

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 358**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011** **E 11833512 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016** **EP 2627349**

54 Título: **Genes relacionados con la obesidad y sus proteínas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.10.2010 US 393634 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.03.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 Low Memorial Library 535 West 116th Street
New York, New York 10027, US**

72 Inventor/es:

**WALEWSKI, JOSE LEONARDO y
BERK, PAUL DAVID**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 358 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

Genes relacionados con la obesidad y sus proteínas y usos de los mismos

La presente divulgación de patente contiene material que está sujeto a protección de los derechos de autor. El propietario de los derechos de autor no pone objeción alguna a la reproducción en facsímil por cualquier persona del documento de patente o la divulgación de patente como aparece en el archivo o los registros de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, pero se reserva en lo demás todos y cada uno de los derechos de autor.

Apoyo del gobierno

El trabajo descrito en el presente documento fue apoyado completamente, o en parte, por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales n.º de subvenciones 5RO1DK052401, 3R01DK072526-04S1 y 5RO1DK072526. Por lo tanto, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

La obesidad es una enfermedad crónica manifestada por un exceso de masa grasa en proporción al peso corporal. La obesidad es, de hecho, la deposición aumentada de ácidos grasos de cadena larga (LCFA), principalmente en forma de triglicéridos (TG), en tejidos adiposos y otros. Los individuos obesos tienen un exceso de grasa corporal en relación con la masa corporal magra que puede contribuir a otras enfermedades.

La obesidad es uno de los problemas de salud pública más graves en el siglo XXI. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo. Más de mil millones de adultos tienen sobrepeso y al menos 300 millones de ellos se clasifican como clínicamente obesos. En la actualidad, se considera que uno de cada tres americanos tiene sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) $> 25 \text{ kg/m}^2$). El 60 % de los adultos en los Estados Unidos son obesos o tienen sobrepeso, y la obesidad está ampliamente reconocida como el mayor mercado farmacéutico del mundo, con pocos fármacos aprobados que no funcionan bien, lo que conduce a, como máximo, una pérdida de peso del 5– 10 %, que no es permanente. Se cree que la predisposición genética aumenta significativamente el riesgo de hacerse obeso pero no se han identificado detalles específicos de las rutas implicadas.

Sumario de la invención

La invención proporciona un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N° 3 (Spexina), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. En una realización, el sujeto es un ser humano o animal no humano. En otra realización, el animal no humano es un ratón, rata, perro o gato. En una realización adicional, el trastorno asociado con la obesidad comprende un trastorno metabólico, hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, un trastorno relacionado con lípidos, diabetes mellitus de tipo II, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño, cáncer, síndrome de ovario poliquístico (SOP), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico comprende hiperglucemia, resistencia a insulina, hiperinsulinemia, síndrome metabólico o una combinación de dichos trastornos. En otras realizaciones, el trastorno relacionado con lípidos comprende aterosclerosis, lipodistrofia por VIH, enfermedad cardíaca coronaria, dislipidemia o una combinación de un trastorno enumerado en el presente documento. En realizaciones adicionales, el cáncer comprende cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de colon o una combinación de dichos cánceres. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 25 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 30 kg/m^2 . En realizaciones adicionales, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 35 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 40 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 45 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 50 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 55 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 60 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 65 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 70 kg/m^2 . En otras realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 75 kg/m^2 . En una realización, el sujeto presenta una reducción de masa tisular adiposa después del tratamiento con Spexina. En otra realización, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 1 ng/ml en el suero. En otra realización, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 3 ng/ml en el suero. En una realización adicional, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 10 ng/ml en el suero. En algunas realizaciones, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 30 ng/ml en el suero. En otras realizaciones, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 100 ng/ml en el suero. En realizaciones adicionales, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos aproximadamente 250 ng/ml en el suero. En algunas realizaciones, la cantidad de Spexina administrada da como resultado al menos

aproximadamente 500 ng/ml en el suero. En una realización, la Spexina se administra al menos una vez al día o al menos dos veces al día. En otra realización, la Spexina se administra durante al menos 1 semana, durante al menos 2 semanas, durante al menos 3 semanas, durante al menos 4 semanas, durante al menos 5 semanas, durante al menos 6 semanas, durante al menos 8 semanas, durante al menos 10 semanas, durante al menos 12 semanas, durante al menos 24 semanas o durante al menos 48 semanas. En una realización adicional, la Spexina se administra durante al menos 1 año, durante al menos 1,5 años, durante al menos 2 años, durante al menos 2,5 años, durante al menos 5 años, durante al menos 7,5 años, durante al menos 10 años, o durante al menos 15 años.

Breve descripción de las figuras

Para ajustarse a los requisitos para solicitudes de patente de PCT, muchas de las figuras presentadas en el presente documento son representaciones en blanco y negro de imágenes originalmente creadas en color. En las siguientes descripciones y los ejemplos, las representaciones coloreadas se describen con respecto a su apariencia en blanco y negro. Las versiones en color originales pueden verse en Walewski *et al.*, *Obes Surg.* Ene 2010; 20 (1): 93-107, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

La Figura 1 es una representación de log-log de diferencias de expresión génica entre grasa normal y de sujeto obeso. Los puntos de datos representan las relaciones de expresión medias (grasa normal [n=8] frente a sujeto obeso [n=12]). Los puntos coloreados representan genes que tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los valores de expresión entre conjuntos de muestras (rojo=genes que están sobreexpresados en grasa normal, verde=genes que están sobreexpresados en grasa de sujetos obesos; los puntos de datos grises representan datos no significativos). Ch12;orf39 es Spexina.

La Figura 2 es un gráfico de expresión génica de Spexina (Ch12, orf39) que muestra que está regulado negativamente 14,8 veces en grasa de sujetos obesos frente a grasa normal. Los datos representan la media más ETM.

La Figura 3 es un alineamiento múltiple de homólogos de Spexina de diversas especies. Se consultó Genbank con respecto a Spexina humana (NP_085049; SEC ID N° 26) y homólogos relacionados [chimpancé (XP001144591; SEC ID N° 27), canino (XP_853311; SEC ID N° 28), bovino (NP_001068875; SEC ID N° 29), ratón (XP_620381; SEC ID N° 30) y rata (XP_001076968; SEC ID N° 31)]. El histograma en la parte superior de cada panel indica el grado de identidad de la colección con la secuencia mayoritaria en cada posición de resto (barras más altas = mayor identidad). El sombreado amarillo dentro del alineamiento indica los restos de aminoácidos que coinciden con la secuencia mayoritaria en cada posición. Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando la función Clustal W de MegAlign (DNASTar). Los parámetros de alineamiento de secuencias fueron: penalización de hueco (10), penalización de longitud de hueco (0,20), retardo de secuencias divergentes (30 %), y peso de transición de ADN (0,50).

