, y puede ser provocada por diferentes motivos tales como diabetes no dependiente de insulina, aumento en los triglicéridos, aumento en la energía ligada a hidratos de carbono y un bajo gasto energético. Como tal, es un trastorno complejo que debe ser abordado en varios frentes para conseguir un resultado clínico positivo duradero. Dado que la obesidad no se considera como un trastorno único, sino como un grupo heterogéneo de afecciones con múltiples causas (potenciales), también se caracteriza por una elevada insulina en plasma en ayunas y una respuesta a insulina exagerada a la ingesta oral de glucosa (Koltermann J., (1980), Clin. Invest, 65, 1272-1284). Se puede confirmar una clara implicación de la obesidad en la diabetes mellitus de tipo II (Kopelman, P.G., (2000) Nature 404, 635-643).

45 Triglicéridos y glucógeno se utilizan como el almacén de energía combustible del cuerpo. El glucógeno es un polímero ramificado grande de residuos de glucosa que se almacena principalmente en las células del hígado y de la musculatura. La síntesis y degradación de glucógeno es fundamental para el control del nivel de glucosa en sangre. Los triglicéridos se almacenan en el citoplasma de adipocitos. Los adipocitos están especializados en la síntesis, almacenamiento y movilización de triglicéridos. El metabolismo de glucógeno y triglicéridos está altamente regulado y su interacción es esencial para la homeostasis de la energía del cuerpo. Un alto nivel de glucosa en los adipocitos resulta en la síntesis de triglicéridos como almacén de combustible. Un bajo nivel de glucosa intracelular conduce a una liberación de ácidos grasos, los cuales se pueden utilizar como sustratos para la beta-oxidación para generar energía. Niveles de glucógeno en células son más variables que los niveles de triglicéridos, ya que la renovación de glucógeno es mayor. Los triglicéridos se utilizan en calidad de donantes de energía a largo plazo una vez que se están acabando los almacenes de glucógeno.

Células beta pancreáticas secretan insulina en respuesta a los niveles de glucosa en sangre. La insulina, entre

- otras hormonas, juega un papel clave en la regulación del metabolismo del combustible. La insulina conduce al almacenamiento de glucógeno y triglicéridos y a la síntesis de proteínas. La entrada de glucosa en los músculos y células adiposas es estimulada por la insulina. En pacientes que padecen diabetes mellitus tipo I o LADA (siglas inglesas de diabetes autoinmune latente del adulto (Pozzilli & Di Mario, 2001, *Diabetes Care*. 8:1460-67) las células beta son destruidas debido a un ataque autoinmune. La cantidad de insulina producida por las células de los islotes pancreáticos remanentes es demasiado baja, dando como resultado elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). En diabetes de tipo II, células del hígado y de la musculatura pierden su capacidad de responder a niveles normales de insulina en sangre (resistencia a la insulina). A su vez, niveles elevados de glucosa en sangre (y también niveles elevados de lípidos en sangre) conducen a una deficiencia de la función de células beta y a un incremento en la apoptosis de células betas. Es interesante señalar que la tasa de neogénesis de células beta no parece cambiar en personas diabéticas de tipo II (Butler et al., 2003 *supra*), provocando así una reducción en la masa total de células beta a lo largo del tiempo. Finalmente, la aplicación de insulina exógena se hace necesaria en personas diabéticas de tipo II.
- La mejora de parámetros metabólicos tales como niveles de azúcar en sangre y de lípidos en sangre (p. ej. a través de 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 un tratamiento de este tipo, la función endocrina pancreática permanecería dañada debido a la tasa de regeneración sólo ligeramente incrementada.
- En personas diabéticas de tipo I, en donde las células beta están siendo destruidas por un ataque autoinmune, se han concebido tratamientos que modulan el sistema inmune y pueden ser capaces de detener o de reducir fuertemente la destrucción de los islotes (Raz et al., 2001, *Lancet* 358; 1749-1753; Chatenoud et al., 2003, *Nat Rev Immunol*. 3: 123-132; Homann et al., *Immunity*, 2002, 3:403-15. Sin embargo, debido a la regeneración relativamente lenta de células beta humanas, tratamientos de este tipo sólo pueden tener éxito si se combinan con agentes que puedan estimular la regeneración de células beta.
- La diabetes es una enfermedad muy incapacitante, ya que los fármacos anti-diabetes comunes de hoy en día no controlan los niveles de azúcar en sangre lo suficientemente bien como para prevenir por completo la aparición de niveles de azúcar en sangre elevados y bajos. Niveles de azúcar en sangre de fuera de los límites son tóxicos y provocan complicaciones a largo plazo tales como, por ejemplo, renopatía, retinopatía, neuropatía y enfermedades vasculares periféricas. También existe una multitud de afecciones relacionadas, tales como obesidad, hipertensión, enfermedad del corazón e hiperlipidemia para las cuales personas con diabetes están esencialmente en riesgo.
- Aparte de la calidad disminuida de vida para los pacientes, el tratamiento de diabetes y sus complicaciones a largo plazo presenta una enorme carga financiera para nuestros sistemas de salud, con tendencia ascendente. Así, para el tratamiento de diabetes de tipo I y tipo II, así como para la diabetes autoinmune latente en adultos (LADA) existe una alta necesidad en la técnica de identificar factores que induzcan la regeneración de células beta productoras de insulina pancreática. Estos factores podrían restaurar la función normal del páncreas endocrino una vez que se ha dañado su función, o incluso podrían evitar el desarrollo o progreso de diabetes tipo I, diabetes tipo II o LADA.
- El concepto de "síndrome metabólico" (síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, cuarteto de la muerte) se describió por vez primera en 1966 por Camus y se reintrodujo en 1988 por Reaven (Camus JP. 1966, *Rev Rhum Mal Osteoartic* 33(1):10-14; Reaven et al. 1988, *Diabetes*, 37(12):1595-1607). Hoy en día, el síndrome metabólico se define comúnmente como racemización de factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión, obesidad abdominal, elevados niveles en sangre de triglicéridos y glucosa en ayunas, así como bajos niveles en sangre de colesterol HDL. La resistencia a la insulina aumenta grandemente el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico (Reaven, 2002, *Circulation* 106(3): 286:288). El síndrome metabólico precede a menudo al desarrollo de diabetes de tipo II y enfermedad cardiovascular (McCook, 2002, *JAMA* 288: 2709-2716). El control de niveles de lípidos en sangre y de niveles de glucosa en sangre es esencial para el tratamiento del síndrome metabólico (véase, por ejemplo, Santomauro A.T. et al., (1999) *Diabetes*, 48(9): 1836-1841).
- Los factores moleculares que regulan la ingesta de alimentos y el equilibrio del peso corporal no se entienden por completo. Aunque se han descrito varios genes candidatos que se supone influyen sobre el o los sistemas homeostáticos que regulan la masa/peso corporal tales como leptina o el co-activador del receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisoma, se desconocen los diferentes mecanismos moleculares y/o moléculas que influyen sobre la obesidad o las regulaciones en el peso corporal/masa corporal.

Las proteínas secretadas son una diana principal para la acción del fármaco y el desarrollo. Por consiguiente, es valioso en el campo del desarrollo farmacéutico identificar y caracterizar nuevas funciones para las proteínas secretadas. La presente invención se anticipa al estado conocido de la técnica proporcionando funciones previamente desconocidas para una proteína secretada humana.

5 El problema técnico en el que se basa la presente invención era proporcionar medios y métodos para modular afecciones metabólicas (patológicas) que influyen sobre la regulación del peso corporal y/o circuitos homeostáticos de energía. También el problema técnico era proporcionar métodos para tratar la diabetes. La solución a dichos problemas técnicos se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a genes que codifican proteínas secretadas con nuevas funciones en la regulación del peso corporal, homeostasis de la energía, metabolismo, obesidad y procesos de regeneración. La presente invención describe un gen específico implicado en la regulación del peso corporal, homeostasis de la energía, metabolismo y obesidad, así como enfermedades relacionadas tales como diabetes mellitus, trastornos en la comida, caquexia, hipertensión, enfermedad cardíaca coronaria, hipercolesterolemia (dislipidemia) y/o cálculos biliares. La presente invención describe genes relacionados con saposina, sus genes homólogos y proteínas codificadas por los mismos, en particular genes relacionados con saposina humana y proteínas (a las que también se alude como prosaposina, variante de la enfermedad de Gaucher y variante de leucodistrofia metacromática; PSAP; proteína B asociada a surfactante pulmonar humana (SFTPB), proteína hipotética humana FLJ40379), respectivamente, como implicados en las afecciones arriba mencionadas. Los autores de la invención describen un nuevo uso de prosaposina para estimular la formación o regeneración de células beta productoras de insulina y, así, un uso en el tratamiento y prevención de enfermedades que van junto con (p. ej. son provocadas por, están asociadas con o van acompañadas de) función deficiente de células beta, por ejemplo, pero no limitada a diabetes mellitus. Más particularmente, las enfermedades son diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o LADA.

25 Hasta ahora no se ha descrito que las proteínas de la invención y proteínas homólogas estén implicadas en la regulación de la homeostasis de la energía y la regulación del peso corporal o en procesos de regeneración y trastornos relacionados y, así, no se han discutido funciones en enfermedades metabólicas y disfunciones en otras enfermedades como las arriba listadas.

30 En esta invención, los autores de la misma se refieren a las proteínas codificadas por genes relacionados con saposina de *Drosophila* y a proteínas homólogas, preferiblemente polipéptidos o proteínas o secuencias que codifican a estas proteínas homólogos, preferiblemente humanos y murinos, como relacionadas con saposina o como proteínas de la invención.

35 La presente invención describe que proteínas relacionadas con saposina son reguladoras de la homeostasis de la energía y del metabolismo de las grasas, especialmente el metabolismo y el almacenamiento de triglicéridos y glucógeno, y polinucleótidos que identifican y codifican las proteínas descritas en esta invención. La invención se refiere también a vectores, células hospedantes, anticuerpos y métodos recombinantes para producir los polipéptidos y polinucleótidos de la invención. La invención se refiere también al uso de estos polinucleótidos, polipéptidos en el diagnóstico, estudio, prevención y tratamiento de enfermedades o disfunciones metabólicas, por ejemplo, pero no limitadas a síndrome metabólico, obesidad, diabetes mellitus, trastornos de la alimentación, caquexia, hipertensión, enfermedad coronaria del corazón, hipercolesterolemia (dislipidemia) y/o cálculos biliares.

45 La presente invención se basa también el hallazgo de que prosaposina estimula la diferenciación de células productoras de insulina a partir de células madre in vitro. Así, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de prosaposina para fomentar la regeneración de células beta pancreáticas o para fomentar la formación de células productoras de insulina a partir de células madre o células progenitoras in vitro o in vivo. La presente invención se refiere, además, a aplicaciones en el sector médico que surgen directamente del método de la invención. Adicionalmente, la presente invención se refiere a aplicaciones para la identificación y caracterización de compuestos con efectos médicos terapéuticos o efectos toxicológicos que surgen directamente del método de la invención.

55 Proteínas homólogas relacionadas con saposina y moléculas de ácidos nucleicos que las codifican se pueden obtener, por lo tanto, a partir de especies de insectos o vertebrados, p. ej. mamíferos o aves. Particularmente preferidos son ácidos nucleicos que codifican los homólogos relacionados con saposina humanos y las proteínas codificadas por los mismos (en particular prosaposina humana [PSAP], proteína B asociada a surfactante pulmonar humana [SFTPB] y/o proteína hipotética humana FLJ40379).

- La glucoproteína prosaposina (PSAP) es un precursor de cuatro saposinas (A, B, C y D) que se encuentra en diferentes localizaciones celulares (Morimoto S. et al., (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 3389-3393). Las saposinas son pequeñas proteínas lisosomales que sirven como activadores de diversas enzimas degradantes de lípidos lisosomales (Munford R.S. et al., (1995) J. Lipid Res. 36: 1653-1663). Prosaposina se produce en diversos tipos de fluidos secretores humanos tales como el fluido cerebroespinal, semen, leche, jugo pancreático y bilis. Se postula que prosaposina media en fenómenos de señalización neurotróficos capaces de inducir una diferenciación neural y prevenir la muerte de las células.
- Una línea de ratón mutante en la que el gen de la proteína activadora de esfingolípidos ha sido inactivado por tecnología de recombinación homóloga, mostró anomalías clínicas complejas, patológicas y bioquímicas similares a las de pacientes humanos con una deficiencia total en saposina (Fujita N. et al., (1996) Hum Mol Genet. 5: 711-725). La patología principal en el cerebro de ratones Sap <sup>-/-</sup> afectados era la hipomielinización y el almacenamiento de ceramidas y gangliósidos. El almacenamiento de ceramidas se produjo también en el cerebro, hígado y riñones, y el catabolismo de ceramidas es anormalmente lento en los fibroblastos. El examen de órganos reproductores en mutantes homocigóticos de prosaposina machos muestra varias anomalías, indicando que prosaposina está también implicada en el desarrollo y el mantenimiento de órganos reproductores masculinos (Morales C.R. et al., (2000) J Androl 21: 765-775).
- El surfactante pulmonar es un material rico en lípidos que evita el colapsamiento de los pulmones reduciendo la tensión superficial en la interfase aire-líquido en los alveolos pulmonares. Está constituido principalmente por fosfolípidos, colesterol y proteínas, incluidas cuatro proteínas asociadas a surfactante, dos glucoproteínas colágenas que se unen a hidratos de carbono (PSP-A y PSP-D) y dos proteínas hidrófobas pequeñas (PSP-B y PSP-C). Proteínas asociadas a surfactante pulmonar están implicadas en la respiración y fomentan la estabilidad alveolar reduciendo la tensión superficial en la interfase aire-líquido en los espacios de aire periféricos. PSP-B es un gen clínicamente importante, regulado en el desarrollo. La deficiencia de PSPB-B se demostró en proteinosis alveolar congénita (Nogee et al., (1993) N Engl J Med. 328: 406-410).
- La invención se refiere, particularmente, a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que contribuye en la regulación de la homeostasis de la energía y en el metabolismo de triglicéridos y glucógeno y en procesos de regeneración, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende
- la secuencia de nucleótidos del gel relacionado con saposina de Drosophila o un mamífero, p. ej. un homólogo relacionado con saposina humana (en particular PSAP. SFTPB y/o FLJ40379 humana), y/o una secuencia complementaria a la misma,
  - una secuencia de nucleótidos que se hibrida a 50°C en una disolución que contiene 1 x SSC y SDS al 0,1% a una secuencia de (a),
  - una secuencia que corresponde a la secuencia de (a) o (b) dentro de la degeneración del código genético,
  - una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente de al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98% y de hasta el 99,6% con las secuencias de aminoácidos de una proteína relacionada con saposina, preferiblemente un mamífero, p. ej. homólogo relacionado con saposina humana (en particular PSAP, SFTPB y/o FLJ40379),
  - una secuencia que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) a (d) por mutación, y en donde dicha mutación provoca una alteración, delección, duplicación y/o detención prematura en el polipéptido codificado, o
  - una secuencia parcial de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a) a (e) con una longitud de 15-25 bases, preferiblemente 25-35 bases, más preferiblemente 35-50 bases y lo más preferiblemente al menos 50 bases.
- La presente invención se refiere a genes con nuevas funciones en procesos de regeneración, regulación del peso corporal, homeostasis de la energía, metabolismo y obesidad, fragmentos de dichos genes, polipéptidos codificados por dichos genes o fragmentos de los mismos.
- Además, la presente invención, se refiere a composiciones para uso en la modulación de la adipogénesis, para modular, p. ej. estimular, el desarrollo pancreático y/o para la regeneración de células o tejidos pancreáticos, p. ej. células con funciones exocrinas tales como células acinares, células centroacinares y/o células ductales, y/o células con funciones endocrinas, particularmente células en los islotes de Langerhans tales como células alfa, beta, delta y/o PP, más particularmente células beta.

La presente invención se refiere a nuevos usos y a métodos in vitro para estimular y/o inducir la diferenciación de células progenitoras, p. ej. células madre en células productoras de insulina, o para fomentar la protección, supervivencia y/o regeneración de células productoras de insulina utilizando un producto prosaposina y/o un modulador/efector del mismo que influye, particularmente incrementa el nivel de expresión o función de un producto de proteína prosaposina.

Así, la presente invención proporciona usos para tratar pacientes que padecen de una enfermedad provocada por, asociada con y/o acompañada de números discapacitados funcionalmente y/o reducidos de células de islotes pancreáticos, particularmente células beta productoras de insulina, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto prosaposina o un compuesto que influye sobre el nivel o función de expresión de prosaposina. La discapacidad funcional o pérdida de células de islotes pancreáticos puede ser debida, p. ej., a un ataque autoinmune tal como en diabetes tipo I o LADA, y/o debido a la degeneración de las células tal como en diabetes de tipo II progresiva. Los productos de la presente invención también se pueden utilizar para tratar pacientes en riesgo de desarrollar degeneración de células beta productoras de insulina para prevenir el comienzo o progreso de un proceso de este tipo.

El producto prosaposina puede administrarse, p. ej., como una composición farmacéutica, vía implantación de células que expresan el producto prosaposina y/o vía terapia génica.

Además, la invención se refiere a preparados de células que comprenden células productoras de insulina tratadas con prosaposina o células que expresan prosaposina.

Numerosos aspectos adicionales y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras una consideración de la siguiente descripción de las Figuras y de la descripción detallada de la invención que describe realizaciones actualmente preferidas de la misma.

La capacidad de manipular y rastrear los genomas de organismos modelo tales como la mosca *Drosophila melanogaster* proporciona una herramienta poderosa para analizar procesos biológicos y bioquímicos que tienen una relevancia directa para organismos vertebrados más complejos debido a una conservación evolutiva significativa de los genes, procesos celulares y vías (véase, por ejemplo, Adams M.D. et al., (2000) *Science* 287: 2185-2195). La identificación de nuevas funciones de genes en organismos modelo puede contribuir directamente en el esclarecimiento de vías correlativas en mamíferos (seres humanos) y de métodos para modularlos. Una correlación entre un modelo de patología (tal como cambios en los niveles de triglicéridos como indicación del síndrome metabólico, incluida la obesidad) y la expresión modificada de un gen de mosca, puede identificar la asociación del ortólogo humano con la enfermedad humana particular.

Se realiza un rastreo genético directo en moscas que exhiben un fenotipo mutante debido a la expresión errónea de un gen conocido (véase Johnston *Nat. Rev Genet* 3: 176-188 (2002); Rorth P., (1996) *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93: 12418-12422). En esta invención, los autores de la misma utilizaron un rastreo genético para identificar mutaciones de genes homólogos relacionados con saposina que provocan cambios en el peso corporal, que son reflejados por un cambio significativo de niveles de triglicéridos. Adicionalmente, se analizan niveles de glucógeno.

Un recurso para el rastreo era una colección de reserva de *Drosophila melanogaster* de líneas EP. El vector P de esta colección tenía sitios de unión Gal4-UAS fusionados a un promotor basal que puede transcribir secuencias de *Drosophila* genómicas adyacentes, tras unión de Gal4 a sitios de UAS (Brand & Perrimon (1993) *Development* 118: 401-415; Rorth P., supra). Esto permite a la colección de líneas EP una sobre-expresión de secuencias de genes flanqueantes endógenos. Además, sin la activación de los sitios UAS, es probable que la integración del elemento EP al gen provoque una reducción de la actividad del gen, y permite determinar su función evaluando el fenotipo de pérdida de función.

Para aislar genes con una función en la homeostasis de la energía se sometieron a ensayo varios miles de líneas EP en cuanto a su contenido en triglicéridos/glucógeno, después de un período de alimentación prolongado (véanse los Ejemplos para mayor detalle). Líneas con un contenido en triglicéridos/glucógeno significativamente modificado se seleccionaron como candidatos positivos para el análisis adicional. El cambio de contenido en triglicéridos/glucógeno debido a la pérdida de una función génica sugiere actividades de los genes en la homeostasis de la energía de una manera dependiente de la dosis que controla la cantidad de energía almacenada en forma de triglicéridos o glucógeno.

En esta invención, el contenido de triglicéridos y glucógeno de una agrupación de moscas con el mismo genotipo se analizó después de alimentarlas durante seis días utilizando un ensayo de triglicéridos y uno de glucógeno. Moscas machos homocigóticas para la integración de vectores para las líneas de *Drosophila* HD-EP(3)36824 se analizaron en ensayos que miden los contenidos en triglicéridos/glucógeno de estas moscas (ilustrado con mayor detalle en la sección de Ejemplos). Los resultados del análisis del contenido en triglicéridos/glucógeno se muestran en la Figura 1.