La Figura 4 muestra una curva patrón de inmunoensayo enzimático (EIA) de Spexina. Se representa una serie de diluciones de patrones de Spexina conocidos frente a sus valores de DO correspondientes para generar una curva patrón para cuantificación precisa.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra que las concentraciones de Spexina en suero son menores en pacientes obesos. Los niveles de Spexina en suero se ensayaron por EIA de competición de antígeno en muestras de suero humanas de individuos obesos y de peso normal; (obeso; n=7; 1,11 +/- 1,67) frente a (normal; n=7; 11,60 +/- 3,20), ($p < 0,000461$, por ensayo de T, con 2 colas con igual varianza). Los datos representan las medias +/- DT en ng/ml.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra que los niveles de leptina en suero son significativamente mayores en paciones obesos. Se midieron los niveles de leptina en suero por ELISA de captura de antígenos; obeso n=7 (0,69 +/- 0,22) frente a normales n=6 (0,15 +/- 0,15), ($p = 0,0099$, por ensayo de T, 2 colas con igual varianza). Los datos representan las DO medias +/- DT, respectivamente.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la correlación entre los niveles de leptina y Spexina en suero de pacientes obesos (n=7) y de peso normal (n=6). Se representaron las DO de leptina (ordenadas) frente a Spexina [ng/ml] (abscisas) para cada muestra de paciente. La correlación negativa ($-r = 0,9444$) observada entre los dos péptidos en circulación es bastante fuerte, con una R^2 de 0,8919.

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra que las relaciones de Spexina frente a leptina en suero distinguen a los pacientes obesos frente al peso normal. Las relaciones de Spexina frente a leptina se representan para cada paciente. Las relaciones de obesos (n= 7, rojo) varían de 0 a 6,1, y en pacientes normales (n= 6, azul) las relaciones varían de 19 a 240, siendo la mayoría de más de 150.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra que la Spexina está regulada negativamente 14,8 veces en grasa de sujetos obesos frente a grasa normal. La Spexina se denomina "péptido A".

La Figura 10 es un gráfico de barras de los niveles de leptina en suero. Los niveles de leptina en suero se midieron por inmunoensayo en los mismos pacientes normales (8,53 +/- 7,55) y obesos (37,42 +/- 11,56) ($p < 0,01$, por ensayo de t, de 2 colas). Los datos representan las medias +/- DT.

La Figura 11 representa un esquema de un modelo de acumulación de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en adipocitos obesos. En los adipocitos de sujetos de peso normal (Figura 11A), la captación de LCFA (incluyendo transporte facilitado) y degradación (incluyendo oxidación β en adipocitos) están en equilibrio, sin ninguna ganancia ni pérdida neta de LCFA. Como resultado, a lo largo del tiempo, la cantidad relativa de LCFA en cada célula es constante. En adipocitos de sujetos obesos (Figura 11B), la combinación de LCFA aumentados por transportadores específicos (como se demuestra en estudios de captación analizados en el presente documento), y oxidación β y metabolismo de ácidos grasos reducidos (indicado por los estudios de expresión) conduce a una acumulación de LCFA en estos adipocitos a lo largo del tiempo, dando como resultado adipocitos agrandados y obesidad.

La Figura 12 es un esquema que muestra los complejos I - V de la ruta de fosforilación oxidativa (Ox-Fos). Estos cinco complejos de la ruta Ox-Fos son responsables de la generación de ATP a partir de energía liberada por el ciclo del ácido cítrico. Las subunidades mayores de cada complejo están dibujadas en el diagrama, y las cajas que indican enzimas clave están marcadas con el número de clasificación de EC apropiado. Las cajas/números de EC destacados en rojo indican enzimas que se expresan diferencialmente en obesidad. Un resultado sorprendente es que los ocho genes que están regulados negativamente de forma coordinada se distribuyen entre los cinco complejos (Walewski, *et al*, 2010). Un punto clave para considerar es que aunque el 15 – 50 % de las diferencias en la expresión génica (suponiendo que la proteína desciende en una cantidad correspondiente) pueden no considerarse tan importantes con respecto al rendimiento final a no ser que estas sean enzimas limitantes de la velocidad. Aunque la proteína total puede ser menor, hay habitualmente un exceso de capacidad funcional, suponiendo que la distribución enzimática o las funciones correguladoras no son importantes para estas proteínas en solución. Sin embargo, en este caso, las proteínas en cuestión son miembros de complejos unidos a membrana grandes, en los que la estequiometría correcta de las proteínas individuales en la arquitectura general del complejo es bastante importante. Podría esperarse razonablemente que una reducción del 15 – 50 % en la cantidad de una proteína individual afectara a las propiedades estructurales, y en consecuencia funcionales, del complejo. Aún más sorprendente es la reducción coordinada en la expresión de genes clave entre cada uno de los 5 complejos de la cadena de transporte de electrones.

La Figura 13 es un gráfico que muestra las curvas de captación de ácidos grasos. Se estudió la captación de [3 H]-ácido oleico por adipocitos omentales en 3 individuos obesos (curvas discontinuas) y 3 wt normales (curvas continuas). Las curvas representan los ajustes por ordenador a la suma de una función saturable mas una no saturable de la concentración de ácido oleico no unido. No hubo solapamiento entre los dos grupos.

La Figura 14 muestra comparaciones de expresión de ARNm en grasa omental de sujetos obesos frente a normal (cohorte 1). Se consultaron los niveles de expresión de aproximadamente 9.200 genes por micromatrices. La Figura 14A muestra una representación log-log de todos los genes ensayados en este estudio. Las medias de cada punto de datos se presentan en una representación de dispersión ($n = 3$ en cada grupo, obeso frente a normal). Se presentan los datos de expresión relativos para 566 genes estadísticamente significativos ($p < 0,05$, cambio de 1,2 veces o mayor en la expresión) en color (rojo = positiva, azul = negativa). "Rojo" se representa como círculos grises oscuros en la parte superior de los círculos grises claros (arriba y a la izquierda de la línea de identidad [45°]). "Azul" se representa como círculos grises oscuros en la parte inferior de los círculos grises claros (debajo y a la derecha de la línea de identidad [45°]). La Figura 14B muestra una vista detallada de una sección representativa de una representación de distorsión (cuadrado gris oscuro centrado en la Figura 14A). Los puntos de datos rojos (positivo en obesos) y azules (negativo en obesos) son estadísticamente significativos, mientras que los puntos de datos no significativos se representan como círculos grises. "Rojo" se representa como círculos grises oscuros en la parte superior de los círculos grises claros. "Azul" se representa como círculos grises oscuros en la parte inferior de los círculos grises claros. La Figura 14C muestra representaciones de cajas de cuartiles de las medias de todos los genes en normales ($N = 3$) frente a obesos ($N = 3$). Existen similitudes sorprendentes entre los dos grupos.

La Figura 15 muestra gráficos de barras de la expresión de ARNm de dodecenilo-CoA isomerasa (DCI) en muestras de grasa omental de sujetos normales frente a obesos. La expresión de ARNm DCI en grasa de sujetos obesos está reducida frente a grasa de control. En la cohorte 1, el ARNm de DCI en depósitos de grasa omental de individuos normales y obesos demuestra una expresión 1,59 veces menor en pacientes obesos (Figura 15A), mientras que en la cohorte 2 (Figura 15B), se observaron resultados muy similares usando matrices de genomas completos, con una expresión 1,64 veces menor en grasa omental de sujetos obesos.

La Figura 16 muestra gráficos de barras que representan dos genes de adenilato ciclasa que están implicados en la estimulación hormonal de la lipólisis que están infraexpresados en grasa omental de sujetos obesos. La adenilato ciclasa 6 es una enzima asociada a membrana y cataliza la formación del mensajero secundario adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Este gen estaba expresado 1,78 veces menos en grasa omental de sujetos obesos en la cohorte 1 (Figura 16A), y estaba expresado 1,64 menos en las muestras de la cohorte 2 (Figura 16B). El receptor de péptido activador de adenilato ciclasa 1 es una proteína asociada a membrana y comparte homología significativa con miembros de la familia del receptor de glucagón/secretina. Este receptor media en diversas acciones biológicas

de polipéptido activador de adenilato ciclasa 1 y está acoplado positivamente con adenilato ciclasa. Este gen se expresó 1,74 veces menos en grasa omental de sujetos obesos en la cohorte 1 (Figura 16C), y se expresaba 1,18 veces menos en las muestras de la cohorte 2 (Figura 16D).

La Figura 17 es un gráfico de barras que muestra la validación biológica y técnica de resultados de expresión génica clave en la cohorte 1 por micromatrices alternativas y qRT-PCR en la cohorte 2. Se seleccionaron genes clave que estaban infraexpresados en grasa omental de sujetos obesos en la cohorte 1 para ensayos repetidos en muestras de la cohorte 2. Se consiguió validación biológica y técnica en la cohorte 2 tanto por plataforma de micromatriz alternativa como por análisis de qRT-PCR. La relación de expresión génica en grasa de sujetos obesos frente a normales en las muestras de la cohorte 2 se presenta para cada uno de 7 genes identificados como regulados negativamente en obesidad en el estudio de la cohorte 1 original de los inventores. Los nuevos resultados de los inventores muestran que los 7 genes están de nuevo infraexpresados en grasa omental de sujetos obesos en las muestras de la cohorte 2 (n=7) frente a controles de peso normal (n=4). Es sorprendente que para 5 de 7 genes ensayados por ambas tecnologías, las relaciones de expresión relativas están a una distancia del 10 % entre sí. Los genes ilustrados son ECHD (Enoil Coenzima A hidratasa); ADH1A (Alcohol deshidrogenasa 1A); DCI (Dodecenil-Coenzima A delta isomerasa); ATP5D (ATP sintasa mito F1); CYC1 (citocromo c-1); NDUFS7 (NADH deshidrogenasa Fe-S); COX4I1 (Citocromo c IV).

La Figura 18 muestra gráficos del efecto de la inyección de Spexina diaria en los pesos de ratones con dieta alta en grasas. A dos grupos de ratones con obesidad inducida por dieta (DIO), alojados en condiciones normales y alimentados con un pienso especial con aproximadamente el 60 % de calorías como grasas, se les inyectaron diariamente durante 6 días 0,2 ml de vehículo de PBS 1x (n = 5), o PBS 1x que contenía Spexina a una concentración de 2500 ng/ml (n = 5). La Figura 18A es un gráfico que representa los pesos corporales medios por día de ratones DIO con PBS inyectada. Los ratones DIO con PBS inyectada continuaron aumentando de peso. La Figura 18B es un gráfico que representa los pesos corporales medios de ratones con Spexina inyectada. Los ratones pierden aproximadamente 0,3 g de peso corporal al día. Sin tener en cuenta el peso corporal del día 2, los días restantes muestran una clara correlación negativa entre el día de dosificación y el peso corporal ($r = -0,999$).

La Figura 19 es un gráfico que muestra una comparación de dos grupos de ratones C57BL/6J obesos, alimentados con dieta alta en grasas (HFD). Un grupo, con un peso de partida medio de 42 g, se trató con inyecciones intraperitoneales diarias de solución salina tamponada con fosfato (PBS) más albúmina de suero bovino (BSA) 0,05 %. El segundo, con un peso de partida medio de 46 g, recibió inyecciones de Spexina (péptido A) diarias de PBS 1X mas BSA 0,05 % a una dosis que se ha predicho que minimiza el aumento de peso o mantiene el peso corporal. El grupo de PBS continuó con aumento de peso rápido; el grupo de Spexina aumentó de peso mucho más lentamente. Las curvas de peso de los 2 grupos se cruzaron a las 6 semanas de tratamiento. Los animales se sacrificaron a las 7 semanas, momento en el cual los pesos medios de los dos grupos no eran diferentes.

La Figura 20 es un esquema de la expresión de ARNm de Spexina humana por tejido. Una compilación de los datos de expresión génica humanos de Affymetrix del buscador de genoma de UCSD indica que la expresión de Spexina se limita a algunos tejidos (por ejemplo, núcleos del SNC, músculo esquelético, linfoma de Burkitt [Daudi], y tejido adiposo). La expresión de Spexina es baja en la mayoría de los tejidos humanos por análisis de micromatrices de Affymetrix.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona, en parte, el descubrimiento de genes que se expresan diferencialmente en grasa de sujetos obesos y normales, proporcionando la base para las identificaciones de obesidad (OS) que pueden usarse como dianas terapéuticas para obesidad. Estos estudios de expresión génica en grasa de sujetos obesos humanos, por lo tanto, pueden usarse para identificar dianas terapéuticas usando modelos animales de obesidad. Una vez que se han identificado las dianas, las identificaciones de obesidad pueden usarse para métodos de diagnóstico y tratamiento para obesidad y trastornos asociados con la obesidad. En una realización, los genes que comprenden una identificación de obesidad comprenden los genes enumerados en la Tabla 7 y la Tabla 8, Spexina o una combinación de los mismos.

La descripción proporciona métodos para administrar Spexina o un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o derivado de Spexina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. A un sujeto obeso para tratar obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. La invención también proporciona métodos para administrar Spexina o un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la pérdida de peso en el sujeto. La descripción proporciona además métodos para administrar Spexina o un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la saciedad en el sujeto. La descripción también proporciona métodos para detectar la presencia de o una predisposición a obesidad o un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto humano. La descripción proporciona adicionalmente un kit de diagnóstico para determinar si un sujeto está predispuesto a tener obesidad o un trastorno asociado con la obesidad o si una muestra de un sujeto muestra expresión aumentada o reducida de al menos dos o más genes de identificación de obesidad (OS). La descripción

proporciona además métodos para identificar compuestos útiles para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto.