Se aislaron secuencias de ADN genómico que están localizadas directamente junto a la integración del vector EP (en esta memoria HD-EP(3)36824). Utilizando esa secuencia genómicamente aislada, se rastrearon bases de datos públicas tales como Berkeley *Drosophila* Genome Project (Proyecto del Genoma de *Drosophila* de Berkeley) (GadFly; véase también FlyBase (1999) *Nucleic Acids Research* 27:85-88), identificando con ello el sitio de integración de los vectores y el gen correspondiente, descrito con mayor detalle en la sección de Ejemplos. La organización molecular del gen se muestra en la Figura 2.

Los genes de *Drosophila* y proteínas codificadas por los mismos con funciones en la regulación del metabolismo de triglicéridos se analizaron adicionalmente en bases de datos de secuencias públicamente disponibles (véanse los Ejemplos para mayor detalle) y se identificaron como homólogos de mamíferos (véase la Figura 3).

Además, los autores de la invención identificaron prosaposina (PSAP) como factor secretado, expresado en el páncreas de ratón en desarrollo, según se describe con mayor detalle en la sección de Ejemplos.

La función de los homólogos de mamíferos en la homeostasis de la energía se validó adicionalmente en esta invención, analizando la expresión de los transcritos en diferentes tejidos y analizando el papel en la diferenciación de adipocitos.

Estudios de valoración por perfiles de la expresión (véanse los Ejemplos para mayor detalle) confirman la relevancia particular de la proteína de la invención como reguladores del metabolismo de la energía en mamíferos. Transcritos de prosaposina se encuentran en varios tejidos de mamíferos con elevados niveles de expresión en tejidos de cerebro (hipotálamo), en riñones, corazón y bazo. Además, prosaposina muestra una elevada expresión en el tejido adiposo pardo (BAT – siglas en inglés) y el tejido adiposo blanco (WAT– siglas en inglés) (véase la FIGURA 4A). El tejido adiposo pardo es un tejido bien caracterizado que está bien desarrollado en mamíferos neonatos, incluidos seres humanos. Una función importante del BAT es generar calor y mantener la homeostasis de la temperatura corporal en el neonato. Así, una expresión de la proteína de la invención en tejidos adiposos confirma un papel en la regulación de la homeostasis de la energía y la termogénesis.

Además, los autores de la invención demuestran que prosaposina de mamíferos es regulada mediante ayuno y por la obesidad genéticamente inducida. En esta invención, los autores de la misma utilizaron modelos de ratones de resistencia a la insulina y/o diabetes tales como ratones que portan inactivaciones de genes en la vía de leptina (por ejemplo, ratones ob (leptina) o db (receptor de leptina)) para estudiar la expresión de prosaposina. Ratones de este tipo desarrollan síntomas típicos de diabetes, muestran una acumulación de lípidos hepática y, frecuentemente, tienen niveles de lípidos en plasma incrementados (véase Bruning et al, 1998, *Mol. Cell.* 2: 559-569). Los autores de la invención encontraron, por ejemplo, que la expresión de prosaposina está fuertemente supra-regulada en el hígado de ratones en ayunas y ob/ob (véase la Figura 4B). Además, se puede observar una supra-regulación acusada en el tejido metabólicamente activo (por ejemplo, tejido adiposo blanco (WAT)) de genéticamente obeso (ob/ob) (véase la FIGURA 4B).

Ratones de tipo salvaje susceptibles (por ejemplo C57Bl/6) muestran síntomas de diabetes, acumulación de lípidos y altos niveles de lípidos en plasma, si son alimentados con una dieta con elevado contenido en grasa. En ratones de este tipo, se observó la respuesta más destacada con respecto a tejidos metabólicamente activos. En esos ratones, la expresión de prosaposina está significativamente potenciada en tejido adiposo blanco (véase la Figura 4C) y en tejidos del hígado y de la musculatura, sustentando la hipótesis de que la proteína de la invención es un modulador de la adipogénesis.

Además, los autores de este caso demuestran en esta invención que el ARNm de la proteína de la invención está supra-regulado durante la diferenciación de adipocitos *in vitro* (véanse los EJEMPLOS para mayor detalle), sugiriendo un papel como modulador de la acumulación de lípidos en adipocitos. Con respecto a cambios en la intensidad de expresión durante la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos, se puede observar una mejora en

la intensidad de señales relativas para la proteína de la invención durante el programa de diferenciación in vitro de 3T3-L1 (véase la Figura 4D). Así, dichos autores concluyeron que prosaposina o variantes o productos de procesamiento de las mismas tienen una función en el metabolismo de adipocitos maduros.

5 Microarrays (microchips) son herramientas analíticas rutinariamente utilizadas en el bioanálisis. Un microarray tiene moléculas distribuidas por toda la superficie y establemente asociadas con la misma de un soporte sólido. El término "microarray" se refiere a una disposición de una pluralidad de polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos u otros compuestos químicos en un sustrato. Se han desarrollado microarrays de polipéptidos, polinucleótidos y/o anticuerpos, y encuentran uso en una diversidad de aplicaciones tal como la vigilancia de la expresión de genes, el descubrimiento de fármacos, la secuenciación de genes, la representación en mapa de genes, la identificación bacteriana y química combinatoria. Un sector particular en el que los microarrays encuentran uso es en el análisis de la expresión de genes (véase el Ejemplo 4). La tecnología de los arrays se puede utilizar para explorar la expresión de un gen polimórfico sencillo o el perfil de expresión de un gran número de genes relacionados o no relacionados. Cuando se examina la expresión de un gen sencillo, se emplean arrays para detectar la expresión de un gen específico o sus variantes. Cuando se examina un perfil de expresión, los arrays proporcionan una plataforma para identificar genes que son específicos para el tejido, están afectados por una sustancia que está siendo testada en un ensayo toxicológico, son parte de una cascada de señalización, llevan a cabo funciones domésticas o están específicamente relacionados con una predisposición, afección, enfermedad o trastorno genético particular.

20 Los microarrays se pueden preparar, utilizar y analizar utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brennan, T.M. et al. (1995) patente de EE.UU. N° 5.474.796, Schena, M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-10619; Baldeschweiler et al. (1995) solicitud PCT WO95/251116; Shalon, D. et al. (1995) solicitud PCT WO95/35505; Heller, R.A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:21502155; Heller, M.J. et al. (1997) patente de EE.UU. N° 5.605.662). Se conocen bien diversos tipos de microarrays y se describen a fondo en Schena, M., comp. (1999; DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Londres).

30 En un microarray se pueden utilizar como elementos oligonucleótidos o fragmentos mayores derivados de cualquiera de los polinucleótidos descritos en esta memoria. El microarray se puede utilizar en técnicas de formación de imágenes de transcritos que vigilan los niveles de expresión relativos de grandes números de genes de manera simultánea, según se describe más abajo. El microarray también se puede utilizar para identificar variantes, mutaciones y polimorfismos genéticos. Esta información puede utilizarse para determinar la función del gen, para comprender la base genética de un trastorno, para diagnosticar un trastorno, para vigilar el progreso/regresión de una enfermedad como función de la expresión génica y para desarrollar y vigilar las actividades de agentes terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad. En particular, esta información se puede utilizar para desarrollar un perfil fármaco-genómico de un paciente con el fin de seleccionar el régimen de tratamiento más apropiado y eficaz para ese paciente. Por ejemplo, agentes terapéuticos que son muy eficaces y exhiben el menor número de efectos secundarios se pueden seleccionar para un paciente en base a su perfil fármaco-genómico.

40 Según se determina por el análisis del microarray, prosaposina muestra una expresión diferencial en adipocitos primarios humanos (véase la Figura 5A) y una línea de células de adipocitos humana (véase la Figura 5B). La expresión de prosaposina está altamente supra-regulada durante la diferenciación de adipocitos humanos (véase la FIGURA 5). Así, la proteína prosaposina en pre-adipocitos potencia de manera significativa la diferenciación adiposa en una fase muy temprana. Por lo tanto, prosaposina juega un papel esencial en la adipogénesis. Además, los resultados sugieren intensamente un papel de prosaposina en la regulación en el metabolismo humano, por ejemplo como modulador (por ejemplo potenciador) de la adipogénesis. Así, prosaposina es un fuerte candidato para una composición farmacéutica para el tratamiento de afecciones relacionadas con el metabolismo humano tal como la obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico.

50 Esta invención muestra, además, que prosaposina induce la diferenciación de células productoras de insulina y, así, es una diana para el tratamiento de la diabetes. En relación con la presente invención, la expresión "células progenitoras" se refiere a células no diferenciadas capaces de ser diferenciadas en células productoras de insulina. El término incluye particularmente células madre, es decir, células embrionarias, adultas o somáticas no diferenciadas o inmaduras que pueden dar lugar a diversos tipos de células especializados. La expresión "células madre" puede incluir células madre embrionarias (ES) y células germinales (EG) primordiales de mamíferos, p. ej. de origen humano o animal. El aislamiento y cultivo de este tipo de células es bien conocido por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Thomson et al., (1998) Science 282: 1145-1147; Shambloott et al., (1998) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 95: 13726-13731; documentos US 6.090.622; US 5.914.268; WO 00/27995; Notarianni et al., (1990) J. Reprod. Fert. 41: 51-56; Vassilieva et al., (2000) Exp. Cell. Res. 258:361-373). Células madre adultas o somáticas han sido identificadas en numerosos tejidos diferentes tales como intestino, músculo, médula ósea, hígado y cerebro. El documento WO 03/023018 describe un nuevo método para aislar, cultivar y diferenciar células madre intestinales para uso terapéutico. En el páncreas varias indicaciones sugieren que las células madre están también presentes dentro del tejido adulto (Gu y Sarvetnick, (1993) Development 118: 33-46; Bouwens, (1998) Microsc Res Tech 43: 332-336; Bonner-Weir, (2000) J. Mol. Endocr. 24: 297-302).

Células madre embrionarias se pueden aislar de la masa celular interna de embriones pre-implantación (células ES) o de las células germinales primordiales encontradas en las rugosidades genitales de embriones post-implantados (células EG). Cuando se hacen crecer en condiciones de cultivo especiales tales como cultivo celular con agitación centrífuga o gotas colgantes, tanto células ES como EG se agregan para formar cuerpos embrioides (EB). Los EBs están constituidos por diversos tipos de células similares a los que están presentes durante la embriogénesis. Cuando se cultivan en medios apropiados, el EB se puede utilizar para generar fenotipos diferenciados in vitro tales como endodermo extraembrionario, células hematopoyéticas, neuronas, cardiomiocitos, células de la musculatura del esqueleto y células vasculares. Los autores de la invención han descrito previamente un método que permite diferenciar eficazmente el EB en células productoras de insulina (según se describe en la solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107 y por Blyszczuk et al., (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 998-1003).

Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran claramente una inducción de la diferenciación de células productoras de insulina y que responden a glucosa por parte de prosaposina. Así, prosaposina puede inducir la diferenciación de células beta y, por lo tanto, es una diana para usos terapéuticos en el tratamiento de diabetes, por ejemplo cuando se requiere la regeneración de células.

Antes de describir la presente invención, se entiende que todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente comprendidos por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

En la presente invención, la expresión "regeneración de células beta" se refiere a al menos una restauración parcial de la función normal de células beta, aumentando el número de células beta secretoras de insulina funcional y/o restableciendo la función normal en células beta funcionalmente deficientes.

La invención abarca también polinucleótidos que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Por consiguiente, cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifique las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención y proteínas homólogas se puede utilizar para generar moléculas recombinantes que expresen las proteínas de la invención y proteínas homólogas. En una realización particular, la invención comprende un ácido nucleico que codifica saposina relacionada con *Drosophila* o sus homólogos de mamíferos, p. ej. humanos; a los que se alude en esta memoria como las proteínas de la invención. Se apreciará por parte de los expertos en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas, portando algunas una homología mínima con las secuencias de nucleótidos de cualquier gen conocido y que se produce de forma natural. La invención contempla cada una y toda variación posible de secuencias de nucleótidos que pueden realizarse seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones.

También abarcadas por la invención se encuentran secuencias de polinucleótidos que con capaces de hibridarse a las secuencias de nucleótidos reivindicadas y, en particular, a las del polinucleótido que codifica las proteínas de la invención, bajo diversas condiciones de rigurosidad. Condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo o sonda de unión al ácido nucleico, tal como se enseña en Wahl y Berger (1987; Methods Enzymol. 152: 399-407) y Kimmel (1987; Methods Enzymol. 152: 507-511), y se pueden utilizar a una rigurosidad definida. Preferiblemente, hibridación bajo condiciones rigurosas significa que después del lavado 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, particularmente durante 1 h en 0,2 x SSC y SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a a 55°C, más preferiblemente a 62°C, y lo más preferiblemente a 65°C, se observa una señal de hibridación positiva. Secuencias de ácidos nucleicos alteradas que codifican las proteínas que están que están abarcadas por la invención incluyen delecciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos que resultan en un polinucleótido que codifica la misma proteína o una proteína funcionalmente equivalente.

Las proteínas codificadas también pueden contener deleciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en proteínas funcionalmente equivalentes. Se pueden realizar sustituciones deliberadas de aminoácidos sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se conserve la actividad biológica de la proteína. Además de ello, la invención se refiere a fragmentos de péptidos de las proteínas o derivados de los mismos tales como péptidos cíclicos, péptidos retro-inversos o péptidos miméticos con una longitud de al menos 4, preferiblemente al menos 6 y hasta 50 aminoácidos.

También incluidos dentro del alcance de la presente invención se encuentran alelos de los genes que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Tal como se utiliza en esta 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 resultar en ARNm's alterados o polipéptidos, cuyas estructuras o función puede o no estar alterada. Cualquier gen puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan origen a alelos se adscriben generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

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

Con el fin de 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 codificante insertada. Métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y los elementos de control de la transcripción y de la traducción apropiados. Elementos reguladores incluye, por ejemplo, un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, un elemento regulador de la estabilidad de ARNm y una señal de poliadenilación. La expresión de un polinucleótido se puede garantizar mediante (i) promotores constitutivos tales como la región del promotor/reforzador de citomegalovirus (CMV), (ii) promotores específicos para tejidos tales como el promotor de insulina (véase Soria et al., 2000, Diabetes 49: 157-162), promotor del gen SOX2 (véase Li et al., (1998) Curr. Biol. 8: 971-974), promotor Msi-1 (véase Sakakibara et al., (1997) J. Neuroscience 17: 8300-8312), promotor de la cadena pesada de alfa-cardiomiosina o el promotor del factor natriurético atrial humano (Klug et al., (1996) J. Clin. Invest. 98: 216-224); Wu et al., (1989) J. Biol. Chem. 264: 6472-6479) o (iii) promotores inducibles tales como el sistema inducible de tetraciclina. Vectores de expresión también pueden contener un agente de selección o gen marcador que confiera resistencia a antibióticos tales como los genes de resistencia a neomicina, higromicina o puromicina. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. Técnicas de este tipo se describen en Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. y Ausubel, F.M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.

En una realización adicional de la invención, secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas o recombinantes que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas se pueden ligar a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vector/hospedante de expresión para que contengan y expresen secuencias que codifiquen las proteínas o proteínas de fusión. Éstos incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófagos plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infestados con vectores de expresión de virus (p. ej. baculovirus, adenovirus, virus adeno-asociado, lentivirus, retrovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (p. ej. virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (p. ej. plásmidos Ti o PBR322); o sistemas de células animales.

La presencia de secuencias de polinucleótidos de la invención en una muestra puede detectarse mediante hibridación y/o amplificación de ADN-ADN o ADN-ARN, utilizando sondas o porciones o fragmentos de dichos polinucleótidos. Ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos implican el uso de oligonucleótidos u oligómeros basados en las secuencias específicas para el gen para detectar transformantes que contienen ADN o

ARN que codifican a la proteína correspondiente. Tal como se utiliza en esta memoria "oligonucleótidos" u "oligómeros" se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y tantos como aproximadamente 60 nucleótidos, de preferencia aproximadamente 15 a 30 nucleótidos y, con mayor preferencia, aproximadamente 20-25 nucleótidos, que se pueden utilizar como una sonda o amplímero.

5 Por parte de los expertos en la técnica se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación, y se pueden utilizar en diversos ensayos de ácidos nucleicos y de aminoácidos. Medios para producir una hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias de polinucleótidos incluyen la oligo-marcación, traslación de incisión, marcaje extremo de sondas de ARN, amplificación por PCR utilizando un nucleótido marcado o síntesis enzimática. Estos procesos se pueden realizar utilizando una diversidad de kits comercialmente disponibles (Pharmacia & Upjohn, (Kalamazoo, Mich.); Promega (Madison, Wis.); y U.S. Biochemical Corp., (Cleveland, Ohio).

15 La presencia de proteínas de la invención en una muestra se puede determinar por métodos inmunológicos o medición de la actividad. Es conocida en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de proteínas, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína o reactivos para determinar la actividad de la proteína. Ejemplos incluyen análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo en dos sitios, basado en monoclonal, utilizando anticuerpos monoclonales reactivos con dos  
20 epítomos no interferentes sobre la proteína, pero se puede emplear un ensayo de unión competitivo. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R. et al. (1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D.E. et al. (1983; J Exp. Med. 158: 1211-1216).

25 Moléculas o marcadores informadores adecuados que se pueden utilizar incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, co-factores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Células hospedantes transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de la invención se pueden cultivar bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de dicha proteína a partir de cultivo de células. La proteína producida por una célula recombinante puede ser secretada o puede estar contenida de modo intracelular en función de la secuencia y/o el vector utilizado. Como se comprenderá por parte de los expertos en la técnica, vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican la proteína se pueden diseñar de modo que contengan secuencias señal que dirigen la secreción de la proteína a través de una membrana de la célula procariótica o eucariótica. Se pueden utilizar otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican la proteína a secuencias de nucleótidos que codifican un dominio de polipéptido, lo cual  
35 facilitará la purificación de proteínas solubles. Dominios que facilitan una purificación de este tipo incluyen, pero no se limitan a péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAG (Immunex, Corp., Seattle, Wash.). Para facilitar la purificación se puede utilizar la inclusión de secuencias de enlazadores escindibles tales como las específicas para el factor XA o enteroquinasa (Intrivogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y la proteína deseada.

#### 45 **Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas**

Los datos descritos en esta invención demuestran que los ácidos nucleicos y proteínas de la invención y moléculas efectoras/moduladoras de los mismos son útiles en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas implicadas, por ejemplo pero no limitadas a síndrome metabólico que incluye obesidad, diabetes mellitus, trastornos de la alimentación, caquexia, hipertensión, enfermedad del corazón coronaria, hipercolesterolemia (dislipidemia) y/o cálculos biliares. Por lo tanto, usos diagnósticos y terapéuticos para los ácidos nucleicos de la invención y proteínas de la invención son, por ejemplo, pero no se limitan a los siguientes: (i) regeneración de tejido in vitro e in vivo (regeneración para todos los tejidos y tipos de células que componen estos tejidos y tipos de células derivados de estos tejidos), (ii) diana de fármacos de moléculas pequeñas, (iii) diana de anticuerpos (terapéutica, diagnóstica, diana de fármacos/anticuerpos citotóxicos), (iv) marcador diagnóstico y/o de pronóstico, (v) terapia de  
55 proteínas, (vi) terapia génica (suministro de genes/supresión de genes) y (vii) herramientas de búsqueda.

De acuerdo con esta invención, el producto prosaposina se puede administrar

i) en forma de una composición farmacéutica, p. ej. por vía enteral, parenteral o tópica, de preferencia

- directamente al páncreas,  
 ii) vía implantación de células que expresan el producto proteína prosaposina y/o  
 iii) vía terapia génica,  
 según se describe con mayor detalle más abajo.

5 Además, el nivel de expresión de prosaposina en un paciente podría verse influenciado por un modulador/efector de prosaposina administrado

- i) en forma de una composición farmacéutica, p. ej. por vía enteral, parenteral o tópica, de preferencia directamente al páncreas,  
 10 ii) vía terapia basada en células y/o  
 iii) vía terapia génica,  
 según se describe con mayor detalle más abajo.

15 El producto prosaposina se puede administrar en la manera arriba descrita solo o en combinación con otra composición farmacéutica útil para tratar la degeneración de células beta, por ejemplo hormonas, factores de crecimiento o agentes inmunomoduladores.

20 Un producto prosaposina se puede administrar en pacientes que padecen una enfermedad que va acompañada de una función deficiente de células beta, por ejemplo, pero no limitada a diabetes de tipo I, LADA o diabetes de tipo II progresiva. Se contempla, además, que un producto prosaposina o el modulador/efector del mismo pueda ser administrado de forma preventiva a pacientes en riesgo de desarrollar una degeneración de células beta tales como, por ejemplo, pero no limitados a pacientes que padecen diabetes de tipo II o LADA en fases tempranas. Una diversidad de formulaciones farmacéuticas y diferentes técnicas de suministro se describen con detalle adicionalmente más abajo.