Obesidad y trastornos asociados con la obesidad

5

La obesidad se caracteriza por exceso de grasa corporal y es una enfermedad crónica que supone un impacto significativo en la calidad de vida, productividad y estado socioeconómico. Una persona de tamaño normal tiene entre 30 y 35 millones de células grasas. Cuando una persona aumenta de peso estas células grasas primero aumentan de tamaño y después de número. La obesidad es, de hecho, el aumento de la deposición de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) principalmente en forma de triglicéridos (TG), en tejido adiposo y otros. Aunque antes se creía que los LCFA entraban en las células exclusivamente por difusión pasiva a través de las membranas plasmáticas, el hecho de que los TG se acumulan en sitios específicos indicó que la captación de LCFA celular implica mecanismos específicos, regulables.

10

15

Se ha mostrado que la obesidad aumenta el riesgo de hipertensión, dislipidemia (colesterol total alto o altos niveles de triglicéridos), diabetes de tipo II, enfermedad cardíaca coronaria, ictus, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño y algunos cánceres (por ejemplo, cáncer endometrial, cáncer de mama y cáncer de colon). En una realización, un trastorno asociado con obesidad comprende un trastorno metabólico, hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, un trastorno relacionado con lípidos, diabetes mellitus de tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente, NIDDM), enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño, cáncer, síndrome de ovario poliquístico (SOP) o una combinación de los mismos. En una realización, el trastorno metabólico comprende hiperglucemia, resistencia a insulina, hiperinsulinemia, síndrome metabólico o una combinación de los mismos. En otra realización, el trastorno relacionado con lípidos comprende aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, dislipidemia o una combinación de los mismos. En una realización adicional, el cáncer comprende cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de colon o una combinación de los mismos.

20

25

Se produce obesidad cuando un sujeto tiene un peso y una masa corporal, particularmente de tejido graso, por encima de los patrones aceptados en la actualidad. El índice de masa corporal (IMC; kg/m^2) proporciona una medida de obesidad útil en el nivel de población que puede usarse para estimar la prevalencia de la obesidad dentro de una población y los riesgos asociados con ella. Por ejemplo, un sujeto es obeso con un IMC por encima del patrón aceptado en la actualidad. Cuando un sujeto es un ser humano, los patrones actuales tanto para hombres como para mujeres aceptados como "normales" son un IMC de aproximadamente 20 kg/m^2 a aproximadamente $24,9 \text{ kg/m}^2$. En una realización, un sujeto obeso tiene un IMC de 25 kg/m^2 o mayor. En otra realización, un sujeto obeso tiene un IMC de aproximadamente 30 kg/m^2 o mayor. En realizaciones adicionales, un sujeto obeso tiene un IMC de aproximadamente 40 kg/m^2 o mayores. En algunas realizaciones, el sujeto es obeso cuando pesa más del 120 % del peso corporal normal para su edad y altura. Incluso una obesidad leve, al 20 % por encima del peso deseable según los diagramas de altura-peso convencionales, puede aumentar el riesgo de enfermedad, tal como los trastornos asociados con la obesidad descritos en el presente documento, y muerte prematura. Los pesos corporales normales varían entre especies e individuos basándose en la altura, constitución física, estructura ósea y sexo. Un sujeto, de acuerdo con la invención, incluye, pero sin limitación, un ser humano o animal no humano, tal como un primate, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un conejo, un mono, un ratón, una rata, un cerdo, una oveja o una cabra.

30

35

40

Modelos de ratón de obesidad y trastornos asociados con la obesidad

45

Existen diversos modelos animales para estudiar la obesidad (véase, por ejemplo, Bray, G. A., 1992, Prog. Brain Res. 93:333-341, y Bray, G. A., 1989, Amer. J. Clin. Nutr. 5:891-902). También se han identificado animales que tienen mutaciones que conducen a síndromes que incluyen síntomas de obesidad. Los modelos animales mejor estudiados para obesidad son ratones. Véase revisiones, por ejemplo, en Friedman, J. M. *et al.*, 1991, Mamm. Gen. 1:130-144; Friedman, J. M. y Liebel, R. L., 1992, Cell 69:217-220. Los modelos de obesidad de ratones han indicado que la obesidad es un rasgo complejo con un alto grado de heredabilidad. Se han identificado mutaciones en varios loci que conducen a fenotipos obesos, e incluyen (pero sin limitación) las mutaciones recesivas autosómicas obeso (*ob*), diabetes (*db*), gordo (*fat*) y rechoncho (*tub*).

50

55

La mutación *ob* se encuentra en el cromosoma 6 mientras que la mutación *db* se localiza en el cromosoma 4. Cada mutación conduce a una aparición de obesidad clínicamente similar, comenzando a aproximadamente un mes de edad, con un fenotipo tipificado por hiperfagia, anomalías graves en el metabolismo de la glucosa e insulina, mala termorregulación y termogénesis sin escalofríos, y letargo extremo y subdesarrollo de la masa corporal magra. En el ratón *db*, también se han presentado niveles de triyodotironina elevados.

60

El gen *ob* y su homólogo humano se clonaron por Zhang, Y. *et al.*, (1994, Nature 372:425-432). El gen *ob* codifica leptina, una proteína de 167 aminoácidos. Se produce por adipocitos del tejido adiposo blanco, y el nivel de leptina en circulación es directamente proporcional a la cantidad total de grasa en el cuerpo. En su forma activa, la leptina es una hormona proteica de 16 kDa implicada en la regulación del consumo de energía y gasto de energía, incluyendo el apetito y el metabolismo. Los ratones *ob/ob* tienen mutaciones en el gen de leptina, y son sensibles a tratamiento de leptina.

65

El locus *db* codifica un receptor de alta afinidad para el producto génico de *ob*, leptina (Chen, H. *et al.*, Cell. 9 feb 1996; 84 (3): 491-5). El producto génico de *db*, el receptor de leptina, es un receptor de un único dominio transmembrana que está estrechamente relacionado con el componente transductor de señal de receptor de citocinas gp130 (Tartaglia, L. A. *et al.*, 1995, Cell 83: 1263- 1271).

Otro modelo animal, la rata *fa/fa* (gorda), es similar al ratón *ob/ob* y el ratón *db/db*. Sin embargo, una rata *fa/fa* tiene una capacidad normal para termogénesis sin escalofríos pero son muy sensibles al frío. El letargo parece desempeñar un papel mayor en el mantenimiento de la obesidad en ratas *fa/fa* en comparación con los ratones *ob/ob* y *db/db*.

Visión de conjunto de la diabetes

La obesidad, uno de los principales síntomas en el síndrome metabólico, es no solamente un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo II (Abate N, *et al.*, J Diabetes Complications, 2000, 14(3):154-74) sino también un factor de riesgo independiente para enfermedad cardíaca coronaria (Wallace AM, *et al.*, Circulation, 2001, 104 (25): 3052-6). El aumento de los niveles de leptina en circulación está notablemente asociado con la obesidad (Caro JF, *et al.*, Diabetes, 1996, 45 (11): 1455-62; Chu NF, *et al.*, Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24 (9): 1085-92). La función fisiológica primaria de la leptina es evitar la obesidad regulando el consumo de alimentos y el equilibrio energético mediante activación de sus receptores en centros hipotalámicos. Los niveles elevados de leptina en plasma (también denominado hiperleptemia) asociados con la obesidad y diabetes implican una resistencia a la acción de la leptina.

La diabetes mellitus es uno de los trastornos crónicos más prevalentes que afectan a la población mundial. La diabetes mellitus es un trastorno del metabolismo de carbohidratos, caracterizado por hiperglucemia y glicosuria, que resulta de la síntesis o utilización inadecuadas de la insulina. La hiperleptinemia y la hiperinsulinemia también son características de algunos tipos de diabetes, tales como diabetes de tipo II (o diabetes mellitus no insulino dependiente, NIDDM; analizada posteriormente). La diabetes existe en cuatro categorías: diabetes de tipo I (también denominada diabetes mellitus insulino dependiente o IDDM), diabetes de tipo II (NIDDM), diabetes mellitus gestacional y otros tipo específicos, en los que cada tipo tiene una patogénesis y etiología distintas. En Europa, los Estados Unidos y Canadá más del 80 % de los casos de diabetes se clasifican como tipo II, y 5-10 % se diagnostican como tipo I (Carulli L, *et al.*, Aliment Pharmacol Ther, 2005, 22 Supl 2: 16-9).

En diabetes de tipo I, el páncreas no consigue producir insulina, que es esencial para la homeostasis de la glucosa. Esta forma se desarrolla típicamente en niños y adolescentes, pero también se puede desarrollar posteriormente. La diabetes de tipo II resulta de la incapacidad de los tejidos sensibles a insulina para responder apropiadamente a la acción de la insulina, por tanto se denominan resistentes a insulina. La diabetes de tipo II aparece más frecuentemente en adultos, pero se ha observado un aumento en adolescentes a los que se ha diagnosticado diabetes de tipo II (Carulli L, *et al.*, Aliment Pharmacol Ther, 2005, 22 Supl 2:16-9; Bouche C, *et al.*, Endoc Rev, 2004, 25(5): 807-830).

La diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), o diabetes de tipo II, aparece predominantemente en adultos. Estos individuos producen niveles adecuados de insulina pero presentan un defecto en la utilización mediada por insulina y el metabolismo de glucosa en tejidos periféricos, tales como el músculo esquelético, tejido adiposo pardo y tejido adiposo blanco. Los sujetos con NIDDM muestran sobreproducción de glucosa por el hígado, contribuyendo de este modo al estado hiperglucémico asociado con el trastorno; deterioro de la secreción de insulina regulada por glucosa; y resistencia a la evacuación de glucosa mediada por insulina, contribuyendo por tanto de este modo al estado hiperglucémico del sujeto aquejado. En NIDDM, la secreción de insulina se potencia con frecuencia para compensar la resistencia a insulina. A medida que el trastorno prevalece, las células β pancreáticas no consiguen mantener secreción de insulina suficiente para compensar la sensibilidad a insulina alterada. Sin embargo, aún no se han establecido los mecanismos responsables del fallo de la acción de células β , pero quizás puede atribuirse a efectos hiperglucémicos y/o a las demandas continuas sobre las células β por la resistencia a insulina periférica (Carulli L, *et al.*, Aliment Pharmacol Ther, 2005, 22 Supl 2:16-9; Bouche C, *et al.*, Endoc Rev, 2004, 25(5): 807-830).

Los sujetos que presentan resistencia a insulina o a los que se diagnostica diabetes de tipo II con frecuencia muestran diversos síntomas que se denominan síndrome metabólico o síndrome X. Un sujeto que tiene este síndrome se caracteriza por mostrar tres o más síntomas seleccionados del siguiente grupo: (1) hipertrigliceridemia; (2) obesidad abdominal; (3) bajo colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL); (4) niveles de glucosa en suero en ayunas elevados; (5) alta presión sanguínea; y (6) hiperleptinemia. Los sujetos con NIDDM pueden presentar varios de los síntomas descritos. Los sujetos con síndrome X, tanto si se desarrolla diabetes mellitus manifiesta como si no, tienen un mayor riesgo de desarrollar las complicaciones microvasculares y macrovasculares que aparecen en sujetos con NIDDM, tales como aterosclerosis y enfermedad cardíaca coronaria (Carulli L, *et al.*, Aliment Pharmacol Ther, 2005, 22 Supl 2:16-9).

La hiperglucemia descontrolada y continua relacionada con la diabetes se asocia con morbilidad y mortalidad aumentada y prematura. Los sujetos diabéticos, tales como los que tienen NIDDM, tienen un riesgo aumentado considerable de complicaciones macrovasculares y microvasculares, tales como enfermedad cardíaca coronaria,

aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, ictus, hipertensión, retinopatía, neuropatía y nefropatía (Federici M y R Lauro, *Aliment Pharmacol Therapy*, 2005, 22 (Supl 2): 11-15; Desai AS y PT O'Gara, *Indian Heart J*, 2005, 57(4):295-303; Natarajan R y JL Nadler, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1542-48). Por lo tanto, el control terapéutico de la obesidad, la homeostasis de la glucosa, hipertensión y metabolismo de lípidos son críticamente importantes en el tratamiento y el control clínico de la diabetes mellitus, para reducir la mortalidad debida a complicaciones diabéticas, tales como enfermedad cardiovascular.

Señalización de insulina y leptina

La unión de insulina con su receptor conduce a la activación de varias rutas mitógenas y metabólicas mediante sustratos de receptor de insulina (IRS 1-4), Gab-1, y Cbl (Sun XJ, *et al.*, *Nature*, 1995, 377:173-7; Sun XJ, *et al.*, *Nature*, 1991, 352:73-7; Fantin VR, *et al.*, *J Biol Chem*, 1998, 273(17):10726-32; Berg CE, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(3):1021-7; Holgado-Madruga M, *et al.*, *Nature*, 1996, 379:560-4; Ribon V y AR Saltiel, *Biochem J*, 1997, 324 (Pt 3):839-45). La insulina se une con su receptor dando como resultado autofosforilación de las subunidades β y fosforilación de los restos de tirosina de los sustratos de receptor de insulina (tales como IRS-1). IRS fosforila posteriormente el dominio SH2 de la tirosina fosfatasa, Shp2, así como el dominio SH3 de la molécula adaptadora Grb2. Grb2 activa a su vez se une con Sos1, que activa después la ruta de señalización de Ras y transcripción corriente abajo de genes. La proteína IRS activa también fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) mediante unión con su dominio SH2, dando como resultado aumentos de los niveles de PIP₂ y PIP intracelulares lo que conduce a la activación de quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol fosfato (PDK-1). Este acontecimiento conduce por lo tanto a la activación de la ruta de Akt/PKB, que da como resultado acontecimientos intracelulares tales como la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) de un grupo intracelular a la superficie celular.