25 La presente invención se refiere también a métodos para diferenciar células progenitoras en células productoras de insulina in vitro, que comprenden

- (a) activar uno o más genes pancreáticos en un progenitor, p. ej. célula madre (etapa opcional, particularmente si se utilizan células madre embrionarias)  
 30 (b) agregar dichas células para formar cuerpos embrioides (etapa opcional, particularmente si se utilizan células madre embrionarias)  
 (c) cultivar cuerpos embrioides o cultivar células madre adultas (p. ej. células ductales) en medios de diferenciación específicos que contienen un producto de proteína prosaposina y/o un modulador/efector del mismo bajo condiciones en donde se potencia significativamente la diferenciación de células, y  
 35 (d) identificar y seleccionar células productoras de insulina.

40 La activación de genes pancreáticos puede comprender la transfección de una célula con un gen pancreático operativamente enlazado a una secuencia de control de la expresión, p. ej. en un vector de transfección adecuado según se describe en el documento WO 03/023018. Ejemplos de genes pancreáticos preferidos son Pdx1, Pax, Pax6, neurogenina 3 (ngn3), Nkx 6.1, Nkx 6.2, Nkx 2.2, HB 9, BETA2/Meuro D, Isl 1, HNF1-alfa, HNF1-beta y HNF3 de origen humano o animal. Cada uno de los genes se puede utilizar individualmente o en combinación con al menos otro gen. Se prefiere especialmente Pax4.

45 Productos de prosaposina, p. ej. productos de la proteína prosaposina o de ácidos nucleicos, se producen preferiblemente a través de técnicas recombinantes, ya que métodos de este tipo son capaces de conseguir elevadas cantidades de proteína a una pureza grande, pero no se limitan a productos expresados en sistemas bacterianos, de células vegetales, de mamíferos o de insectos.

50 Además, los datos demuestran que los ácidos nucleicos y proteínas prosaposina son útiles para la modulación, p. ej. la estimulación del desarrollo pancreático y/o para la regeneración de células o tejidos pancreáticos, p. ej. células que tienen funciones exocrinas tales como células acinares, células centroacinares y/o células ductales, y/o células que tienen funciones endocrinas, particularmente células en islotes de Langerhans tales como células alfa, beta, delta y/o PP, más particularmente células beta.

55 Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención son útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas implicadas en diversas aplicaciones según se describe más abajo. Por ejemplo, pero no limitado a ADNcs que codifican las proteínas de la invención, y particularmente sus homólogos humanos, pueden ser útiles en la terapia génica, y las proteínas de la invención y, particularmente, sus homólogos humanos, pueden ser útiles cuando se

administran a un sujeto que lo necesita. A modo de ejemplo no limitante, las composiciones de la presente invención tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que padecen, por ejemplo, pero que no se limitan a trastornos metabólicos según se describe arriba.

5 También se contempla la terapia celular del producto prosaposina, es decir, la implantación pancreática de células que proporcionan el producto proteína prosaposina. Esta realización implicaría implantar células capaces de sintetizar y secretar una forma biológicamente activa de producto de proteína prosaposina en pacientes. Células productoras de productos de proteína prosaposina de este tipo pueden ser células que son productores naturales de producto de proteína prosaposina o pueden ser células que están modificadas para expresar la proteína.  
 10 Células modificadas de este tipo incluyen células recombinantes, cuya capacidad de proporcionar un producto de proteína prosaposina ha sido aumentada mediante transformación con un gen que codifica el producto proteína prosaposina deseado en un vector adecuado para fomentar su expresión y secreción. Con el fin de minimizar una potencial reacción inmunológica en pacientes a los que se esté administrado el producto de proteína prosaposina de una especie extraña, se prefiere que las células que proporcionan el producto de proteína prosaposina sean de origen humano y proporcionen el producto de proteína prosaposina humana. De igual manera, se prefiere que las células recombinantes que proporcionan el producto de proteína prosaposina sean transformadas con un vector de expresión que contenga un gen que codifica un producto de proteína prosaposina humana. Las células implantadas se pueden encapsular para evitar la infiltración de tejido circundante. Células animales humanas o no humanas pueden implantarse en paciente en envueltas poliméricas biocompatibles y semipermeables o  
 20 membranas que permiten la liberación del producto de proteína prosaposina, pero que evitan la destrucción de las células por parte del sistema inmune del paciente o por parte de otros factores perjudiciales del tejido circundante.

Alternativamente, células secretoras del producto de proteína prosaposina se pueden introducir en un paciente que lo necesite por vía intraportal a través de una estrategia transhepática percutánea, utilizando anestesia local.  
 25 Preferiblemente, se administran entre 3.000 y 100.000 células productoras de insulina diferenciadas equivalentes por kilogramo de peso corporal. Técnicas quirúrgicas de este tipo son bien conocidas en la técnica y se pueden aplicar sin experimentación excesiva alguna, véase Pyzdrowski et al, 1992, *New England J. Medicine* 327:220-226; Hering et al., *Transplantation Proc.* 26:570-571, 1993; Shapiro et al., *New England J. Medicine* 343:230-238, 2000.

30 En una realización preferida adicional, el producto de proteína prosaposina se puede suministrar directamente al progenitor, p. ej. células madre, con el fin de estimular la diferenciación de células productoras de insulina. Por ejemplo, el suministro de proteínas se puede conseguir por parte de liposomas policatiónicos (Sells et al. (1995) *Biotechniques* 19:72-76), transducción de proteínas mediada por Tat (Fawell et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:664-668) y mediante fusión de una proteína al motivo permeable de la célula derivado del dominio PreS2 del virus de la hepatitis B (Oess y Hildt (2000) *Gene Ther.* 7:750-758). La preparación, producción y purificación de proteínas de este tipo a partir de bacterias, levaduras o células eucarióticas son bien conocidas por personas expertas en la técnica. En esta realización de la invención, prosaposina se puede añadir preferiblemente a concentraciones entre 1 ng/ml y 500 ng/ml, más preferiblemente entre 10 y 100 ng/ml, p. ej. a aproximadamente 50 ng/ml.  
 40

Además, la invención se refiere a un preparado de células que comprende células progenitoras diferenciadas, p. ej. células madre que exhiben una producción de insulina, particularmente una línea de células productora de insulina obtenible por el método arriba descrito. Las células productoras de insulina pueden exhibir una expresión estable o una expresión transitoria de al menos un gen pancreático implicado en la diferenciación de células beta. Las células son preferiblemente células humanas que se derivan de células madre humanas. Para aplicaciones terapéuticas, se prefiere especialmente la producción de células humanas autólogas a partir de células madre adultas de un paciente. Sin embargo, las células productoras de insulina también se pueden derivar de células no autólogas. Si es necesario, se pueden evitar reacciones inmunes indeseadas mediante encapsulación, inmunosupresión y/o modulación, o debido a las propiedades no inmunogénicas de las células.  
 45  
 50

Las células productoras de insulina de la invención exhiben preferiblemente características que las asemejan estrechamente a células beta que se producen de forma natural. Además, preferiblemente, las células de la invención son capaces de una respuesta rápida a la glucosa. Después de la adición de glucosa 27,7 mM, la producción de insulina es potenciada en un factor de al menos 2, preferiblemente en un factor de al menos 3.  
 55 Además, las células de la invención son capaces de normalizar los niveles de glucosa en sangre después del trasplante a ratones.

La invención comprende, además, células pancreáticas funcionales que se pueden obtener o que se obtienen por

el método de acuerdo con la invención. Las células son preferiblemente de origen mamífero, p. ej. humano. Preferiblemente, dichas células son células beta pancreáticas p. ej. células beta pancreáticas maduras o células madre diferenciadas en células beta pancreáticas. Células beta pancreáticas de este tipo secretan preferiblemente insulina en respuesta a glucosa. Además de ello, la presente invención proporciona una célula pancreática funcional que expresa glucagón en respuesta a glucosa. Un preparado que comprende las células de la invención puede contener, adicionalmente, células con propiedades de otros tipos de células endocrinas tales como células alfa, células delta y/o células PP. Estas células son preferiblemente células humanas.

El preparado de células de la invención es preferiblemente una composición farmacéutica que comprende las células junto con soportes, diluyentes y/o adyuvantes farmacológicamente aceptables. La composición farmacéutica se utiliza preferiblemente para el tratamiento o la prevención de enfermedades pancreáticas, p. ej. diabetes.

De acuerdo con la presente invención, las células productoras de insulina funcionales, tratadas con prosaposina, se pueden trasplantar, preferiblemente por vía intrahepática, directamente en el páncreas de un individuo que lo necesite, o por otros métodos. Alternativamente, este tipo de células se puede encerrar en cápsulas implantables que pueden ser introducidas en el cuerpo de un individuo en cualquier localización, mas preferiblemente en la proximidad del páncreas, o la vejiga, o el hígado o bajo la piel. Métodos de introducir células en individuos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a administración por inyección, intravenosa o parenteral. Se puede realizar una administración sencilla, múltiple o continua o intermitente. Las células se pueden introducir en cualquiera de varios sitios diferentes, que incluyen, pero no se limitan al páncreas, la cavidad abdominal, el riñón, el hígado, la arteria celiaca, la vena portal o el bazo. Las células también se pueden depositar en el páncreas del individuo.

La metodología para la encapsulación en la membrana de células vivas resulta familiar para los expertos ordinarios en la técnica, y la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes se pueden conseguir sin una experimentación excesiva. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. números 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. Un sistema para encapsular células vivas se describe en la solicitud PCT WO 91/10425 de Aebischer et al. Véase también la solicitud PCT WO 91/10470 de Aebischer et al., Winn et al., *Exper. Neurol.*, 1 13:322-329, 1991, Abiescher et al., *Exper. Neurol.*, 11 1:269-275, 1991; Tresco et al., *ASAIO*, 38:17-23, 1992. Técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro prolongado o controlado tales como soportes de liposomas, partículas o perlas bio-erosionables e inyecciones de depósito son también conocidas por los expertos en la técnica.

En otra realización, se prevé la terapia génica ex vivo, es decir, las propias células del paciente se pueden transformar ex vivo para proporcionar un producto de proteína prosaposina o una proteína que estimule la expresión de prosaposina y que sea directamente reimplantada. Por ejemplo, células recuperadas del paciente se pueden cultivar y transformar con un vector apropiado. Después de una fase de propagación/expansión opcional, las células se pueden trasplantar de nuevo al cuerpo del mismo paciente, particularmente el páncreas, en donde producirán y liberarán el producto de proteína prosaposina deseado. El suministro mediante transfección y mediante inyecciones de liposomas se puede conseguir utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Cualquiera de los métodos terapéuticos arriba descritos se puede aplicar a cualquier sujeto adecuado que incluya, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, lo más preferiblemente, seres humanos.

También se prevé la terapia génica del producto prosaposina in vivo introduciendo el gen que codifica un producto de proteína prosaposina en células del páncreas fijadas como objetivo a través de la inyección local de una construcción de ácidos nucleicos u otros métodos de suministro apropiados (Hefti, *J. Neurobiol.*, 25:1418-1435, 1994). Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto de proteína prosaposina puede estar contenido en un vector de virus adeno-asociado o un vector de adenovirus para el suministro a las células del páncreas. Vectores virales alternativos incluyen, pero no se limitan a vectores de retrovirus, virus herpes simplex y virus del papiloma. La transferencia física, ya sea in vivo o ex vivo según sea apropiado, también se puede conseguir mediante transferencia mediada por liposomas, inyección directa (ADN desnudo), transferencia mediada por el receptor (complejo de ligando-ADN), electroporación, precipitación con fosfato de calcio o bombardeo con micropartículas (pistola de genes).

Fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina también se pueden administrar al paciente que lo necesite para reducir la reacción de hospedante frente a injerto. También son útiles aloinjertos que utilizan las células obtenidas por los métodos de la presente invención, debido a que un solo donante sano podría suministrar células

suficientes para la regeneración, al menos parcial, de la función pancreática en múltiples receptores.

La administración de un producto de proteína prosaposina y/o moduladores/efectores del mismo en una composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite, particularmente un paciente humano, conduce a una regeneración, al menos parcial, de células pancreáticas. Preferiblemente, estas células son células beta productoras de insulina que contribuirán a la mejora de un estado diabético. Con la administración de esta composición, p. ej. a corto plazo o sobre una base regular, se puede conseguir un aumento en la masa de células beta. Este efecto sobre el cuerpo invierte la condición de la diabetes parcialmente o por completo. A media que mejora la homeostasis de la glucosa en sangre del sujeto, se puede reducir en concentración la dosificación administrada. En al menos algunos casos, se puede interrumpir por completo una administración ulterior, y el sujeto continúa produciendo una cantidad normal de insulina sin un tratamiento adicional. Con ello, el sujeto no sólo es tratado, sino que también puede ser curado por completo de una afección diabética. Sin embargo, incluso mejoras moderadas en la masa de células beta puede conducir a un requisito reducido para la insulina exógena, control glucémico mejorado y una reducción subsiguiente en las complicaciones diabéticas. En otro ejemplo, las composiciones de la presente invención tendrán también eficacia para el tratamiento de pacientes con otras enfermedades pancreáticas tales como cáncer pancreático, displasia o pancreatitis, si se han de regenerar células beta.

Los ácidos nucleicos de la invención o fragmentos de los mismos pueden ser adicionalmente útiles en aplicaciones de diagnóstico, en las que se ha de evaluar la presencia o cantidad de los ácidos nucleicos o de las proteínas. En métodos terapéuticos o de diagnóstico se pueden utilizar anticuerpos adicionales que se unan inmunoespecíficamente a las nuevas sustancias de la invención.

Por ejemplo, en un aspecto, anticuerpos que son específicos para las proteínas de la invención y proteínas homólogas se pueden utilizar directamente como un efector, p. ej. un antagonista o, indirectamente, como un mecanismo diana o de suministro para llevar un agente farmacéutico a células o tejidos que expresen la proteína. Los anticuerpos se pueden generar utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Anticuerpos de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a policlonales, monoclonales, de cadena sencilla quiméricos, fragmentos Fab y fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab. Anticuerpos neutralizantes (es decir, aquellos que inhiben la formación de dímeros) son especialmente preferidos para uso terapéutico.

Para la producción de anticuerpos, diversos hospedantes, incluidas cabras, conejos, ratas, ratones, seres humanos y otros se pueden inmunizar mediante inyección con la proteína o cualquier fragmento u oligopéptido de la misma que tenga propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedante, se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Se prefiere que los péptidos, fragmentos u oligopéptidos utilizados para inducir anticuerpos contra la proteína tengan una secuencia de aminoácidos que consista en al menos cinco aminoácidos, y más preferiblemente en al menos 10 aminoácidos.

Anticuerpos monoclonales contra las proteínas se pueden preparar utilizando una técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por parte de líneas de células continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas y la técnica del hibridoma de EBV (Köhler, G. et al. (1975) *Nature* 256: 495-497; Kozbor, D. et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote, R. J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030; Cole, S. P. et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120).

Adicionalmente, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad para antígenos y actividad biológica apropiadas (Morrison, S. L. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-6855; Neuberger, M. S. et al (1984) *Nature* 312: 604-608; Takeda, S. et al. (1985) *Nature* 314: 452-454). Alternativamente, se pueden adaptar técnicas descritas para la formación de anticuerpos de cadena sencilla utilizando métodos conocidos en la técnica, para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos para las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, se pueden generar revolviendo la cadena a partir de bancos de inmunoglobulina combinatorios al azar (Burton, D. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 11120-11123). Los anticuerpos también se pueden producir induciendo la producción in vivo en la población de linfocitos o rastreando bancos o paneles de inmunoglobulina recombinante con reactivos de unión altamente específicos según se describe en la bibliografía (Orlandi, R. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) *Nature* 349: 293-299).

También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para las proteínas. Por ejemplo, fragmentos de este tipo incluyen, pero no se limitan a los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se

pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos  $F(ab')_2$ . Alternativamente, se pueden construir bancos de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse, W. D. et al. (1989) Science 254: 1275-1281).

5 Se pueden realizar diversos inmunoensayos de rastreo para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. En la técnica se conocen bien numerosos protocolos para la unión competitiva y ensayos inmunoradiométricos utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas. Inmunoensayos de este tipo implican, típicamente, la medición de una formación de un complejo entre la proteína  
10 y su anticuerpo específico. Se prefiere un inmunoensayo en dos sitios, monoclonal, utilizando anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos de proteínas no interferentes, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitivo (Maddox, supra).

15 En otra realización de la invención, los polinucleótidos o fragmentos de los mismos o moléculas efectoras de ácidos nucleicos tales como moléculas antisentido, aptámeros, moléculas de ARNi o ribozimas se pueden utilizar para fines terapéuticos. En un aspecto, los aptámeros, es decir, moléculas de ácidos nucleicos, que son capaces de unirse a una proteína de la invención y modular su actividad, pueden generarse mediante un proceso de rastreo y selección que implica el uso de bancos de ácidos nucleicos combinatorios.

20 En un aspecto adicional, se pueden utilizar moléculas antisentido en situaciones en las que sería deseable bloquear la transcripción del ARNm. En particular, se pueden transformar células con secuencias complementarias a polinucleótidos que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Así, se pueden utilizar moléculas para modular la actividad de las proteínas o para conseguir la regulación de la función de los genes. Una tecnología de este tipo es ahora bien conocida en la técnica y a partir de diversas localizaciones a lo largo de  
25 las regiones codificantes o control de secuencias que codifican las proteínas se pueden diseñar oligómeros sentido o antisentido o fragmentos mayores. Se pueden utilizar vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, virus herpes o vacuna, o derivados de diversos plásmidos bacterianos para el suministro de secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población de células fijado como objetivo. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores recombinantes que expresarán moléculas  
30 antisentido complementarias a los polinucleótidos de los genes que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Estas técnicas se describen tanto en Sambrook et al. (supra) como en Ausubel et al. (supra). Genes que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas se pueden reprimir transformando una célula o tejido con vectores de expresión que expresan altos niveles de polinucleótidos que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas o fragmentos de las mismas. Construcciones de este tipo se pueden utilizar  
35 para introducir en una célula secuencias sentido o antisentido no susceptibles de ser traducidas. Incluso en ausencia de la integración del ADN, este tipo de vectores puede continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que sean inhabilitadas por nucleasas endógenas. La expresión transitoria puede durar un mes o más con un vector no replicante, e incluso más tiempo si elementos de replicación apropiados son parte del sistema del vector.

40 Tal como se ha mencionado arriba, se pueden obtener modificaciones de la expresión del gen diseñando moléculas antisentido, p. ej. ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos tales como PNA a las regiones control de los genes que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas, es decir, los promotores, potenciadores e intrones. Se prefieren oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, p. ej. entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de partida. De manera similar, la inhibición se puede conseguir  
45 utilizando la metodología del apareamiento de bases de "hélice triple". El apareamiento de hélice triple es útil debido a que provoca la inhibición de la capacidad de la hélice doble a abrirse lo suficientemente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras. Avances terapéuticos recientes utilizando ADN triplex han sido descritos en la bibliografía (Gee, J. E. et al. (1994) In; Huber, B. E. y B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y.). Las moléculas antisentido también se pueden  
50 diseñar para bloquear la traducción de ARNm evitando que el transcrito se una a ribosomas.

Ribozimas, moléculas de ARN enzimáticas, también se pueden utilizar para catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de las ribozimas implica una hibridación específica para la secuencia de la molécula ribozima a ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Ejemplos que se pueden  
55 utilizar incluyen moléculas ribozima con motivo de cabeza de martillo tratadas mediante ingeniería genética que pueden catalizar de manera específica y eficaz la escisión endonucleolítica de secuencias que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas. Sitios de escisión de ribozima específicos dentro de cualquier diana de ARN potencial son inicialmente identificados escaneando la molécula diana en cuanto a sitios de escisión

de ribozimas que incluyen las siguientes secuencias. GUA, GUU y GUC. Una vez identificados, secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar en cuanto a rasgos estructurales secundarios que pueden hacer inoperativo al oligonucleótido. La idoneidad de dianas candidatas también se puede evaluar sometiendo a ensayo la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios utilizando ensayos de protección de ribonucleasa.

Moléculas efectoras/moduladoras de ácidos nucleicos, p. ej. moléculas antisentido y ribozimas de la invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácidos nucleicos. Estos métodos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligonucleótidos tales como la síntesis química de fosforoamidita en fase sólida. Alternativamente, moléculas de ARN se pueden generar mediante transcripción in vitro e in vivo de secuencias de ADN. Secuencias de ADN de este tipo se pueden incorporar en una diversidad de vectores con promotores de ARN polimerasa adecuados tales como T7 o SP6. Alternativamente, estas construcciones de ADNc que sintetizan ARN antisentido de forma constitutiva o inducible se pueden introducir en líneas celulares, células o tejidos. Moléculas de ARN se pueden modificar para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o modificaciones en los restos nucleobase, azúcar y/o fosfato, p. ej. el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo más que enlaces fosfodiesterasa dentro de la cadena principal de la molécula. Este concepto es inherente en la producción de PNAs y puede extenderse en todas estas moléculas mediante la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como formas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina modificadas con acetilo, metilo, tio y de manera similar, que no son fácilmente reconocidas por endonucleasas endógenas.

Están disponibles muchos métodos para introducir vectores en células o tejidos y son igualmente adecuados para uso in vivo, in vitro y ex vivo. Para la terapia ex vivo, los vectores se pueden introducir en células madre tomadas del paciente y propagadas clónicamente para el trasplante autólogo de nuevo al mismo paciente. El suministro mediante transfección y mediante inyecciones de liposomas se puede conseguir utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Cualquiera de los métodos terapéuticos arriba descritos se puede aplicar a cualquier sujeto adecuado que incluye, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, lo más preferiblemente, seres humanos.

Una descripción adicional de la invención se refiere a la administración de una composición farmacéutica en unión con un soporte farmacéuticamente aceptable para cualquiera de los efectos terapéuticos arriba discutidos. Composiciones farmacéuticas de este tipo pueden consistir en los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención y ácidos nucleicos o proteínas homólogos, anticuerpos contra las proteínas de la invención y proteínas homólogas, miméticos, agonistas, antagonistas o inhibidores de las proteínas de la invención y proteínas homólogas o ácidos nucleicos. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier soporte farmacéutico estéril y biocompatible que incluye, pero no se limita a solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solas o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención se pueden administrar mediante cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a la oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o medios rectales.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener soportes farmacéuticamente aceptables, adecuados, que comprenden excipientes y compuestos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en los preparados que pueden utilizarse farmacéuticamente. Detalles adicionales sobre técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. La determinación de una dosis eficaz se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos con cultivos de células, p. ej. de líneas celulares de preadipocitos o en modelos con animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo con animales también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentraciones y la vía de administración apropiados. Información de este tipo puede luego utilizarse para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo, por ejemplo los ácidos nucleicos o las proteínas de la invención o fragmentos de los mismos o anticuerpos, que

son suficientes para tratar una afección específica. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar mediante procesos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej. DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y éste se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren composiciones farmacéuticas que exhiban altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos con cultivos de células y estudios en animales se utilizan para formular una gama de dosificaciones para uso humano. La dosificación contenida en este tipo de composiciones se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con baja o con ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo en función de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente y la vía de administración. La dosificación exacta será determinada por parte del médico, a la vista de factores relacionados con el sujeto que requiera tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo para mantener el efecto deseado. Factores que pueden tomarse en consideración incluyen la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, edad, peso y sexo del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación o combinaciones de fármacos, sensibilidades a la reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Composiciones farmacéuticas de larga duración se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y de la tasa de eliminación de la formulación particular. Cantidades de dosificación normales pueden variar entre 0,1 y 100.000 µg, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona una guía en cuanto a las dosificaciones y métodos de suministro particulares y que se encuentran generalmente disponibles para los médicos en la técnica. Los expertos en la técnica emplean formulaciones para nucleótidos diferentes a las de proteínas o sus inhibidores. De manera similar, el suministro de polinucleótidos o polipéptidos será específico para células, afecciones, localizaciones, etc. particulares.

En otra realización, se pueden utilizar anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas para el diagnóstico de afecciones o enfermedades caracterizadas por o asociadas con la sobre- o sub-expresión de las proteínas de la invención y proteínas homólogas o en ensayos para vigilar a pacientes que estén siendo tratados con las proteínas de la invención y proteínas homólogas, o efectores de las mismas, p. ej. agonistas, antagonistas o inhibidores. Ensayos diagnósticos incluyen métodos que utilizan el anticuerpo y un marcador para detectar la proteína en fluidos corporales o extractos de células o tejidos humanos. Los anticuerpos se pueden utilizar con o sin modificación y se pueden marcar uniéndolos, ya sea de forma covalente o no covalente, con una molécula informadora. Se puede utilizar una amplia diversidad de moléculas informadoras que son conocidas en la técnica, varias de las cuales se describen arriba.

Una diversidad de protocolos, incluidos ELISA, RIA y FACS, para medir proteínas son conocidos en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de la expresión de genes. Valores normales o convencionales para la expresión de genes se establecen combinando fluidos corporales o extractos de células tomados de sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con anticuerpos contra la proteína bajo condiciones adecuadas para la formación del complejo. La cantidad de formación de complejo estándar se puede cuantificar por diversos métodos, pero preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades de proteínas expresadas en muestras control y patológicas, p. ej. de tejidos biopsiados, se comparan con los valores convencionales. La desviación entre los valores convencionales y objeto establece los parámetros para el diagnóstico de la enfermedad.

En otra realización de la invención, los polinucleótidos específicos para las proteínas de la invención y proteínas homólogas se pueden utilizar para fines diagnósticos. Los polinucleótidos que se pueden utilizar incluyen secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ARN y ADN antisentido y PNAs. Los polinucleótidos se pueden utilizar para detectar y cuantificar la expresión de genes en tejidos biopsiados, en los que la expresión de genes se puede correlacionar con la enfermedad. El ensayo diagnóstico se puede utilizar para distinguir entre ausencia, presencia y exceso de expresión de genes, y para vigilar la regulación de los niveles de proteínas durante la intervención terapéutica.

En un aspecto, se puede utilizar la hibridación con sondas que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, incluidas secuencias genómicas que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas o moléculas estrechamente relacionadas para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína respectiva. Las sondas de hibridación de la presente invención pueden ser ADN o ARN, y preferiblemente se derivan de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que codifica las proteínas de la invención, o de una secuencia genómica, incluidos elementos promotores, potenciadores, e intrones del gen que se produce de forma natural. Sondadas de hibridación se pueden marcar mediante una diversidad de grupos informadores, por ejemplo

radionucleidos tales como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$  o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de sistemas de acoplamiento de avidina/biotina, y similares.

5 Secuencias de polinucleótidos específicas para las proteínas de la invención y ácidos nucleicos homólogos se pueden utilizar para el diagnóstico de afecciones o enfermedades que están asociadas con la expresión de las proteínas. Ejemplos de afecciones o enfermedades de este tipo incluyen, pero no se limitan a enfermedades y trastornos metabólicos que incluyen obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico. Secuencias de polinucleótidos específicas para las proteínas de la invención y proteínas homólogas también se pueden utilizar para vigilar el progreso de pacientes que reciben tratamiento para enfermedades metabólicas y trastornos, incluida la obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico. Las secuencias de polinucleótidos se pueden utilizar en ensayos cualitativos o cuantitativos, p. ej. en el análisis de Southern o Northern, borrones de transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en la membrana; en tecnologías de PCR; o en ensayos de tiras reactivas, pasador, ELISA o chips, utilizando fluidos o tejidos de biopsias de pacientes para detectar la expresión alterada de genes.

15 En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos específicas para las proteínas de la invención y ácidos nucleicos homólogos pueden ser útiles en ensayos que detectan la activación o inducción de diversas enfermedades y trastornos metabólicos, incluidos obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico. Las secuencias de nucleótidos pueden ser marcadas por métodos convencionales y pueden añadirse a una muestra de fluido o tejido de un paciente bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un período de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y compara con un valor estándar. La presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas en la muestra, indica la presencia de la enfermedad asociada. Ensayos de este tipo también se pueden utilizar para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular en estudios con animales, en ensayos clínicos o en la vigilancia del tratamiento de un paciente individual.

25 Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad asociada con la expresión de las proteínas de la invención y proteínas homólogas, se establece un perfil normal estándar para la expresión. Esto se puede conseguir combinando fluidos corporales o extractos de células tomados de sujetos normales, ya sean animales o 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, bajo condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación convencional se puede cuantificar comparando los valores obtenidos de sujetos normales con los de un experimento en que se utiliza una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Valores convencionales obtenidos a partir de muestras normales se pueden comparar con valores obtenidos de muestras de pacientes que son sintomáticos para la enfermedad. La desviación entre los valores convencionales y objeto se utiliza para establecer la presencia de una enfermedad. Una vez que se ha establecido 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 del paciente comienza a aproximarse al que se observa en el paciente normal. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos se pueden utilizar para demostrar la eficacia del tratamiento a lo largo de un período que oscila desde varios días a meses.

40 Con respecto a las enfermedades metabólicas tales como las arriba descritas, la presencia de una cantidad inusual de transcrito en tejido biopsiado procedente de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar medios para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o un tratamiento agresivo en una fase más temprana, evitando con ello el desarrollo o el progreso ulterior de las enfermedades y trastornos metabólicos.

45 Usos diagnósticos adicionales para oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias que codifican las proteínas de la invención y proteínas homólogas pueden implicar el uso de PCR. Oligómeros de este tipo pueden sintetizarse químicamente, generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferiblemente en dos secuencias de nucleótidos, una con orientación sentido (5prima.fwdarw.3prima) y otra con antisentido (3prima.rarw.5prima), empleadas bajo condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Se pueden emplear los mismos dos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros o incluso una agrupación degenerada de oligómeros bajo condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN estrechamente relacionadas.

55 En otra realización de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos también se pueden utilizar para generar sondas de hibridación que son útiles para la representación en mapa de la secuencia genómica que se produce de

forma natural. Las secuencias se pueden representar en mapa a un cromosoma particular o a una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Técnicas de este tipo incluyen FISH, FACS o construcciones de cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones bacterianas P1 o bancos de ADNc de cromosomas sencillos tal como se revisa en Price, C. M. (1993) *Blood Rev.* 7: 127-134 y Trask, B. J. (1991) *Trends Genet.* 7:149-154. FISH (tal como se describe en Verma et al. (1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, Nueva York, N.Y.). Los resultados se pueden correlacionar con otras técnicas de representación en mapa de cromosomas físico y datos de mapas genéticos. Ejemplos de datos de mapas genéticos se pueden encontrar en el *Genome Issue of Science* de 1994 (265:1981f). La correlación entre la utilización del gen que codifica las proteínas de la invención en un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica o predisposición a una enfermedad específica pueden ayudar a delimitar la región de ADN asociada con esa enfermedad genética.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para detectar diferencias en las secuencias de genes entre individuos normales, portadores o afectados. Se puede llevar a cabo un análisis de polimorfismos, p. ej. polimorfismos de un solo nucleótido. Además, para ampliar los mapas genéticos se puede utilizar la hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y técnicas de representación en mapa físicas tales como el análisis de enlace utilizando marcadores de cromosomas establecidos. A menudo, la disposición de un gen en el cromosoma de otra especie de mamífero tal como ratón, puede revelar marcadores asociados, incluso si se desconoce el número o brazo de un cromosoma humano particular. Nuevas secuencias se pueden asignar a brazos o partes de cromosomas de las mismas mediante representación en mapa física. Esto proporciona una valiosa información a los investigadores que investigan genes patológicos utilizando la clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez que la enfermedad o síndrome ha sido localizado de manera aproximada mediante enlace genético a una región genómica particular, por ejemplo AT a 11q22-23 (Gatti, R. A. et al. (1988) *Nature* 336: 577-580), cualesquiera secuencias representadas en mapa de ese área pueden representar genes asociados o reguladores para una investigación ulterior. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden también utilizarse para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc. entre individuos normales, portadores o afectados.

En otra realización de la invención, las proteínas de la invención, sus fragmentos catalíticos o inmunogénicos u oligopéptidos de las mismas, un modelo in vitro, una célula o animal genéticamente alterado, se puede utilizar para el rastreo de bancos de compuestos en cualquiera de una diversidad de técnicas de rastreo de fármacos. Se pueden identificar vectores, p. ej. receptores, enzimas, proteínas, ligandos o sustratos que se unen a, modulan o mimetizan la acción de una o más de las proteínas de la invención. La proteína o fragmento de la misma empleada en un rastreo de este tipo puede estar libre en disolución, fijado a un soporte sólido, portado sobre una superficie de la célula o localizado intracelularmente. Se puede medir la formación de complejos de unión entre las proteínas de la invención y el agente sometido a ensayo. Los agentes también podrían influir ya sea directa o indirectamente, sobre la actividad de las proteínas de la invención.

Además, la actividad de las proteínas de la invención frente a su o sus sustratos fisiológicos o derivados de los mismos podría medirse en ensayos basados en células o exentos de células. Los agentes también pueden interferir con modificaciones post-traducción de la proteína tales como fosforilización y desfosforilación, farnesilación, palmitoilación, acetilación, alquilación, ubiquitinación, procesamiento proteolítico, localización subcelular y degradación. Además de ello, agentes podrían influir sobre 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 molecular, enzimas, receptores o factores de traducción. Agentes también podrían 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.

Métodos para determinar la interacción proteína-proteína son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión de un péptido marcado de modo fluorescente, derivado de la proteína interactuante con la proteína de la invención, o viceversa, podría detectarse mediante un cambio en la polarización. En el caso de que los dos participantes en la unión, que pueden ser las proteínas de longitud completa así como un agente de unión en calidad de la proteína de longitud completa y el otro sólo representado como un péptido, estén marcados fluorescentemente, la unión podría detectarse mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) desde un fluoróforo al otro. Además, es bien conocida en la técnica una diversidad de principios de ensayo, comercialmente disponibles, adecuados para la detección de la interacción proteína-proteína, por ejemplo, pero no exclusivamente, AlphaScreen (PerkinElmer) o ensayos de proximidad de centelleo (SPA) de Amersham. Alternativamente la

- interacción de las proteínas de la invención con proteínas celulares podría ser la base de un ensayo de rastreo basado en células en el que las dos proteínas son marcadas de modo fluorescente y la interacción de las dos proteínas se detecta analizando la co-translocación de las dos proteínas con un lector de imágenes celular tal como se ha desarrollado, por ejemplo, pero no exclusivamente por Cellomics o EvotecOAI. En todos los casos, los dos o más participantes en la unión pueden ser proteínas diferentes, siendo una la proteína de la invención, o, en el caso de la dimerización y/u oligomerización, la proteína de la invención propiamente dicha. Proteínas de la invención para las que un mecanismo diana de interés, pero no solamente el único serían interacciones proteína/proteína de este tipo son PSAP, SFTPB y/o FLJ40379.
- De particular interés son ensayos de rastreo de agentes que tengan una baja toxicidad para células de mamíferos. El término "agente" tal como se utiliza en esta memoria describe cualquier molécula, p. ej. proteína o producto farmacéutico, con la capacidad de alterar o mimetizar la función fisiológica de una o más de las proteínas de la invención. Agentes candidatos abarcan numerosas clases de productos químicos, a pesar de que típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente pequeños compuestos orgánicos que tienen un peso molecular mayor que 50 y menor que aproximadamente 2.500 Dalton. Agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden a menudo estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores.
- Agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, ácidos nucleicos y derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Agentes candidatos se obtienen de una amplia diversidad de fuentes que incluyen bancos de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles o se producen fácilmente bancos de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, bancos y compuestos naturales o producidos de modo sintético se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y se pueden utilizar para producir bancos combinatorios. Agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales. En los casos en los que el ensayo de rastreo sea un ensayo de unión, una o más de las moléculas se pueden unir a un marcador, en que el marcador puede proporcionar, directa o indirectamente, una señal detectable.
- Otra técnica para el rastreo de fármacos que se puede utilizar proporciona un rastreo de alto rendimiento de compuestos con una afinidad de unión adecuada a la proteína de interés, según se describe en la solicitud PCT WO 84/03564 publicada. En este método, según se aplica a las proteínas de la invención, se proporcionan o sintetizan sobre un sustrato sólido tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie, grandes números de diferentes pequeños compuestos de ensayo, p. ej. aptámeros, péptidos, compuestos de bajo peso molecular, etc. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con las proteínas o fragmentos de las mismas y se lavan. Las proteínas unidas se detectan luego por métodos bien conocidos en la técnica. Proteínas purificadas también se pueden revestir directamente sobre placas para uso en las técnicas de rastreo de fármacos antes mencionadas. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido. En otra realización, se pueden utilizar ensayos de rastreo de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes capaces de unir la proteína compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión de la proteína. De esta manera, los anticuerpos se pueden utilizar para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con la proteína.
- En una realización adicional, la presente invención permite la producción de células para la identificación y/o caracterización de compuestos que estimulan la diferenciación de células beta, secreción de insulina y/o respuesta a la glucosa, más particularmente de compuestos que aumentan el nivel de expresión o la función de prosaposina. Este método es particularmente adecuado para el ensayo in vivo para aplicaciones diagnósticas y el desarrollo o rastreo de fármacos. El compuesto de interés se añade a células adecuadas y se determina la expresión o función de prosaposina. Alternativamente, un compuesto de interés se añade a una célula tratada con prosaposina y se determina el efecto sobre la diferenciación de la célula y/o la producción de insulina. Preferiblemente, se utilizan células productoras de insulina diferenciadas. Los niveles de insulina en células tratadas se pueden determinar, p. ej. cuantificar, mediante análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA). Utilizando este método se puede rastrear un gran número de compuestos, y se pueden identificar fácilmente los

compuestos que inducen la expresión de prosaposina o sustentan la actividad de prosaposina que conduce a una diferenciación de células beta y/o a un incremento de la secreción de insulina.

5 En un método de rastreo de alto rendimiento, las células se transfectan con una construcción de ADN, p. ej. un vector viral o no viral que contiene un gen informador, p. ej. el gen lacZ o el gen GFP, bajo el control regulador de un promotor de un gen implicado en la diferenciación de células beta, p. ej. preferiblemente un promotor Pax4. Las células transfectadas se dividen en partes alícuotas, y cada una de las partes alícuotas se pone en contacto con una sustancia de ensayo, p. ej. candidato 1, candidato 2 y candidato 3. La actividad del gen informador se corresponde con la capacidad del compuesto de ensayo de inducir la diferenciación de células beta.

10 En una realización adicional (que se puede combinar con el rastreo de alto rendimiento tal como se describe antes), se lleva a cabo una validación de rendimiento medio. En ella, el compuesto de ensayo se añade a células que están siendo cultivadas y se determina la expresión de prosaposina y/o la producción de insulina. Después de un ensayo de rendimiento alto inicial, tal como el ensayo basado en células arriba esbozado, en el que se utiliza, p. 15 ej., un promotor Pax4 como marcador para la regeneración de células beta, la actividad de moléculas candidatas para inducir la diferenciación de células beta se testa en un ensayo de validación que comprende añadir dichos compuestos a los medios de cultivo de los cuerpos embrioides. La diferenciación en células productoras de insulina se evalúa después, p. ej. mediante comparación con células de tipo salvaje y/o células que expresan Pax4 para evaluar la eficacia de un compuesto.

20 Los ácidos nucleicos que codifican la proteína de la invención se pueden utilizar para generar animales transgénicos o modificaciones de genes específicas para el sitio en líneas celulares. Estos animales no humanos transgénicos son útiles en el estudio de la función y regulación de la proteína de la invención in vivo. Animales transgénicos, particularmente animales transgénicos mamíferos, pueden servir como un sistema modelo para la 25 investigación de muchos procesos de desarrollo y celulares comunes a los seres humanos. Se puede utilizar una diversidad de modelos no humanos de trastornos metabólicos para someter a ensayo efectores/moduladores de la proteína de la invención. La expresión errónea (por ejemplo, la sobre-expresión o carencia de expresión) de la proteína de la invención, condiciones de alimentación particulares y/o la administración de compuestos biológicamente activos pueden crear modelos de trastornos metabólicos.

30 En una realización de la invención, ensayos de este tipo utilizan modelos con ratones de resistencia a la insulina y/o diabetes tales como ratones que portan inactivaciones de genes en la vía de la leptina (por ejemplo ratones ob (leptina) o db (receptor de leptina)). Ratones de este tipo desarrollan síntomas típicos de diabetes mostrando una acumulación de lípidos hepática y teniendo, frecuentemente, niveles de lípidos en plasma incrementados (véase 35 Bruning J.C. et al., 1998, supra). Ratones de tipo salvaje susceptibles (por ejemplo C57Bl/6) muestran síntomas similares si son alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. Además, para someter a ensayo la expresión de las proteínas de la invención en cepas de ratones de este tipo (véase la sección de Ejemplos), estos ratones se podrían utilizar para testar si la administración de un efector/modulador candidato altera, por ejemplo, la acumulación de lípidos en el hígado, en el plasma o tejidos adiposos utilizando ensayos convencionales bien conocidos en la técnica tales como FPLC, ensayos colorimétricos, ensayos del nivel de glucosa en sangre, 40 ensayos de tolerancia a la insulina y otros.