Entre las rutas mitogénica y metabólica iniciadas por la cascada de señalización de insulina está la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Berman DM, *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(1): 97-103; Dennis PB, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 1996, 16 (11): 6242-51). En células lisas vasculares (VSMC), la leptina se une con su receptor y activa las rutas tanto de proteína quinasa activa por mitógeno (MAPK) como PI3K mediante fosforilación de los restos Tyr985 y Tyr1138 del receptor de leptina (Oda A, *et al.*, *Kobe J Med Sci*, 2001, 47(3):141-50). Se sabe que el receptor de leptina activado regula componentes de la cascada de señalización de insulina, tales como ERK, Akt, IRS-1, MAP quinasa, y PI3-quinasa, una acción celular denominada interferencia (Niswender KD, *et al.*, *Trends Endocr Metab*, 2004, 15(8):362-9; Myers MG, *Recent Prog Horm Res*, 2004, 59:287-304; Ahima RS y SY Osei, *Physio Behav*, 2004, 81:223-41). La activación de la ruta de PI3K puede estimular la fosforilación de mTOR mediante la activación de Akt (proteína quinasa B). Esto liga directamente las hormonas insulina y leptina (una adipocina) con la ruta de mTOR. La activación de mTOR conduce a la hiperfosforilación de p70^{S6K} y la proteína de unión a eIF-4E (4E-BP1) que conduce la traducción del ARNm de tramo de oligopirimidina 5' terminal y que libera eIF-4E para formar el complejo eIF-4F, respectivamente (Brunner L *et al.*, *Obes Relat Metab Disord*, 1997, 21(12):1152-60; Cutfield LS, *et al.*, *J Pediatr*, 2003, 142(2):113-6; Sugiyama H, *et al.*, *J Immunol*, 1996, 157(2):656-60; Volarevic S y G Thomas, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 65: 101-27; Hara K, *et al.*, *J Biol Chem*, 1997, 272 (42): 26457-63; Graves LM, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (16): 7222-6).

Spexina

La Spexina es un péptido con actividad GI. Se identificó en primer lugar usando análisis de modelado de Markov basándose en características comunes a hormonas peptídicas para encontrar nuevas secuencias de proteoma humano (Mirabeau *et al.*, (2007) *Genome Res.*, 17: 320-327). Demuestra efectos contráctiles en un ensayo de explante de estómago de rata, lo que indica una actividad biológica.

Ch12, orf39 (Spexina; ~17.333 pb en seres humanos) se mapea en el locus 12p12.1, que también se define por el marcador de microsatélite (MS) D12S1042. Locus 12p12.1, que es el sitio en el que se mapea Spexina, se ha asociado con diversos marcadores fenotípicos de obesidad en diversos estudios de vínculos familiares. Por ejemplo, 12p12.1 se ha asociado con el IMC en blancos, con una puntuación de LOD máxima de 2,1 (estudio HERITAGE; Yvon *et al*; 2001: Obesity Genome Map; Rankinen *et al*, 2006). El marcador de MS D12S1042 se ha ligado adicionalmente al perímetro de la cintura, con una puntuación de LOD máxima de 2,374 (Oman Family Study, Bayoumi *et al*, 2008). Además, la relación con el marcador de microsatélite D12S1042 fue significativa en un subconjunto de familias con mayor perímetro de circunferencia promedio, con una puntuación de LOD máxima de 4,45, p= 0.0045 para aumento de las pruebas de relación (Dominican family study; Wang *et al*; 2009). En una realización, un método para detectar la presencia de o una predisposición a obesidad o a un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto humano comprende obtener una muestra biológica de un sujeto; y detectar si el sujeto expresa o no Spexina en combinación con la presentación de un marcador o marcadores fenotípicos de obesidad (IMC, perímetro de la cintura, o una combinación de los mismos), en comparación con un sujeto no aquejado de obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. El gen de Spexina humana se encuentra en un locus que se ha ligado a fenotipos/manifestaciones relacionados con la obesidad en varios estudios de asociación de todo el genoma. En una realización adicional, un gen en el locus 12p12.1 (y la región definida por el marcador de microsatélite D12S1042), desempeña un papel en la obesidad. En otra realización, una alteración genética en SEC ID N° 1 (por ejemplo, una suspensión, mutación de sentido erróneo, mutación sin sentido o una combinación de los

mismos) altera el nivel de expresión o la secuencia primaria del mensaje de Spexina y/o proteína, lo que conduce a expresión defectuosa y pérdida de función. La detección de estos cambios sería la base de ensayos de diagnóstico.

5 La Spexina es una hormona humana, cuya infraexpresión en obesidad se identificó en seres humanos obesos, no en modelos de ratón de obesidad (véase Ejemplos). En una realización, puede usarse Spexina como un control de peso general. En otra realización, puede usarse Spexina para la regulación del apetito. En una realización adicional, la Spexina puede usarse para el control de la lipodistrofia. En algunas realizaciones, la Spexina puede usarse para reducción de la grasa del abdomen.

10 La secuencia polipeptídica de Spexina humana se representa en la SEC ID N° 1. La secuencia de nucleótidos de Spexina humana se muestra en SEC ID N° 2. Se puede acceder a información de secuencia relacionada con Spexina en bases de datos públicas por los números de referencia de GenBank NM_030572 (para ARNm) y NP_085049 (para proteína).

15 SEC ID N° 1 es la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre humana correspondiente a Spexina (restos 1-116), en la que la secuencia en negrita representa la secuencia peptídica madura:

1 MKGLRSLAAT TLALFLVFVF LGNSSCAPQR LLERR**NWTPQ AMLYLKGAQG** RRFISDQSRR
61 DLSDRPLPE RRSPNPQLLT IPEAATILLA SLQKSPEDDEE KNFDQTRFLE DSLNLN

20 SEC ID N° 2 es la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre humana correspondiente a Spexina (nucleótidos 1-638), en la que la "ATG" indica el comienzo de la fase abierta de lectura:

1 ctgacaagat gtccctgttg actcccaaac tctactccag atggggaggt gcccttaaca
61 ccaagat ttt aaaagctcca atttcagagc aagagtcgaa aactcacaga taaagttata
121 gttatttcag ggttctgaaa agacgcagaa **catg**aaggga ctgagaagtc tggcagcaac
181 aaccttggt cttttcctgg tgtttgtttt cctgggaaac tccagctgcg ctccgcagag
241 actgttgag agaaggaact ggactcctca agctatgctc tacctgaaag gggcacaggg
301 tcgccgcttc atctccgacc agagccggag aaaggacctc tccgaccggc cactgccgga
361 aagacgaagc ccaaattccc aactactaac tattccggag gcagcaacca tcttactggc
421 gtcccttcag aatcaccag aagatgaaga aaaaaacttt gatcaaacca gattcctgga
481 agacagtctg cttaactggt gaaaatatac tggattatgt ttaattatgg ttctattctc
541 ttgaaaaca tgaaccatgt gaataaaacc ttggaccct ttttaaaaaa aaaaaaaaaa
601 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

25 *Genes de identificación de obesidad*

La presente invención posibilita el descubrimiento de que se han identificado por primera vez varios genes humanos como una cohorte de genes implicados en la obesidad. Estos genes se identificaron como expresados diferencialmente en grasa de sujetos obesos y normales humanos. Estos genes, ahora que se han identificado, pueden usarse para una diversidad de métodos útiles; por ejemplo, pueden usarse para determinar si un sujeto está predispuesto a obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. Los genes identificados como parte de esta cohorte o este grupo de genes de obesidad (es decir, genes de identificación de obesidad o "genes OS") incluyen cualquier gen identificado como expresado diferencialmente en una cualquiera de las Tablas 7- 8.

35 En una realización, la descripción proporciona métodos para diagnosticar obesidad o un trastorno asociado con la obesidad así como métodos para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad, que comprenden el uso de ácidos nucleicos, o proteínas codificadas por ácidos nucleicos del gen de Spexina. El método diagnostica la causa subyacente de obesidad y/o un trastorno asociado con la obesidad.

40 En algunas realizaciones, la descripción abarca métodos para usar proteínas OS codificadas por un ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ADN sintético así como cualquier forma de ARN correspondiente). Por ejemplo, una proteína OS puede codificarse por un ácido nucleico recombinante de un gen OS tal como Spexina. Las proteínas OS de la invención pueden obtenerse de diversas fuentes y pueden producirse de acuerdo con diversas técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína OS puede obtenerse explorando bibliotecas de ADN, o mediante amplificación a partir de una fuente

natural. Una proteína OS puede ser un fragmento o parte de proteína Spexina humana. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas OS de la invención pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante y dichos ácidos nucleicos recombinantes pueden prepararse por técnicas convencionales, incluyendo síntesis química, ingeniería genética, técnicas enzimáticas o una combinación de las mismas. Son ejemplos no limitantes de una proteína OS el polipéptido codificado por el gen de Spexina y/o cualquiera de los genes enumerados en una cualquiera de las Tablas 7- 8.

En algunas realizaciones, la descripción abarca el uso de variantes de una proteína OS, tales como Spexina. Dicha variante puede comprender una variante de origen natural debido a variaciones alélicas entre individuos (por ejemplo, polimorfismos), alelos mutados relacionados con la obesidad, o formas de corte y empalme alternativo. En una realización, la descripción abarca métodos para usar una proteína o un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico de un gen de identificación de obesidad (OS), tal como la secuencia mostrada en SEC ID N° 1, o una proteína o polipéptido OS codificado por cualquiera de los genes enumerados en una cualquiera de las Tablas 7-8. En otra realización, el polipéptido puede estar modificado, tal como por glucosilaciones y/o acetilaciones y/o reacción química o acoplamiento, y puede contener uno o varios aminoácidos no naturales o sintéticos. Un ejemplo de un polipéptido OS tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 1. En ciertas realizaciones, la descripción abarca variantes de una proteína humana codificada por un gen de identificación de obesidad (OS), tal como Spexina. Dichas variantes pueden incluir las que tienen al menos de aproximadamente 46 % a aproximadamente 50 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 50,1 % a aproximadamente 55 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 55,1 % a aproximadamente 60 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 60,1 % a aproximadamente 65 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 65,1 % a aproximadamente 70 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 70,1 % a aproximadamente 75 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 75,1 % a aproximadamente 80 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 80,1 % a aproximadamente 85 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 85,1 % a aproximadamente 90 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 90,1 % a aproximadamente 95 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 95,1 % a aproximadamente 97 % de identidad con SEC ID N° 1, o que tienen al menos de aproximadamente 97,1 % a aproximadamente 99,9 % de identidad con SEC ID N° 1.

ADN y polipéptidos, métodos y purificación de los mismos

La presente invención utiliza biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante disponibles para los expertos en la materia. Dichas técnicas se conocen bien por los expertos en la materia y se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "DNA Cloning: A Practical Approach," volúmenes I y II (D. N. Glover, ed., 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1985); "Transcription and Translation" (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1986); "Immobilized Cells and Enzyme" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984), y Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (3ª edición, 2001). Un experto en la materia puede obtener una proteína modificada por un gen OS, tal como Spexina, o una variante del mismo, de varias maneras, que incluyen, pero sin limitación, aislar la proteína mediante medios bioquímicos o expresar una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés por métodos de ingeniería genética. Por ejemplo, puede obtenerse Spexina, o una variante de la misma, purificándola de células humanas que expresan Spexina, o por síntesis química directa.

Pueden identificarse células hospedadoras que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido OS (por ejemplo, Spexina), y que expresa posteriormente una proteína codificada por un gen OS (por ejemplo, Spexina), mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en membrana, solución o microplaca para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Spexina puede detectarse por hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación usando sondas o fragmentos de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de Spexina.

Los métodos de amplificación incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, ed. Innis, Academic Press, N.Y., 1990 y PCR Strategies, 1995, ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y.), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, Genomics 4:560, 1989; Landegren, Science 241:1077, 1988; Barringer, Gene 89:117, 1990); amplificación de transcripción (véase, por ejemplo, Kwok, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173, 1989); y replicación de secuencia auto mantenida (véase, por ejemplo, Guatelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874, 1990); amplificación de Q Beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith, J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491, 1997), ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automático (véase, por ejemplo, Burg, Mol. Cell. Probes 10:257-271, 1996) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario; véase también Berger, Methods Enzymol. 152:307-316, 1987; Sambrook; Ausubel; patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology 13:563-564, 1995).

Se encuentra una guía para hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Sambrook, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; *Current Protocols In Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, 1997; *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes*, parte 1. Theory and Nucleic Acid Reparatión, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., 1993.

En una realización, un fragmento de un ácido nucleico del gen de Spexina puede abarcar cualquier parte de al menos aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de SEC ID N° 2. En otra realización, el fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos de SEC ID N° 2. Los fragmentos pueden incluir todas las longitudes de nucleótidos posibles entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los ensayos basados en amplificación de ácidos nucleicos implican el uso de oligonucleótidos seleccionados de secuencias que codifican un polipéptido codificado por un gen OS (por ejemplo, Spexina), o son complementarios de él, para detectar transformantes que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido OS, por ejemplo, Spexina.