45 Animales transgénicos se pueden crear a través de recombinación homóloga en células madre embrionarias no humanas, en donde está alterado el locus normal del gen que codifica la proteína de la invención. Alternativamente, una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de la invención se inyecta en oocitos y se integra aleatoriamente en el genoma. Vectores para la integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus animales, cromosomas artificiales de levaduras (YACs) y similares. Las células o animales modificados son útiles en el estudio de la función y regulación de la proteína de la invención. Por ejemplo, se puede realizar una serie de pequeñas deleciones y/o sustituciones en el gen que codifica la proteína de la invención para determinar el 50 papel de dominios particulares de la proteína, funciones en la diferenciación pancreática, etc.

Además de ello, variantes del gen de la invención tales como construcciones específicas de interés, incluyen moléculas antisentido que bloquearán la expresión de la proteína de la invención, o la expresión de mutaciones dominantes negativas. Un marcador detectable tal como, por ejemplo, lac-Z o luciferasa se puede introducir en el 55 locus del gen de la invención en que la supra-regulación de expresión del gen de la invención resultará en un cambio fácilmente detectado en el fenotipo.

También se puede proporcionar la expresión del gen de la invención o variantes del mismo en células o tejidos en

donde normalmente se expresa o en instantes anormales del desarrollo. Además, al proporcionar la expresión de la proteína de la invención en células en las que no se produce normalmente, se pueden inducir cambios en el comportamiento de la célula.

- 5 Construcciones de ADN para la recombinación homóloga comprenderán al menos partes del gen de la invención con la modificación genética deseada, e incluirán regiones de homología con el locus diana. Construcciones de ADN para la integración aleatoria no necesitan contener regiones de homología para mediar en la recombinación. De manera conveniente, están incluidos marcadores para la selección positiva y negativa. Construcciones de ADN para la integración aleatoria consistirán en los ácidos nucleicos que codifican la proteína de la invención, un  
10 elemento regulador (promotor), un intrón y una señal de poli-adenilación. Métodos para generar células con modificaciones de genes fijados como objetivo a través de recombinación homóloga son conocidos en la técnica. Para células madre embrionarias (ES) no humanas, se puede emplear una línea de células ES, o se pueden obtener células embrionarias de nueva aportación a partir de un hospedante, p. ej. ratón, rata, cobaya, etc. Células de este tipo se hacen crecer en una capa alimentadora de fibroblastos apropiada y se hacen crecer en presencia de  
15 factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Cuando se han transfectado células ES o embrionarias no humanas o células madre pluripotentes somáticas, éstas se pueden utilizar para producir animales transgénicos. Después de la transfección, las células se extienden en placas sobre una capa alimentadora en un medio apropiado. Células que contienen la construcción se pueden  
20 seleccionar empleando un medio selectivo. Después de un tiempo suficiente para que crezcan las colonias, éstas se recogen y analizan en cuanto a la aparición de recombinación homóloga o integración de la construcción. Aquellas colonias que sean positivas se pueden luego utilizar para la transfección de embriones y la agregación de una mórula. En síntesis, las mórulas se obtienen de hembras supra-ovuladas de 4 a 6 semanas de edad, se retira la zona pelúcida y las mórulas se colocan en pequeñas depresiones de una placa de cultivo tisular. Las células ES se tripsinizan, y las células modificadas se colocan en la depresión muy cercanas a las mórulas. Al día siguiente, los agregados se transfieren a los cuernos uterinos de hembras pseudo-preñadas. Las hembras se deja luego que lleguen al término. La descendencia quimérica se puede detectar fácilmente mediante un cambio en el color de la capa y subsiguientemente se rastrean en cuanto a la transmisión de la mutación en la siguiente generación (generación F1). La descendencia de la generación F1 se rastrea en cuanto a la presencia del gen modificado y los  
30 machos y hembras que tienen la modificación se aparean para producir una progenie homocigótica. Si las alteraciones del gen provocan letalidad en algún instante en el desarrollo, los tejidos u órganos se pueden mantener en forma de injertos o trasplantes alogénicos o congénicos, o en cultivo in vitro. Los animales transgénicos pueden ser cualquier mamífero no humano tal como un animal de laboratorio, animales domésticos, etc., por ejemplo ratón, rata, cobaya, oveja, vaca, cerdo, y otros. Los animales transgénicos pueden utilizarse en estudios funcionales, rastreo de fármacos y otras aplicaciones y son útiles en el estudio de la función y regulación de la proteína de la invención in vivo.  
35

Finalmente, la solicitud describe también un kit que comprende al menos uno de

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la invención o un fragmento de la misma;  
40 (b) una proteína de la invención o un fragmento o una isoforma de la misma;  
(c) un vector que comprende el ácido nucleico de (a);  
(d) una célula hospedante que comprende el ácido nucleico de (a) o el vector de (c);  
(e) un polipéptido codificado por el ácido nucleico de (a);  
(f) un polipéptido de fusión codificado por el ácido nucleico de (a);  
45 (g) un anticuerpo, un aptámero u otro modulador/efector del ácido nucleico de (a) o el polipéptido de (b), (e) o (f) y  
(h) un oligonucleótido antisentido del ácido nucleico de (a).

El kit se puede utilizar para fines diagnósticos o terapéuticos o para aplicaciones de rastreo según se describe arriba. El kit puede contener, además, instrucciones para el usuario.  
50

Las Figuras muestran:

La **Figura 1** muestra el contenido de metabolitos de almacenamiento de energía (ESM; triglicéridos (TG) y glucógeno) de mutantes relacionados con saposina de *Drosophila* (número de acceso GadFly CG12070). Se muestra el cambio en el contenido en triglicéridos de moscas HD-EP(3)36824 provocado por la integración del vector P en la unidad de transcripción anotada ('HD-36824 (TG, 70°C)', columna 3 y 'HD-36824 (TG, 90°C)', columna 6) en comparación con testigos que contienen aproximadamente 880 líneas de moscas de la colección  
55

propiedad EP ('HD-control, (TG, 70°C)'), columna 1) y controles de tipo salvaje determinados en 4 ensayos independientes (a los que se alude como "WT-control (TG, 70°C)", columna 2) y en comparación con controles que contienen aproximadamente 2100 líneas de moscas de la colección propiedad EP ('HD-control (TG, 90°C)'), columna 4) y controles de tipo salvaje determinados en más de 80 ensayos independientes (a los que se alude como "WT-control (TG, 90°C)", columna 5). También se muestra el cambio del contenido en glucógeno de moscas HD-EP(3)36824 provocado por la integración del vector P en la unidad de transcripción anotada ('HD-36824 (glucógeno, 90°C)', columna 8) en comparación con un control de ensayo interno que incluye dos cepas de tipo salvaje y una línea HD (a la que se alude como 'control de ensayo (glucógeno, 90°C)', columna 7).

La **Figura 2** muestra la organización molecular del locus del gen relacionado con saposina de *Drosophila* mutado (al que se alude como Sap-r; número de acceso GdFly GC12070).

La **Figura 3** muestra proteínas relacionadas con saposina humana: prosaposina (variante de la enfermedad de Gaucher y leucodistrofia metacromática variante, PSAP), proteína B asociada a surfactante pulmonar humana (SFTPb) y proteína hipotética humana FLJ40379.

La **Figura 3A** muestra la secuencia de ácidos nucleicos de PSAP humana (SEQ ID NO: 1).

La **Figura 3B** muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de PSAP humana (SEQ ID NO: 2).

La **Figura 3C** muestra la secuencia de ácidos nucleicos de SFTPb humana (SEQ ID NO: 3).

La **Figura 3D** muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de SFTPb humana (SEQ ID NO: 4).

La **Figura 3E** muestra la secuencia de ácidos nucleicos de FLJ40379 humana (SEQ ID NO: 5).

La **Figura 3F** muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de FLJ40379 humana (SEQ ID NO: 6).

La **Figura 3G** muestra la comparación (análisis del alineamiento de la secuencia de proteínas ClustalW (1.83)) de proteínas humanas y de *Drosophila*. Los huecos en el alineamiento se representan como -. En la figura, 'PSAP Hs' se refiere a prosaposina humana, 'FLJ40379 Hs' se refiere a proteína hipotética humana FLJ40379, 'SFTPb Hs' se refiere a proteína B asociada a surfactante pulmonar humana y 'Sap-r Dm' se refiere a proteína relacionada con saposina de *Drosophila*.

La **Figura 4** muestra el análisis cuantitativo de la expresión de prosaposina (Psap) homóloga a Sap-r en tejidos de mamíferos. La expresión de ARN relativa se muestra en el eje Y, en las Figuras 4A a 4C los tejidos sometidos a ensayo se dan en el eje X. WAT se refiere a tejido adiposo blanco, BAT se refiere a tejido adiposo pardo. En la Figura 4D, el eje X representa el eje del tiempo, 'd0' se refiere al día 0 (comienzo del experimento), 'd2' - 'd10' se refiere al día 2 - día 10 de la diferenciación de adipocitos.

La **Figura 4A** muestra el análisis cuantitativo de la expresión de Psap en tejidos de tipo salvaje de ratón.

La **Figura 4B** muestra el análisis cuantitativo de la expresión de Psap en ratones de tipo salvaje (ratones wt) en comparación con ratones genéticamente obesos (ratones ob/ob) y con ratones en ayunas (ratones-ayunas).

La **Figura 4C** muestra el análisis cuantitativo de la expresión de Psap en ratones alimentados con una dieta control en comparación con ratones alimentados con una dieta con alto contenido en grasa.

La **Figura 4D** muestra el análisis cuantitativo de la expresión de Psap en células de fibroblastos de mamíferos (3T3-L1) durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

La **Figura 5** muestra el análisis de la expresión de prosaposina (PSAP) en adipocitos humanos.

La **Figura 5A** muestra la expresión de PSAP en células de adipocitos abdominales primarios humanos durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

La **Figura 5B** muestra la expresión de PSAP en células SGBS humanas durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.

La **Figura 6** muestra la inducción, dependiente de prosaposina, de la diferenciación de células productoras de insulina.

Células madre embrionarias (ES) de ratón se diferenciaron según se describe previamente (solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107, que se incorpora en esta memoria como referencia). Al término del proceso de diferenciación, las células se recolectaron y el ARN total se aisló. La abundancia de ARNm de insulina (Figura 6A) y de ARNm del transportador de glucosa de células beta (Glut2) (Figura 6B) se determinó utilizando la RT-PCR cuantitativa en un dispositivo de detección de la secuencia Applied Biosystems 7000. Los niveles se normalizaron utilizando ARN 18S como control y un número de ciclo de 36 como referencia. Los números de la línea vertical se refieren a la abundancia de los transcritos indicados con relación a una abundancia para la que son necesarios 36 ciclos para la detección. 'R1' se refiere a células madre embrionarias (ES) de ratón R1 no modificadas; 'Pax4' se refiere a células madre embrionarias (ES) de ratón R1 establemente transfectadas

con una construcción de expresión CMV-Pax4; 'expresión de insulina rel. con  $\Delta$ Ct36' se refiere a la expresión de insulina en la Figura 6A, y 'expresión de Glut2 rel. con  $\Delta$ Ct36' se refiere a la expresión de Glut2 transportadora de glucosa de células beta en la Figura 6B; 'ES' se refiere a células madre embrionarias de ratón según se describe en el Ejemplo 7; 'células 293 control' se refiere al protocolo de diferenciación según se describe en el Ejemplo 8, con la adición de sobrenadante de células 293 sin prosaposina; 'Psap' se refiere al protocolo de diferenciación según se describe en el Ejemplo 9, con la adición de sobrenadante enriquecido en prosaposina de células 293 a células diferenciadas).

Los ejemplos ilustran la invención:

#### **Ejemplo 1: Medición de los contenidos en metabolitos de almacenamiento de energía (ESM) en Drosophila**

Moscas mutantes se obtienen de una colección de reserva de mutación de moscas. Las moscas se hacen crecer bajo condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica. En el curso del experimento se proporcionan alimentaciones adicionales con levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) para la línea EP HD-EP(3)36824. Se investigó el cambio medio del contenido en triglicéridos y glucógeno (a los que se alude en esta memoria como metabolitos de almacenamiento de energía, ESM) de *Drosophila* que contiene los vectores EP en forma de una integración viable homocigótica en comparación con moscas control, respectivamente (véase la Figura 1). Para la determinación del contenido en ESM, las moscas se incubaron durante 5 min a 70°C o 90°C en un tampón acuoso utilizando un baño de agua, seguido de extracción en caliente. Después de otros 5 min de incubación a 70°C o 90°C y suave centrifugación, se determinó el contenido en triglicéridos del extracto de las moscas utilizando el ensayo de triglicéridos Sigma (INT 336-10 o -20) midiendo los cambios en la densidad óptica de acuerdo con el protocolo del fabricante, y el contenido en glucógeno del extracto de las moscas se determinó utilizando el ensayo de Roche (método UV de almidón Cat. N° 0207748) midiendo cambios en la densidad óptica de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como referencia, se midió el contenido en proteínas del mismo extracto utilizando el ensayo de proteínas BIO-RAD DC de acuerdo con el protocolo del fabricante. Estos experimentos y ensayos se repitieron varias veces.

El nivel medio de triglicéridos de 883 líneas de moscas de la colección EP propiedad se determinó a 70°C (a la que se alude como 'HD-control (TG, 70°C)') se muestra como el 100% en la primera columna en la Figura 1. El nivel medio de triglicéridos de la cepa de tipo salvaje de *Drosophila*, moscas Oregon R, determinada en 4 ensayos independientes a 70°C (a la que se alude como 'WT-control (TG, 70°C)') se muestra como 116% en la segunda columna en la Figura 1. El nivel de triglicéridos medio ( $\mu$ g de triglicéridos/ $\mu$ g de proteínas) de 2108 líneas de moscas de la colección EP propiedad, determinado a 90°C (al que se alude como 'HD-control (TG, 90°C)') se muestra como 100% en la cuarta columna en la Figura 1. El nivel medio de triglicéridos ( $\mu$ g de triglicéridos/ $\mu$ g de proteínas) de la cepa de tipo salvaje de *Drosophila*, moscas Oregon R, determinada en 84 ensayos independientes a 90°C (a la que se alude como 'WT-control (TG, 90°C)') se muestra como 102% en la quinta columna de la Figura 1. El nivel de triglicéridos medio ( $\mu$ g de glucógeno/ $\mu$ g de proteínas) de un control de ensayo interno que consiste en dos cepas de tipo salvaje diferentes y una línea EP inadvertida de la colección de reserva HD (a la que se alude como 'control de ensayo (glucógeno, 90°C)') se muestra como 100% en la séptima columna en la Figura 1. El nivel de triglicéridos medio ( $\mu$ g de triglicéridos/ $\mu$ g de proteínas) de todas las moscas de la colección EP (a la que se alude como 'EP-control') se muestra como 100% en la primera columna en la Figura 5. Las desviaciones estándar de las mediciones se muestran como barras delgadas.

Moscas homocigóticas HD-EP(3)36824 muestran constantemente un contenido menor en triglicéridos que los controles (columna 3 en la Figura 1, 'HD-36824 (TG, 70°C)'; columna 6 en la Figura 1, 'HD-36824 (TG, 90°C)'). Moscas homocigóticas HD-EP(2)21554 muestran también un menor contenido en glucógeno que los controles (columna 8 en la Figura 1, 'HD-36824 (glucógeno, 90°C)'). Por lo tanto, la pérdida de la actividad génica es la responsable de los cambios en el metabolismo de los metabolitos de almacenamiento de energía.

#### **Ejemplo 2: Identificación de genes de Drosophila responsables de los cambios en los contenidos en metabolitos**

Se aislaron secuencias de ADN genómico que están localizadas directamente junto a la integración del vector EP (en esta memoria HD-EP(3)36824). Utilizando las secuencias genómicas aisladas de moscas homocigóticas HD-EP(3)36824 se rastrearon bases de datos públicas tales como el Berkeley *Drosophila* Genome Project (Proyecto del Genoma de *Drosophila* de Berkeley) (GadFly). El sitio de localización cromosómica de la integración del vector HD-EP(3)36824 se encuentra en el locus del gen 3R, 100A6-7 (Flybase y Gadfly). Se confirmó el sitio de

integración viable homocigótico del vector HD-EP(3)36824 en el par de bases 535 del transcrito de Sap-r CG12070-RA y se 61 pares de bases 5prima del transcrito de Sap-r CG12070-RB en la orientación antisentido. Por lo tanto, la expresión de los ADNcs codificados por Sap-r podría verse afectada por la integración del vector de la línea HD-EP(3)36824 que conduce a un cambio en la cantidad de metabolitos de almacenamiento de energía. La

5 Figura 2 muestra la organización molecular de este locus del gen. Una doble flecha negra en el centro de la figura representa la secuencia de ADN genómico. El espacio entre dos marcas representa un tramo de 1000 pares de bases. El triángulo en negro marcado 'HD-EP36824' indica el sitio de integración del vector EP. Los transcritos de Sap-r (tal como se predice por el Proyecto del Genoma de Drosophila de Berkeley) se muestran como barras grises oscuras (exones) enlazados por líneas grises oscuras (intrones) en la mitad inferior de la figura marcada como 'Sap-r'.

10

La **Tabla 1** resume los datos del análisis molecular llevado a cabo por los autores de la invención de las proteínas de Drosophila identificadas en esta invención como implicadas en la regulación del metabolismo.

15 **Tabla 1.** Análisis molecular de proteínas relacionadas con saposina de Drosophila

Análisis	Resultado
<b>Dominios de proteínas</b>	Beta-Ig-H3/Fasciclina (Flybase)
<b>Análisis interpro</b>	Saposina tipo B, saposina tipo A, , proteína B surfactante
<b>Locus</b>	3R, 100 <sup>a</sup> 6-7 (Flybase, Gadfly publicación 3)
<b>ADNc (sap-r)</b>	AI108030 (ARNm de 578 pares de bases), AI109190 (ARNm de 635 pares de bases)
<b>ADN genómico</b>	AE003775
<b>SeqRef (Sap-r)</b>	NM_079858, NM_170529, NP_524597, NP_733408
<b>Mutaciones y mutantes de Drosophila</b>	Homocigotos para deficiencias separando Sap-r son fértiles y viables y muestran un fenotipo no obvio (Flybase)

### Ejemplo 3: Identificación de las proteínas homólogas relacionadas con saposina humana

20 Por lo tanto, proteínas homólogas relacionadas con saposina y moléculas de ácidos nucleicos que las codifican se pueden obtener a partir de especies de insectos o vertebrados, p. ej. mamíferos o aves, preferiblemente de seres humanos, ratón o Drosophila. Secuencias homólogas a proteína relacionada con saposina de Drosophila se identificaron utilizando el programa públicamente disponible BLASTP 2.2.3 de la base de datos de proteínas no redundante del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (véase Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-33402). La Tabla 2 muestra homólogos humanos preferidos del gen relacionado con saposina de

25 Drosophila.

La expresión "polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en el número de acceso GenBank" se refiere al gen expresable de las secuencias de nucleótidos depositadas bajo el correspondiente número de acceso GenBank. La expresión "número de acceso GenBank" se refiere a las entradas en la base de datos de GenBank de NCBI (Ref: Benson et al., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 15-18).

30

**Tabla 2. Proteínas humanas homólogas a proteínas relacionadas con saposina de Drosophila**

#### 35 I. Proteínas humanas homólogas a Sap-r de Drosophila

##### IA. Prosaposina humana (PSAP)

Identificación del locus humano NCBI (ID): 5660, Hs PSAP, prosaposina (variante de la enfermedad de Gaucher y leucodistrofia metacromática variante), 10q21-q22

40 RefSeq: número de acceso GenBank: NM\_002778

##### IB. Proteína B surfactante pulmonar humana (SFTPB)

Identificación del locus humano NCBI (ID): 6439; Hs SFTPB, proteína B asociada a surfactante pulmonar, 2p12-p11.2

45 Alias: SP-B, PSP-B, SFTB3, SFTP3

RefSeq: número de acceso GenBank: NM\_000542

##### IC. Proteína hipotética humana FLJ40379

Nucleótido: número de acceso ENSEMBL: ENSG00000173005

Proteína: número de acceso ENSEMBL: ENSP00000308224, Índice Internacional de Proteínas (IPT, número de acceso: IPI00163920)

#### 5 **Ejemplo 4: Identificación de factores secretados, expresados en el páncreas**

Se llevó a cabo un rastreo de factores secretados, expresados en el páncreas de ratones en desarrollo de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase por ejemplo, Pera E.M. y De Robertis E.M., (2000) Mech Dev 96(2): 183-195) con varias modificaciones.

10

Banco de ADNc de expresión:

Durante la organogénesis, el brote pancreático está rodeado y se ve influenciado por el mesénquima asociado. (Véase, por ejemplo, Madsen O.D. et al., (1996) Eur. J. Biochem. 242: 435-445 y Slack, J.M., (1995) Development 121: 1569-1580). Recientemente, se sugirió que adipocitos blancos se originan directamente de células mesenquimales (Atanossova P.K., (2003) Folia Med. 45: 41-45). Durante la embriogénesis se puede observar la innervación y vascularización del páncreas. Por lo tanto, el tejido utilizado en el rastreo puede haber contenido además de células pancreáticas, algunos precursores de adipocitos, vasos sanguíneos así como células neuronales.

20

Se preparó un banco de brotes pancreáticos de ratón de fase embrionaria 9,5-15 en el vector pCMVSPORT-6 utilizando el Sistema de Plásmidos SUPERSCRIPT de Invitrogen (nº de cat 18248) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El banco no amplificado se sometió a electroporación en células MaxEff DH10B (Invitrogen).

25

Clonación de secreción

Clones bacterianos procedentes de placas de agar se escogieron con palillos estériles y se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en 1 ml de ampicilina LB (véase Sambrook et al., supra). Se agruparon partes alícuotas de 8 cultivos y los ADNs del plásmido se aislaron mediante BioRobot<sub>9600</sub> (QIAGEN) utilizando el kit QIAprep(r) Turbo BioRobot (QIAGEN). Células 293 humanas se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos de 75 ml en DMEM y suero de ternero fetal al 10%. A una confluencia del 90-99%, las células se dividieron en la relación 1:3 y se extendieron sobre placas de 96 pocillos revestidas con poli-D-lisina (Sigma), 150 µl/pocillo. Al día siguiente, las células se transfectaron con 100-500 ng de plásmidos utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen), 0,5 µl/pocillo, en 100 µl/pocillo de Optimem (Invitrogen). Al cabo de 6 h, el medio se cambió por medio de crecimiento completo reciente. 24 horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con DMEM sin cisteína ni metionina (Invitrogen), suplementado con suero bovino dializado al 1% (Sigma) con 50 mg/ml de heparina (Sigma) y glutamina. Las células se marcaron en 50 µl/pocillo del mismo medio y 0,75 µl/pocillo de (-S35 Met-label (HARTMANN ANALYTIC GmbH, nº 44138). 12 horas más tarde, partes alícuotas de 10 µl de los sobrenadantes se recolectaron en placas PCR de 96 pocillos y se sometieron a electroforesis en gel de SDS en geles Criterion de poliacrilamida de gradiente 420% profundos (Biorad) utilizando condiciones reductoras, utilizando una cámara de ejecución en gel Criterion Dodeca Cell (Biorad). Los geles se fijaron en ácido acético al 10%, isopropanol al 25% durante 30 min, se impregnaron durante 15-30 min en reactivo AMPLIFY (Amersham), se secaron y se expusieron a una película X-OMAT (AR) (Kodak). Los clones positivos se identificaron mediante sub-selección. Los 8 clones bacterianos individuales de cada una de las agrupaciones positivas se volvieron a hacer crecer en placas de 96 pocillos, se preparó el ADN de clones individuales y se utilizó para la transfección, según se describe. Si uno de los clones proporcionaba proteínas del mismo tamaño que el de la agrupación original, se identificó un clon positivo. Los clones positivos se secuenciaron parcialmente a partir del extremo 5' (SEQLAB, Goettingen). Secuencias (de aproximadamente 500 nucleótidos) se compararon con las bases de datos públicas de nucleótidos y proteínas para revelar una similitud con proteínas previamente descritas.

50

#### **Ejemplo 5: Expresión de los polipéptidos en tejidos de mamíferos**

Para analizar la expresión de los polipéptidos descritos en esta invención en tejidos de mamíferos, varias cepas de ratones (preferiblemente las cepas de ratones C57Bl/6J, C57Bl/6 ob/ob y C57Bl/KS db/db, que son sistemas modelo convencionales en la investigación de la obesidad y la diabetes) se adquirieron de Harlan Winkelmann (33178 Borchon, Alemania) y se mantuvieron bajo temperatura constante (preferiblemente 22°C), 40 por ciento de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de preferiblemente 14/10 horas. Los ratones fueron alimentados con una

55

comida convencional (por ejemplo, de ssniff Spezialitäten GmbH, bajo el número de encargo ssniff M-Z V1126-000). Para el experimento en ayunas ("ratones de tipo salvaje en ayunas"), los ratones de tipo de tipo salvaje fueron privados de comida durante 48 h, suministrándoles únicamente agua ad libitum (véase, por ejemplo, Schnetzler et al. (1993) J Clin Invest 92: 272-280, Mizuno et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 3434-3438).

5 Los animales fueron sacrificados a una edad de 6 a 8 semanas. Los tejidos de los animales se aislaron de acuerdo con procesos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se necesitaron.

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 pre-adipocitos en adipocitos, se obtuvieron células fibroblastos de mamífero (3T3-L1) (p. ej., Green y Kehinde, Cell 1: 113-116, 1974) de American Tissue Culture Collection (ATCC, Hanassas, VA, EE.UU.; ATCC-CL 173). Células 3T3-L1 se mantuvieron como fibroblastos y se diferenciaron en adipocitos según se describe en la técnica anterior (p. ej., Qiu. et al., J. Biol. Chem. 276: 11988-11995, 2001, Sliker et al., BBRC 251: 225-229, 1998). En síntesis, las células se extendieron en placas en DMEM/FCS al 10% (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) a razón de 50.000 células/pocillo por duplicado en placas de plástico de 6 pocillos y se cultivaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. En la confluencia (definida como el día 0: d0) las células se transfirieron a medio exento de suero (SF) que contenía DMEM/HamF12 (3:1; Invitrogen), fetuína (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, Basilea, Suiza). Se indujo una diferenciación añadiendo 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 la confluencia (d4), las células se mantuvieron en medio SF que contenía insulina bovina (5 µg/ml) hasta completarse la diferenciación. En diversos instantes del proceso de diferenciación, comenzando con el día 0 (día de la confluencia) y el día 2 (adición de hormonas; por ejemplo dexametaxona y 3-isobutil-1-metilxantina) hasta 10 días de diferenciación, se tomaron cada dos días partes alícuotas adecuadas de las células.

El ARN se aisló de tejidos de ratón o células de cultivo celular utilizando el reactivo Trizol (por ejemplo, de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se purificó adicionalmente con el kit RNeasy (por ejemplo, de Qiagen, Alemania), en combinación con un tratamiento de DNAasa de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y según se conoce por los expertos en la técnica. El ARN total se transcribió inversamente (preferiblemente utilizando transcriptasa inversa RNasaH- Superscript II, de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se sometió a análisis Taqman, preferiblemente utilizando la mezcla maestra Taqman 2xPCR (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania; la mezcla contiene, de acuerdo con el fabricante, por ejemplo ADN polimerasa AmpiTaq Gold, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, referencia pasiva Rox y componentes tampón optimizados) en un sistema de detección de la secuencia GeneAmp 5700 (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).

#### **Ejemplo 6. Análisis de la expresión diferencial de transcritos de las proteínas de la invención en tejido humano**

La preparación de ARN procedente de tejidos adiposos primarios humanos y una línea de células de adipocitos humana (SGBS) se realizó según se describe en el Ejemplo 5. La preparación, hibridación y el escaneo dianas se realizaron según se describe en el manual del fabricante (véase Affymetrix Technical Manual, 2002, obtenido de Affymetrix, Santa Clara, EE.UU.).

El análisis de la expresión (utilizando GeneChips de Affymetrix) del gen prosaposina (PSAP), utilizando adipocito abdominal humano primario y la diferenciación de células SGBS demuestra claramente una expresión diferencial de PSAP humana en adipocitos. Se realizaron varios experimentos independientes. Todos los experimentos demuestran que los transcritos de PSAP son más abundantes el día 12 en comparación con el día 0 durante la diferenciación. Estos datos confirman, además, los datos de diferenciación de 3T3-L1 de ratón.

Así, la proteína PSAP ha de ser significativamente incrementada con el fin de que los pre-adipocitos se diferencien en adipocitos maduros. La proteína PSAP en pre-adipocitos tiene el potencial de reforzar la diferenciación adiposa. Por lo tanto, la proteína PSAP podría jugar un papel esencial en la regulación del metabolismo humano, en particular en la regulación de la adipogénesis y, así, podría jugar un papel esencial en la obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico,

#### **Ejemplo 7: Generación de células ES que expresan el gen Pax4**

Células ES R1 de ratón (Nagy et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8424-8428) se sometieron a electroforesis con el gen Pax4 bajo el control del promotor de CMV y el gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor de fosfoglicerato quinasa I (pGK-1).

- 5 Células ES se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 4, g/l de glucosa, beta-mercaptoetanol 10<sup>-4</sup> M, glutamina 2 nM, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de Na 1 nM, FCS al 20% y 500 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF). En síntesis, aproximadamente 10<sup>7</sup> células ES, resuspendidas en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se sometieron a electroporación con 25 µg/ml de vector de expresión linearizado (Joyner, Gene Targeting: A Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York, 1993).
- 10 Cinco minutos después de la electroporación, las células ES se extendieron en placas de Petri que contenían células alimentadoras fibroblásticas previamente inactivadas mediante tratamiento con 100 µg/ml de mitomicina C. Un día después de la electroporación, el medio de cultivo se cambió por medio que contenía 450 µg/ml de G418. Por separado se aislaron clones resistentes y se cultivaron durante 14 días después de aplicar el medio de selección. Las células se cultivaron siempre a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células ES no tratadas y no diferenciadas se utilizaron como testigo del experimento mostrado en la Figura 6 (al que se alude como 'ES' en la Figura 6).
- 15

**Ejemplo 8: Diferenciación de células ES en células productoras de insulina (a las que se alude como 'células 292 control' en la Figura 6)**

- 20 La línea de células ES R1 (tipo salvaje, 'R1' en la Figura 6) y células ES que expresan constitutivamente Pax4 ('Pax4' en la Figura 6) se cultivaron en forma de cuerpos embrioides (EB) por el método de la gota colgante, según se describe en la solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107, con medios como se describe más abajo y en la Tabla 3. Se dejó que los cuerpos embrioides se formaran en cultivos de gota colgante durante 2 días y luego se transfirieron durante tres días a cultivos en suspensión en placas de Petri. El día 5, los
- 25 EBs se extendieron por separado en placas de cultivo celular de 6 cm, revestidas con gelatina, que contenían un medio de diferenciación preparado con una base de medio de Dulbecco modificado por Iscove. Después de la disociación y de la extensión renovada en placas el día 14, las células se cultivaron hasta 40 días en medio de diferenciación preparado con una base de medio de Eagle modificado por Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12).
- 30

**Ejemplo 9: Expresión de genes específicos para el páncreas después de diferenciación de células ES en células productoras de insulina**

- 35 Los niveles de expresión de genes específicos para el páncreas se midieron mediante el análisis Taqman según se describe en el Ejemplo 5. ARN total se aisló de células ES R1 y Pax4<sup>+</sup> no diferenciadas (células ES control) el día 0 y células ES R1 y ES Pax4<sup>+</sup> diferenciadas el día 40. La preparación de ARN se realizó como se describe en el Ejemplo 5, sin utilizar el reactivo Trizol.

- 40 Los resultados demuestran que marcadores para la función de diferenciación de células beta se expresaban a niveles superiores en células ES diferenciadas con Pax4<sup>+</sup> que en células ES de tipo salvaje diferenciadas, demostrando que la activación de un gen control del desarrollo pancreático hace a la diferenciación más eficaz que para células ES de tipo salvaje (Figura 6). La expresión de Glut2 en células madre diferenciadas indica que células productoras de hormonas son capaces de responder a la glucosa. La expresión de cantidades sustanciales de insulina en célula madre diferenciadas indica que células diferenciadas muestran un fenotipo similar a células beta.
- 45

**Ejemplo 10: Inducción de la diferenciación de células productoras de insulina por parte de prosaposina (a la que se alude como 'Psap' en la Figura 6).**

- 50 Con el fin de estudiar el efecto de prosaposina de inducir la diferenciación de células beta in vitro, se generaron, según se describe en el Ejemplo 7, células madre embrionarias (ES) de ratón estables que expresan el Pax4 bajo el control de la región de promotor temprano de citomegalovirus (CMV)/potenciador según se describe en el Ejemplo 7. Pax4 y células ES de tipo salvaje se cultivaron luego en cultivos de la gota colgante o celulares con agitación centrífuga para permitir la formación de cuerpos embrioides. Subsiguientemente, los cuerpos embrioides se extendieron en placas, se disociaron enzimáticamente y se volvieron a extender en placas. Después de la disociación, las células se cultivaron en un medio de diferenciación que contenía diversos factores de crecimiento (véase la Tabla 3 para mayor detalle). Adicionalmente, sobrenadante enriquecido en prosaposina de células 293 se añadió cada segundo día hasta el día 40. Bajo tales condiciones, la expresión de insulina fue significativamente inducida por prosaposina (Figura 6A). Además, la adición de prosaposina al medio de diferenciación potenciaba la
- 55

expresión del transportador de glucosa Glut2 (Figura 6B). En comparación, células ES de tipo salvaje contenían sólo números muy pequeños de células productoras de insulina y Glut2 en la misma fase. Estos datos demuestran que prosaposina puede fomentar y mejorar significativamente la diferenciación de células ES en células productoras de insulina en comparación con células ES de tipo salvaje.

5 Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran claramente una inducción significativa de la diferenciación de células productoras de insulina (Figura 6A) y que responden a glucosa (Figura 6B), si prosaposina se añade en fases posteriores de la diferenciación. Así, prosaposina tiene un efecto fuertemente inductor sobre la diferenciación de células beta productoras de insulina

10 **Tabla 3.** Protocolo para la inducción de la diferenciación de células productoras de insulina por parte de prosaposina (Psap)

Los medios B2 y B27 se describen en Rolletscheck et al., (2001) Mech. Dev. 105:93-104

Día	Fase de cultivo	Medio	Revestimiento y Análisis
0	gotas colgantes (600 células/gota)	Iscove + FCS al 20%	ARN (células ES)
1			
2	EBs en suspensión	Iscove + FCS al 20%	
3			
4			
5	extensión en placas de EBs	Iscove + FCS al 20%	revestimiento de gelatina
+1			revestimiento de ornitina/ laminina
+2			
+3			
+4			
+5			
+6			
+7			
+8			
+9	Disociación	B2+B27+NA+FCS al 10% ARN (placa de 1x6 cm)	
+10	cambio del medio	B2+B27+NA+Psap, 50 ng/ml	
+11			
+12	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+13			
+14	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+15			
+16	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+17			
+18	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+19			
+20	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+21			
+22	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+23			
+24	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+25			
+26	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+27			
+28	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+29			
+30	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	
+31			
+32	cambio del medio	+ Psap, 50 ng/ml	

**Ejemplo 11: Caracterización funcional de las células productoras de insulina diferenciadas**

Una propiedad importante de células beta es la secreción de insulina que responde a glucosa. Para someter a ensayo si las células productoras de insulina derivadas de Pax4 poseían esta propiedad de respuesta a la glucosa, se puede llevar a cabo un ensayo que responde a glucosa in vitro sobre las células diferenciadas. El día del ensayo se retira el medio de diferenciación de placas de 12 ó 6 pocillos y las células se lavan 3 veces con tampón Hepes bicarbonato de Krebs Ringer (KRBH; NaCl 125 mM, KCl 4,74 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, Hepes 25 mM, pH 7,4 y BSA al 0,1%) suplementado con glucosa 2,8 mM. Para la pre-incubación, las células se incubaron en KRBH + glucosa 2,8 mM durante 2 horas a 37°C. Después de ello, las células se incubaron en 500 ml de KRBH + glucosa 2,8 mM durante 1 hora y el sobrenadante se mantuvo luego para la medición de la secreción de insulina basal. Para la liberación de insulina estimulada, se añaden a las células 500 ml de KRBH que contiene glucosa 27,7 mM. Después de incubación durante 1 hora a 37°C, el KRBH se recupera para la medición de la secreción de insulina inducida por glucosa, y las células se extrajeron con ácido-etanol. (Véase también Imminger, J.-C. et al., 2003, *Endocrinology* 144: 1368-1379). Los niveles de insulina se pueden determinar mediante un análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) para insulina de ratón (Mercodia) y se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

**Ejemplo 12: Trasplante de células productoras de insulina derivadas de Pax4 ES en ratones diabéticos STZ**

El potencial terapéutico de células productoras de insulina inducidas por prosaposina para mejorar y curar la diabetes se puede investigar trasplantando las células en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina. Estreptozotocina es un antibiótico que es citotóxico para las células beta cuando se administra a una determinada dosis (véase Rodrigues et al., *Streptozotocin-induced diabetes*, en McNeill (comp.) *Experimental Models of Diabetes*, CRC Press LLC, 1999). Su efecto es rápido, haciendo a un animal gravemente diabético en el espacio de 48 horas.

Ratones BalbC machos no sometidos a ayuno se pueden tratar con STZ para desarrollar hiperglucemia después de tratamiento con STZ. Los ratones se consideran diabéticos si tienen un nivel de glucosa en sangre superior a 10 mmol/l durante más de 3 días consecutivos. Se trasplantan células debajo de la cápsula renal y en el bazo de los animales. La presencia de las células productoras de insulina se puede confirmar mediante análisis inmunohistológico del tejido trasplantado. Se espera que los resultados demuestren que las células trasplantadas pueden normalizar la glucosa en sangre en animales diabéticos.

Para los expertos en la técnica, y sin apartarse del alcance de la invención, pueden resultar evidentes diversas modificaciones y variaciones del método y sistema descritos de la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una proteína relacionada con saposina o ácido nucleico para uso en la protección y/o regeneración de células beta en pacientes que padecen diabetes de tipo I o de tipo II.
- 2.- La proteína relacionada con saposina o ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con otra composición farmacéutica, útil para tratar la degeneración de células beta.
- 10 3.- La proteína relacionada con saposina o ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha otra composición farmacéutica comprende hormonas, factores de crecimiento o agentes inmunomoduladores.
- 15 4.- Uso in vitro de una proteína relacionada con saposina o ácido nucleico para estimular y/o inducir la diferenciación de células productoras de insulina a partir de células progenitoras.
- 5.- El uso de la reivindicación 4, en donde la diferenciación de células progenitoras, p. ej. p. ej. células madre, en células productoras de insulina in vitro, comprende
- 20 (a) activar opcionalmente uno o más genes pancreáticos en células progenitoras,  
 (b) agregar opcionalmente dichas células para formar cuerpos embrioides,  
 (c) cultivar dichas células o en medios de diferenciación específicos que contienen un producto de proteína relacionado con saposina, y  
 (d) identificar y seleccionar opcionalmente células productoras de insulina.
- 25 6.- Uso de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido relacionado con saposina o un homólogo del mismo, o uso de un polipéptido codificado por la misma, o uso de un fragmento de dicha molécula de ácido nucleico o de dicho polipéptido, o uso de una secuencia de polinucleótidos capaz de hibridarse a secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos relacionados con saposina o un homólogo de la misma, o uso de alelos de los genes que codifican dichos polipéptidos, o uso de secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, en donde dichas secuencias de ácidos nucleicos portan deleciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos que resultan en un polinucleótido que codifica los mismos o un polipéptido funcionalmente equivalente, o uso de dicho polipéptido codificado, en donde el polipéptido contiene deleciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio silencioso y que resultan en proteínas funcionalmente equivalentes, para identificar sustancias capaces de interactuar con un polipéptido relacionado con saposina.
- 30 35 7.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los fragmentos comprenden péptidos cíclicos, péptidos retro-inversos o péptidos miméticos con una longitud de al menos cuatro y hasta 50 aminoácidos.
- 40 8.- Un método in vitro para diferenciar o regenerar células en células pancreáticas funcionales, comprendiendo el método:
- 45 (a) cultivar células capaces de ser diferenciadas o regeneradas en células pancreáticas en presencia de una cantidad eficaz de una proteína relacionada con saposina in vitro,  
 (b) permitir que las células desarrollen, diferencien y/o regeneren al menos una función pancreática; y  
 (c) opcionalmente, preparar una cantidad eficaz de las células pancreáticas diferenciadas o regeneradas para el trasplante a un paciente que lo necesite, particularmente un individuo humano.

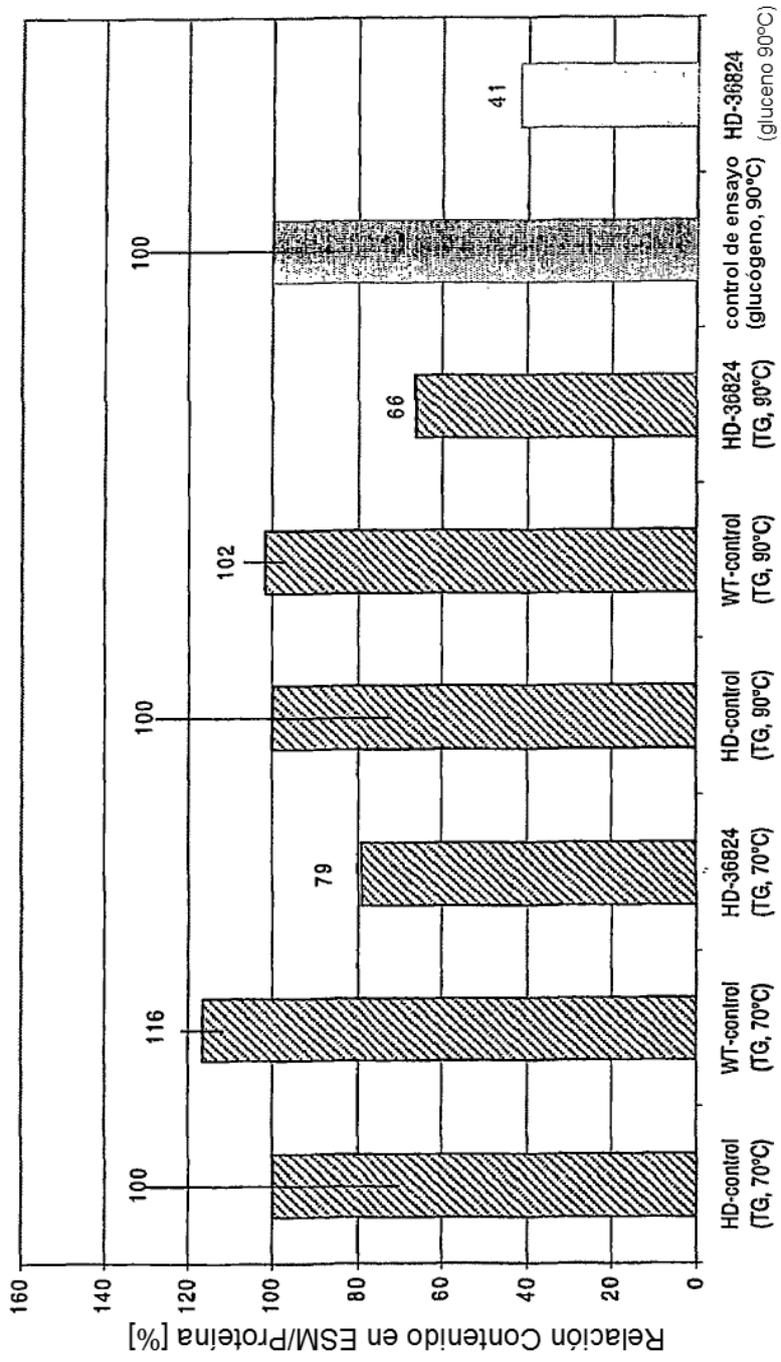


Fig. 1

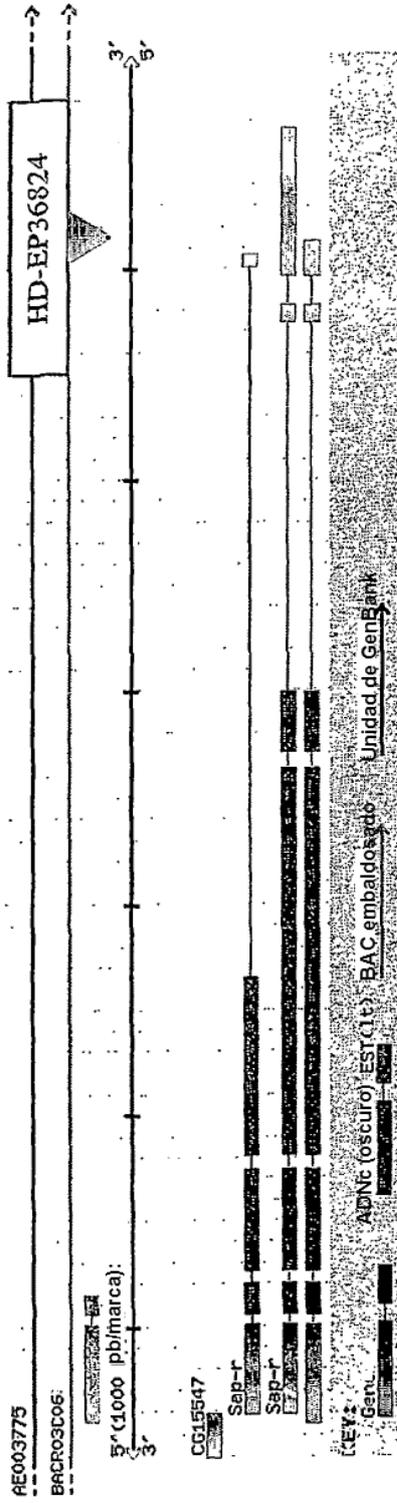


Fig. 2

```

1  gggcgggccc attgcagact gcggagtcag acggtgctat gtacgccctc ttctctctgg
61  ccagcctcct gggcgcggct ctagccggcc cggtccttgg actgaaagaa tgcaccaggg
121 gctcggcagt gtggtgccag aatgtgaaga cggcgtccga ctgcggggca gtgaagcact
181 gcctgcagac cgtttggaac aagccaacag tgaatccct tccctgcgac atatgcaaag
241 acgttggtcac cgcagctggt gatatgctga aggacaatgc cactgaggag gagatccttg
301 tttacttgga gaagacctgt gactggcttc cgaaccgaa catgtctgct tcatgcaagg
361 agatagtgga ctctacctc cctgtcatcc tggacatcat taaaggagaa atgagccgtc
421 ctggggagggt gtgctctgct ctcaacctct gcgagtctct ccagaagcac ctagcagagc
481 tgaatcacca gaagcagctg gagtccaata agatcccaga gctggacatg actgaggtgg
541 tggccccctt catggccaac atccctctcc tcctctaccc tcaggacggc ccccgagca
601 agccccagcc aaaggataat ggggacgttt gccaggactg cattcagatg gtgactgaca
661 tccagactgc tgtacggacc aactccacct ttgtccagge cttggtggaa catgtcaagg
721 aggagtgtga ccgctggggc cctggcatgg ccgacatatg caagaactat atcagccagt
781 attctgaaat tgctatccag atgatgatgc acatgcaacc caaggagatc tgtgcgctgg
841 ttgggttctg tgatgaggtg aaagagatgc ccatgcagac tctggtcccc gccaaagtgg
901 cctccaagaa tgtcatccct gccctggaac tgggtggagcc cattaagaag cacgaggtcc
961 cagcaaagtc tgatgtttac tgtgaggtgt gtgaattcct ggtgaaggag gtgaccaagc
1021 tgattgacaa caacaagact gagaaagaaa tactcgacgc ttttgacaaa atgtgctcga
1081 agctgccgaa gtccctgtcg gaagagtgcc aggaggtggt ggacacgtac ggcagctcca
1141 tcctgtccat cctgtctggag gaggtcagcc ctgagctggt gtgcagcatg tgcacctct
1201 gctctggcac gcggtgcct gcactgaccg ttcacgtgac tcagccaaag gacggtggct
1261 ctgcaagaag gtgcaagaag ctggtgggtt atttggatcg caacctggag aaaaacagca
1321 ccaagcagga gatcctggct gctcttgaga aaggctgcag ctctctgcca gacccttacc
1381 agaagcagtg tgatcagttt gtggcagagt acgagcccgt gctgatcgag atcctggtgg
1441 aggtgatgga tccttccttc gtgtgcttga aaattggagc ctgccccctg gcccataagc
1501 ccttgtttggg aactgagaag tgtatatggg gcccaagcta ctggtgccag aacacagaga
1561 cagcagccca gtgcaatgct gtcgagcatt gcaaaccgca tgtgtggaac taggaggagg
1621 aatattccat cttggcagaa accacagcat tggtttttt ctacttgtgt gtctggggga
1681 atgaacgcac agatctgttt gactttgtta taaaaatagg gtcccccac ctccccatt
1741 tctgtgtcct ttattgtagc attgctgtct gcaagggagc ccctagcccc tagcccctgg
1801 cagacatagc tgcttcagtg ccccttttct ctctgctaga tggatgttga tgcactggag
1861 gtcttttagc ctgcccttgc atggcgctg ctggaggagg agagagctct gctggcatga
1921 gccacagttt cttgactgga ggccatcaac cctcttgggt gaggccttgt tctgagccct
1981 gacatgtgct tgggcactgg tgggcctggg ctctgaggt ggctctctgc cctgatcagg
2041 gaccctcccc gctttcctgg gcctctcagt tgaacaaagc agcaaaagc aggcagttt
2101 atatgaaaga ttagaagcct ggaataatca ggctttttaa atgatgtaat tcccactgta
2161 atagcatagg gattttggaa gcagctgctg gtggcttggg acatcagtggt ggccaagggt
2221 tctctgtccc tggttcaact gtgatttggc tttcccgtgt ctttctggt gatgccttgt
2281 ttggggttct gtgggtttgg gtgggaagag ggccatctgc ctgaatgtaa cctgctagct
2341 ctccgaagcc ctgcgggcct ggcttgtgtg agcgtgtgga cagtgggtggc cgcgctgtgc
2401 ctgctcgtgt tgcctacatg tccctggctg ttgagggcct gcttcagcct gcaccctcc
2461 cttgtctcat agatgctcct tttgacctt tcaaataaat atggatggcg agctcctagg
2521 cctctggctt cctggtagag ggccgcatgc cgaaggtct gtctgggtgt ggattggatg
2581 ctgggggtgt gggggttggg agctgtctgt ggcccactg ggcaccacg cttctgtcca
2641 cttctgggtt ccaggagaca gcaagcaaag ccagcaggac atgaagtgc tattaatgg
2701 acttcgtgat ttttgtttt cactaaagtt tctgtgattt aacaataaaa ttctgttagc
2761 cccccg

```

Fig. 3A

```

1 MYALFLLASL LGAALAGPVL GLKECTRGS A VWCQNVRTAS DCGAVKHCLQ TVWNKPTVKS
61 LPCDICKDVV TAAGDMLKDN ATEEEILVYL EKTCDWLPKP NMSASCKEIV DSYLFPVILDI
121 IRGEMSRPGE VCSALNLCES LQKHLAELNH QKQLESNKIP ELDMTEVVAP FMANIPLLLY
181 PDGPRSKPQ PKDNGDVCQD CIQMVTDIQT AVRTNSTFVQ ALVEHVKEEC DRLGPGMADI
241 CKNYISQYSE IAIQMMMHMQ PKEICALVGF CDEVKEMPMQ TLVPAKVASK NVI PALELVE
301 PIKKHEVPAK SDVYCEVCEF LVKEVTKLID NNKTEKEILD AFDKMCSKLP KSLSEECQEV
361 VDTYGSSILS ILLEEVSPEL VCSMLHLC SG TRLPALTVHV TQPKDGGFCE VCKKLVGYLD
421 RNLEKNSTKQ EILAALEKGC SFLPDYPYQKQ CDQFVAEYEP VLIEILVEVM DPSFVCLKIG
481 ACPSAHKPLL GTEKCIWGPS YWCQNTETAA QCNAVEHCKR HVWN

```

**Fig. 3E**

```

1 atggctgagt cacacctgct gcagtggtgct ctgctgctgc tgcccacgct ctgtggccca
61 ggcactgctg cctggaccac ctcatccttg gcctgtgccc agggccctga gttctgggtgc
121 caaagcctgg agcaagcatt gcagtcgaga gccctagggc atgacctaca ggaagtctgg
181 ggacatgtgg gagccgatga cctatgccaa gagtgtgagg acatcgcca catcctaac
241 aagatggcca aggaggccat tttccaggac acgatgagga agttcctgga gcaggagtgc
301 aacgtcctcc ccttgaagct gtcctgccc cagtgaacc aagtgtctga cgactactc
361 cccctgggca tcgactactt ccagaaccag attgactcaa acggcatctg tatgacctg
421 ggcctgtgca aatcccggca gccagagcca gagcaggagc cagggatgct agaccctctg
481 cccaaacctc tgcgggaccc tctgccagac cctctgctgg acaagctcgt cctccctgtg
541 ctgcccgggg ccctccaggc gaggcctggg cctcaacac aggatctctc cgagcagcaa
601 ttccccattc ctctccccta ttgctggctc tgcagggtc tgatcaagcg gatccaagcc
661 atgattccca aggggtgcgct acgtgtggca gtggcccagg tgtgccgctg ggtacctctg
721 gtggcggggc gcactctgcca gtgcctggct gagcgctact ccgtcatcct gctcgacacg
781 ctgctggggc gcactctgccc ccagctggct tgcgcctctg tctccgggtg ctccatggat
841 gacagcgtg gcccaaggtc gccgacagga gaatggctgc cgcgagactc tgagtgccac
901 ctctgcatgt ccgtgaccac ccaggccggg aacagcagcg agcaggccat accacaggca
961 atgctccagg cctgtgttgg ctctggctg gacagggaaa agtgcaagca atttgtggag
1021 cagcacacgc cccagctgct gaccctgggtg cccaggggct gggatgccc caccacctgc
1081 caggccctcg ggggtgtgtg gaccatgtcc agccctctcc agtgtatcca cagccccgac
1141 ctttga

```

**Fig. 3C**

```

1 MAESHLLQWL LLLLPTLCGP GTAAWTSSL ACAQGPEFWC QSLEQALQCR ALGHCLQEVW
61 GHVGADDLCQ ECEDIVHILN KMAKEAIFQD TMRKFLEQEC NVLPLKLLMP QCNQVLLDDYF
121 PLVIDYFQNG IDSNGICMHL GLCKSRQPEP EQEPGMSDPL PKPLRDLPLD PLLDKLVLPV
181 LPGALQARPG PHTQDLSEQQ FPIPLPYCWL CRALIKRIQA MIPKGALRVA VAQVCRVPL
241 VAGGICQCLA ERYSVILLDT LLGRMLPQLV CRLVLRCSMD DSAGPRSPTG EWLPRDSECH
301 LCMSVTFQAG NSSEQAIPQA MLQACVGSWL DREKCKQFVE QHTPQLLTLV PRGWAHTTC
361 QALGVCGTMS SPLQCIHSPD L

```

**Fig. 3D**

```

1 ccatacatgc ttctggcagt gttgcacagc gttgcacagc ttggcggcct cctggctcct
61 gcaccagaag cttggggccca gggcacactg gtcggtgccc agcagtgggg tcttggggcc
121 gtggcaggcc cccaccttct tgcacacagc cacggggtcc atcatgtcct tgagactctc
181 aatgagcacg ggctcgtact ggggtgacgaa gtgcttgcac tggatcatat agggcagcgg
241 caggatgctg cagccaccct tgaaggccac caggatgtct cgcttgggtc tcttgctctc
301 caagttgtgg gaggacaccg tgagcagcct cttgcaccca ttgcagaagc tgccctgggt
361 ctccgcgtcc cactctgggg acggcacgat ggcataggca tcatggactg cccgggcccg
421 cctccggttg ccacacagac ggatgaactt gcacacctc tctgggggtga ttttggccac
481 aagctgcacc aaggagggggc tgtaggtgtc caccaagatg atgactcct tcgtgataga
541 ggcaggcatt accgagcaca cgcgctccag ggcatagggt atcatgagct cagagctggt
601 ggacatgagc cagtgggtcca gcttctgcac cacgttcag cacacctcac aggtcacacc
661 ggccttcac tgcactctgc tctgtttcct tggcaacccc agtccaggg aggggacccc
721 gtccatggcc actacttgag tcaaacgggc aggtgccctc agtccctcac agaatcccc
781 cttcctgcag agtctctgc gggggagaag cctcagtgtc tggtcagcag ggacaaaaa
841 ctggaagagg tagttcttgc agaggacggc caggccaggc cccaaggact cacactgctc
901 ctggatgttc aagtgggcca aggtcaagtt ggaccggaca gcctcctgga gtcgggagac
961 ctgccgtaca cagtcttggc acagagctcc ttcaggcgcc tggcgggggt ggaaggtaag
1021 gggcccattg gccatgaacg gagccacagc ctcaaagggt tctcctttgg agagtggcct
1081 cagggtggcc aggtgcctct gcagcggctc acagaggctg agcgtgtgac acacctgtgc
1141 cggggcactg tccggggccc cacggagcat gctcaggatg gccgaactgt gggcatccac
1201 catccacttg catccggctg aagactcctg gctggggagc cactcacagg tcttcatcac
1261 caaagccagg atgtcagact ccgtggcgtc agggttcagc ccattgccag cggcggctgc
1321 tatgtcctgg catacgtcgc agggcagaga cttcgcggtg ggtttgttcc atacggcccc
1381 ttggcagtac cccacagccc cgcacctggc agctgtctgc agatcctgac accacaccgt
1441 ggagcccttt gcacactcct gggggcctga ggtggggctg gccctggtgg ccccaggag
1501 gctgggcagg aggagcaggg c

```

**Fig. 3E**

```

1 ALLLLPSLLG ATRASPTSGP QECAKGSTVW CQDLQTAARC GAVGYCQGAV WNKPTAKSLP
61 CDVCQDIAAA AGNGLNPDAT ESDILALVMK TCEWLPSQES SAGCKWMVDA HSSAILSMRLR
121 GAPDSAPAQV CTALSLCEPL QRHLATLRPL SKEDTFEAVA PFMANGPLTF HPRQAEPEAL
181 CQDCVRQVSR LQEAVRSNLT LADLNIQEQC ESLGPGGLAVL CKNYLFQFFV PADQALRLLP
241 PQELCRKGGF CEELGAPARL TQVVAMDGVP SLELGLPRKQ SEMQMKAGVT CEVCMNVVQK
301 LDHWMNSNSS ELMITHALER VCSVMPASIT KECIILVDTY SPSTVQLVAK ITPEKVCKFI
361 RLCGNRRRAR AVHDAYAIVP SPEWDAENQG SFCNGCKRLL TVSSHNLKESK STKRDILVAF
421 KGGCSILPLP YMIQCKHFVT QYEPVLIESL KDMMDPVAVC KKVGAHGPR TPLLGTDQCA
481 LGPSFWCRSQ EAAKLCNAVQ HCQKHVW

```

**Fig. 3F**

```

PSAP Hs      -----MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCL
FLJ40379 Hs -----ALLLLPSLLGATRASPTSGPQECARGSTVWCQDLQTAARCQAVGYCQ
SFTPB Hs     ----MAESHLLQWLLLLLLPTLCGPATAAWTTSSLACAQGPEFWCQSLEQALQCRAIGHCL
Sap-r Dm     MERAGLLAVLALCCA-----FGVFAAATPLLGSCKTWGPSYWCGNFSNSKECRATRHCI

PSAP Hs      QTVWNK---PTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASC
FLJ40379 Hs  GAVWNK---PTAKSLPCDVCQDIAAAAAGNGLNPDATESDILALVMKTCEWLPSQESSAGC
SFTPB Hs     QEVWGH--VGADDL-CQECEDIVHILNKMAKEAIFQDTMRKFLEQECNVLPKLLMPQC
Sap-r Dm     QTVWETQKVPVDTDSICTICKDMVTQARDQLKSNQTEELKEVFEQSGCKLPIKPIQKEC

PSAP Hs      KEIVDSYLPVILDIKGEEMS-RPGEVCSALNLCESL-----
FLJ40379 Hs  KWMVDAHSSAILSMRLRGAPDSAPAQVCTALSLCEPL-----
SFTPB Hs     NQVLDDYFPLVIDYFQNQID--SNGICMHLGLCKSR-----
Sap-r Dm     IKVADDFLPELVEALASQMN--PDQVCSVAGLCNSARIDELYKNGIQAGLDGTVQNEDDS

PSAP Hs      -----QKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFMANIPLLLYPQDGRSKPO
FLJ40379 Hs  -----QRHLAT-----LRPLSKEDTFEAVAPFMANGPLTFHPRQAP-----
SFTPB Hs     -----QPEPEQEP-----GMSDPLPKPLRDPPLDPLLDKLVLPVLPALQ-----
Sap-r Dm     SEETELAMQPNQLSCGNLNLRLMHSKFAATDRDDMVETMLHMCGLSSFSDACANIVL

PSAP Hs      PKD-----NGD
FLJ40379 Hs  -----EGG
SFTPB Hs     -----
Sap-r Dm     TYFNDIYDHVSKHLT'DAVCHVSGVCASRYHQHEEEKQP--QEALVALDAG-----DDI

PSAP Hs      VCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMM
FLJ40379 Hs  LCQDCVRQVSRLOEAVRSNLTAD---LNIQEQCESLGPGLAVLCKNYLFQFFVPADQAL
SFTPB Hs     -----ARPGPHTQDLSEQQFPIPLP-----
Sap-r Dm     PCELCEQLVKHLRDVLRVAN'TETEFK--QVMEGFCKQSKGFKDECLSIVDQYYHVIVYETL

PSAP Hs      MHMQ---PKEICALVGFCD-----EVKEMPMQTL
FLJ40379 Hs  RLLP---PQELCRKGGFCEE-----LGAPARLTQV
SFTPB Hs     -----
Sap-r Dm     VSKLD--ANGACCMIGICQKNSAS--SMKDVPIPMLLPVIEPAQVKITIEKLEKHEKKQL

PSAP Hs      VPAK-VASKNVIPALELVEPIK---KHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKE
FLJ40379 Hs  VAMD-----GVPSELELGLPRKQS---EMQMKAGVTCEVCMNVVQKLDHWLMSNSSELM
SFTPB Hs     -----YCWLCRALIKRIQAMIPKG----A
Sap-r Dm     GASEPKFSQOEILDMQLPIDHLMGAANPGALVEGGELCTLCEYMLHFIQETLATPSTDE

PSAP Hs      ILDAFDKMCCKLPSLSEECQEVVDTYGSSILSILLEEVSPPELVCMSLHLCSG-----
FLJ40379 Hs  ITHALERVCSVMPASITKECIIIVDVTYSPSLVQLVA-KITPERVCKFIRLCGNRRR----
SFTPB Hs     LAVAVAQVCRVPLVAGGICQCLAERYSVILLDTLIGRMLPQLVCRVLVLRCSMDDS----
Sap-r Dm     IKHTVENICAKLPSGVAGQCRNFVEMYGDAVIALLVQGLNPRDVCPLMQMCPKNLP----

PSAP Hs      -----TRLPALTVHVTQPKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKN
FLJ40379 Hs  -----ARAVHDAYAIVPSPEWDAENQGSFCNGCKRLLTVSSHNLSEK
SFTPB Hs     -----AGPRSP-----TGEWLPRDSECHLCMSVTTQAG-----N
Sap-r Dm     -----KKEDVEVFNPQPAS-----DEQDPPTCPLCLFAVEQAQMKIRDN

```

Fig. 3G

```

PSAP Hs          STKQEI LAALEKGC SF L PDPYQKQCDQFVAEYEPVLI EILVEVMDPSFVCLKIGACPSAH
FLJ40379 Hs     STKR DILVAFKGGCSILPLPYMIQCKHFVTQYEPVLI ESKDMMDPVAVCKKVGACHGPR
SFTPB Hs        SSEQAIPQAMLQACVGSWLD-REKCKQFVEQHTPQLLTLVPRGWD AHTTCQALGVCGTMS
Sap-r Dm        KSKDNIKKVLNGLCSHLPNEIKEECVDFVNTYSNELIDMLITDFKPOEICVQLKLCPKTT

PSAP Hs          KPLLGT-----EKC IW
FLJ40379 Hs     TPLLGT-----DQCAL
SFTPB Hs        SPLQ-----CIH
Sap-r Dm        YALWDLRISLEDDVDGEDK-----SSSEEISFN DIESLEELPPQLAFDPGF TAAPNCLI

PSAP Hs          GPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKRHVWN-----
FLJ40379 Hs     GPSFWCRSQEA AKLCNAVQHCKHVW-----
SFTPB Hs        SPDL-----
Sap-r Dm        CEELVKTLEKRMGKHPT RDSIKHILEESCDRMRKPMNTKCHKVIDKYGDKIADLLKEMD

PSAP Hs          -----
FLJ40379 Hs     -----
SFTPB Hs        -----
Sap-r Dm        PKLICTELGMCILAD--LDDLEVDEALKYDVIALPRQDNKLS-----SSIKEPPTCVLCE

PSAP Hs          -----
FLJ40379 Hs     -----
SFTPB Hs        -----
Sap-r Dm        FIMTKLDADLKNKTEQDDIKRAIEAVCNRLPATVRKQCDTFVDGYASAVLKLLSDVPPKQ

PSAP Hs          -----
FLJ40379 Hs     -----
SFTPB Hs        -----
Sap-r Dm        VCQKLQLCFSVAVTD-----EVLECGVCHGVTQALLPFLREKKDNVSEVTALQMTSVGCE

PSAP Hs          -----
FLJ40379 Hs     -----
SFTPB Hs        -----
Sap-r Dm        NLPKYYKICSEMI SIYGSSIKNLAKRPYIDQSHICAEIGKCFESEKSSLAFARISA
    
```

Fig. 3G (Continuación)

Fig. 4

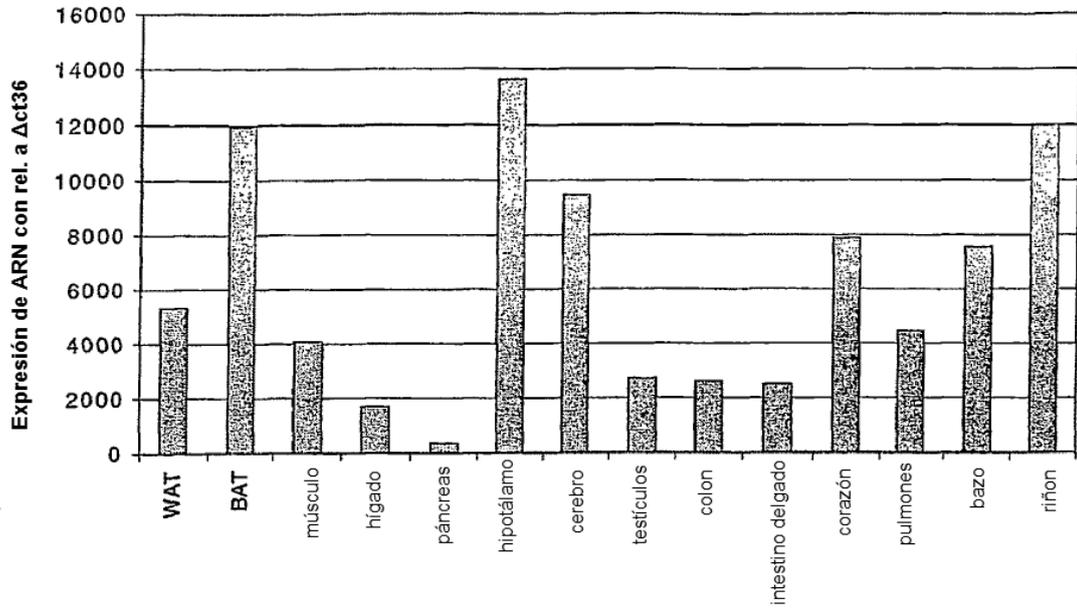


Fig. 4A

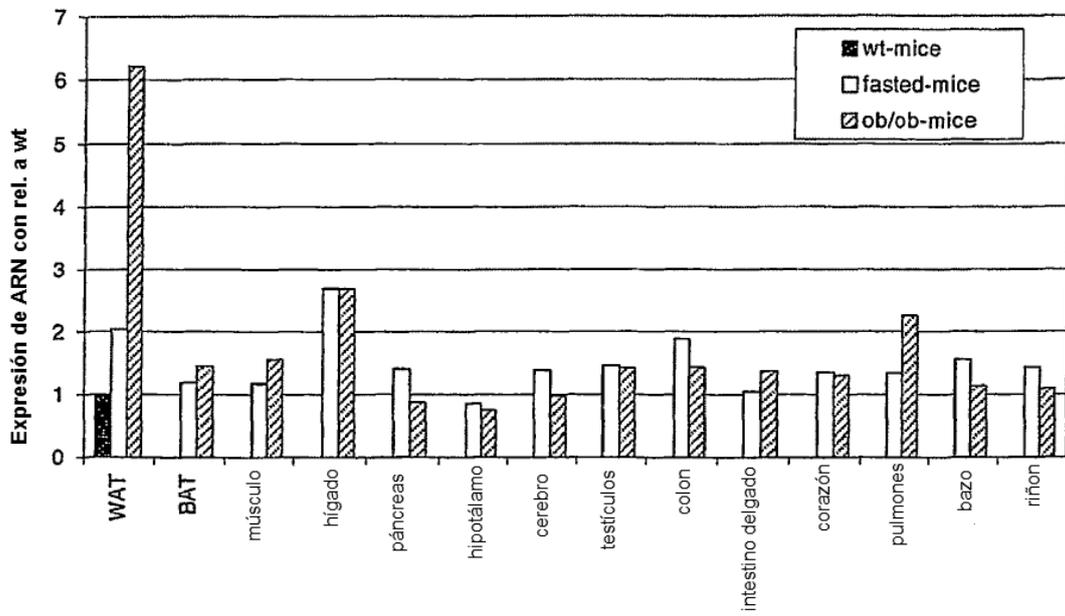


Fig. 4E

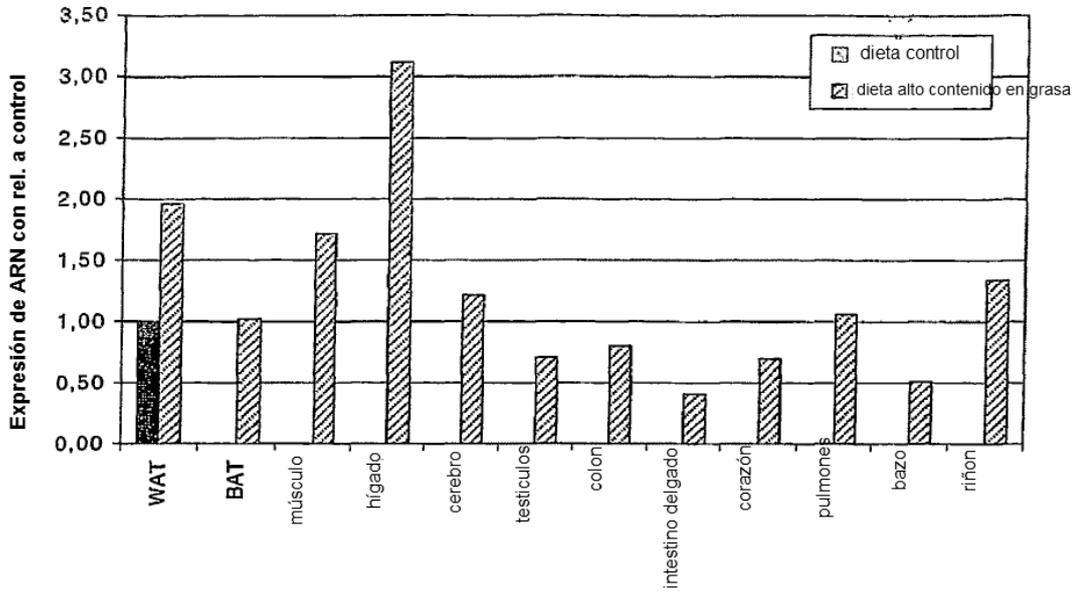


Fig. 4C

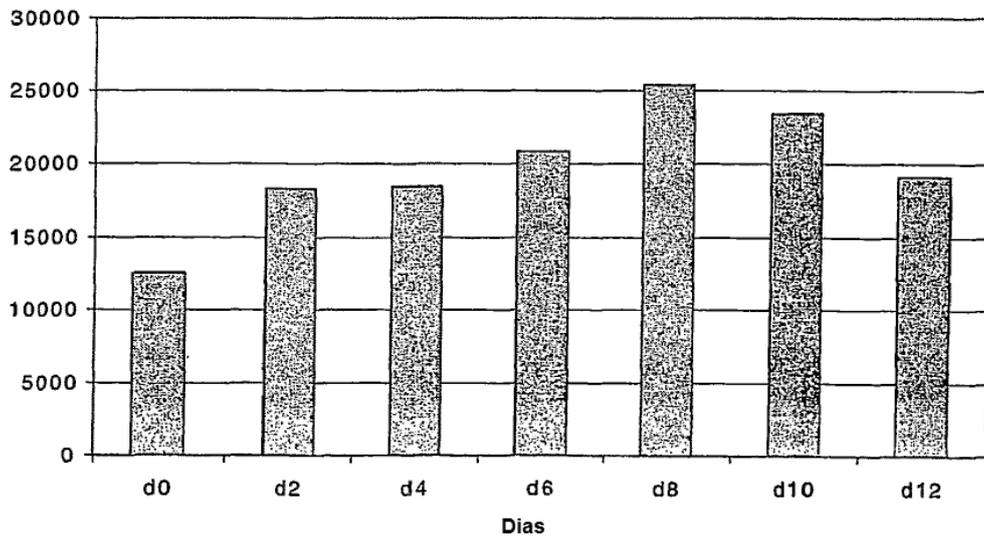


Fig. 4D

Fig. 5

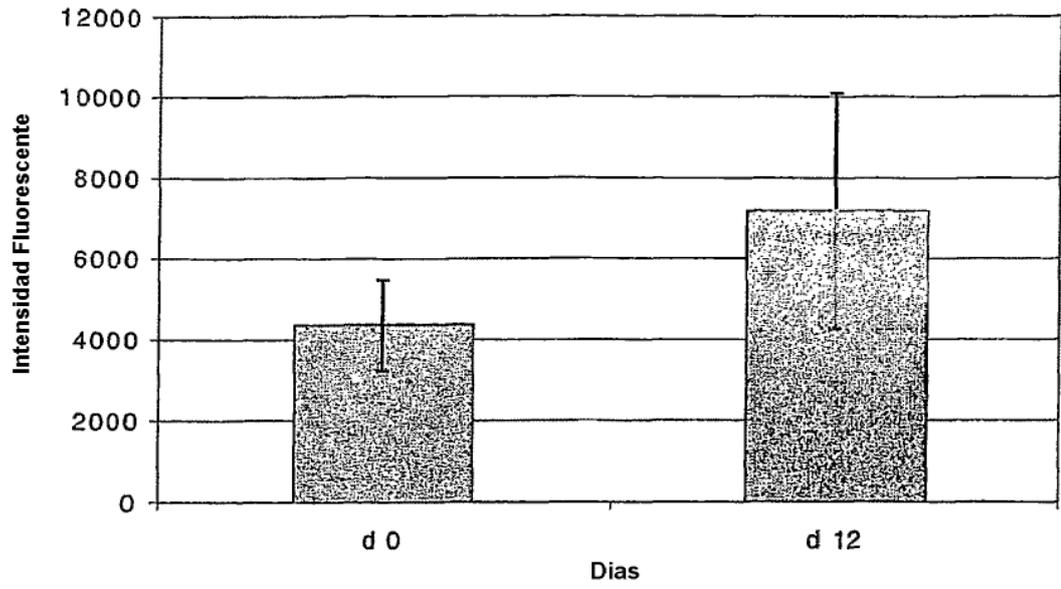


Fig. 5A

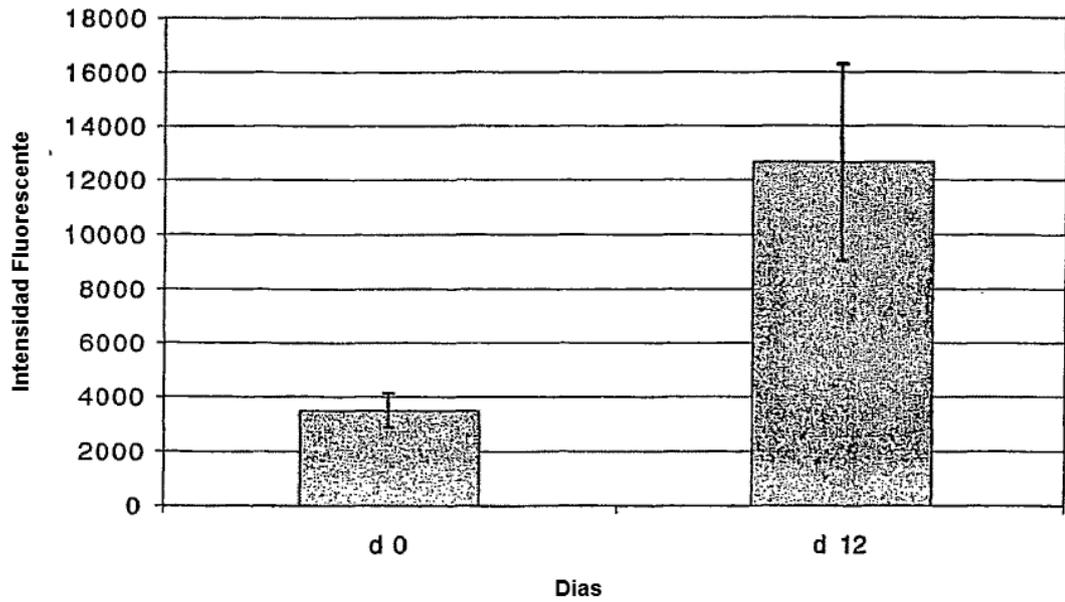


Figure 5B

Fig. 6

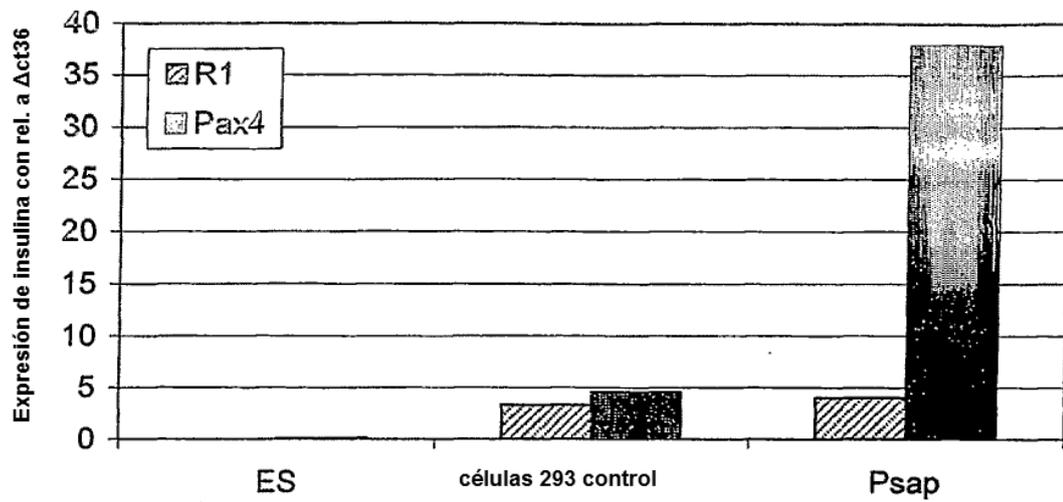


Fig. 6A

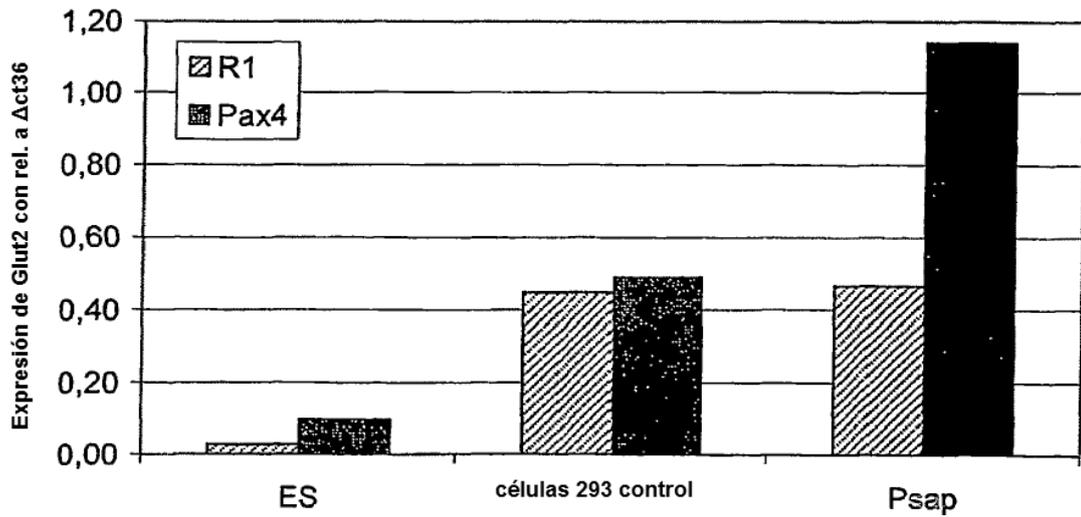


Fig. 6B