Se conocen en la técnica métodos para detectar y cuantificar polipéptidos OS (por ejemplo, un polipéptido de Spexina) y polinucleótidos (por ejemplo, un polinucleótido de Spexina) en muestras biológicas. Por ejemplo, están bien establecidos protocolos para detectar y medir la expresión de un polipéptido codificado con un gen OS, tal como Spexina, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Los ejemplos no limitantes incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede usarse un inmunoensayo de base monoclonal, de dos sitios, usando anticuerpos monoclonales sensibles a dos epítopos no interferentes en un polipéptido codificado por un gen OS (por ejemplo, Spexina), o puede emplearse un ensayo de unión competitiva. En una realización, puede determinarse la expresión de infra o sobreexpresión de un producto génico de OS (por ejemplo, un polipéptido de Spexina o ARNm de Spexina). En una realización, una muestra biológica comprende una muestra de sangre, suero, células (incluyendo células completas, fracciones celulares, extractos celulares y células o líneas celulares cultivadas), tejidos (incluyendo tejidos obtenidos por biopsia), fluidos corporales (por ejemplo, orina, esputo, líquido amniótico, líquido sinovial) o de medios (de células o líneas celulares cultivadas). En realizaciones adicionales, la muestra tisular es tejido adiposo. En realizaciones específicas, el tejido adiposo es adiposo omental, adiposo subcutáneo o adiposo mesentérico. Los métodos para detectar o cuantificar polinucleótidos de Spexina incluyen, pero sin limitación, ensayos basados en amplificación con amplificación de señal, ensayos basados en hibridación y ensayos de combinación de amplificación-hibridación. Para detectar y cuantificar polipéptidos de Spexina, un método ejemplar es un inmunoensayo que utiliza un anticuerpo u otros agentes de unión que se unen específicamente con un polipéptido o epítipo de Spexina, por ejemplo, ensayos de ELISA o RIA.

Se conocen por los expertos en la materia técnicas de conjugación y marcaje y pueden usarse en diversos ensayos de ácido nucleico y aminoácidos. Los métodos para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína OS, tales como Spexina, incluyen, pero sin limitación, oligomarcaje, traslación de muesca, marcaje de extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido codificado por un gen OS puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado, y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6. Estos procedimientos pueden realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado (Amersham Pharmacia Biotech, Promega y US Biochemical). Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados que pueden usarse para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores y/o partículas magnéticas.

Las células hospedadoras transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifican un polipéptido OS, tal como Spexina, pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada puede secretarse o estar contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Los vectores de expresión que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido OS pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción de moléculas polipeptídicas solubles codificadas por un gen OS tal como Spexina, o una variante del mismo, a través de una membrana celular procariota o eucariota, o que dirigen la inserción en membrana de una molécula polipeptídica unidad a membrana codificada por un gen OS o una variante del mismo.

También pueden usarse otras construcciones para unir una secuencia génica que codifica un polipéptido OS (por ejemplo, Spexina) con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitaría la purificación de proteínas solubles. Dichos dominios facilitadores de purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes metálicos 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 de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Pueden

incluirse secuencias enlazadoras escindibles (es decir, las específicas para factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.)) entre el dominio de purificación y un polipéptido codificado por un gen OS para facilitar la purificación. Uno de dichos vectores de expresión posibilita la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido codificado por un gen OS (por ejemplo, Spexina) y 6 restos de histidina que preceden a una tiorredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los restos de histidina facilitan la purificación por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados, mientras que el sitio de escisión por enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido codificado por un gen OS.

Un polipéptido OS (por ejemplo, Spexina) puede purificarse a partir de cualquier célula humana o no humana que exprese el polipéptido, incluyendo las que se han transfectado con construcciones de expresión que expresan una proteína OS. Un polipéptido OS purificado (por ejemplo, Spexina) puede separarse de otros compuestos que normalmente se asocian con el polipéptido OS (por ejemplo, Spexina) en la célula, tal como ciertas proteínas, carbohidratos o lípidos, usando métodos practicados en la técnica. Los métodos no limitantes incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento de sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparatoria.

Pueden sintetizarse secuencias de ácido nucleico que comprenden un gen OS (por ejemplo, Spexina) que codifica un polipéptido, completamente o en parte, usando métodos químicos conocidos en este campo. Como alternativa, un polipéptido de OS, tal como Spexina, puede producirse usando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida. Puede realizarse síntesis proteica usando técnicas manuales o por automatización. Puede conseguirse síntesis automática, por ejemplo, usando un sintetizador peptídico Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Opcionalmente, pueden sintetizarse por separado fragmentos de polipéptidos OS y combinarse usando métodos químicos para producir una molécula de longitud completa. En una realización, un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que comprende un gen OS puede abarcar cualquier parte de al menos aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de SEC ID N° 2. En una realización, el fragmento puede comprender al menos 10 nucleótidos aproximadamente, al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos de SEC ID N° 2. Los fragmentos incluyen todas las posibles longitudes de nucleótidos entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 nucleótidos.

Un fragmento OS puede ser un fragmento de una proteína OS, tal como la proteína Spexina. Por ejemplo, el fragmento de Spexina puede abarcar cualquier parte de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEC ID N° 1. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 70 aminoácidos consecutivos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEC ID N° 1. Los fragmentos incluyen todas las posibles longitudes de aminoácidos entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos.

Un péptido sintético puede purificarse sustancialmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La composición de un polipéptido OS sintético puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos. Adicionalmente, cualquier parte de una secuencia de aminoácidos que comprenda una proteína codificada por un gen OS (por ejemplo, Spexina) puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o una proteína de fusión.

Exploración para identificar compuestos que alivian la obesidad

La descripción proporciona métodos para identificar compuestos que pueden usarse para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. La descripción también proporciona métodos para identificar compuestos que pueden usarse para promover la pérdida de peso en un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad. La descripción proporciona además métodos para identificar compuestos que pueden usarse para promover la saciedad en un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad. Ya que la invención ha identificado genes que se expresan diferencialmente en grasa de sujetos obesos y normales (por ejemplo, Spexina así como los genes de identificación de obesidad enumerados en las Tablas 7- 8), la descripción también proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la expresión o actividad de un gen OS y/o proteína OS, tal como Spexina.

Pueden usarse modelos animales de obesidad, tales como ratones *ob/ob* y *db/db*, para identificar compuestos (por ejemplo, agentes de ensayo) que alivien los síntomas de obesidad y trastornos asociados con la obesidad, por

ejemplo, exceso de grasa corporal, niveles de leptina en suero elevados, niveles de Spexina en suero reducidos o una combinación de los mismos. Dichos modelos animales pueden usarse como sustratos de ensayo para la identificación de fármacos, productos farmacéuticos, terapias e intervenciones que pueden ser eficaces en el tratamiento de la obesidad y trastornos asociados con la obesidad. Por ejemplo, pueden exponerse modelos animales a un compuesto, que se sospecha que muestra una capacidad para aliviar síntomas de obesidad y trastornos asociados con la obesidad, por ejemplo, exceso de grasa corporal, niveles de leptina en suero elevados, niveles de Spexina en suero reducidos, o una combinación de los mismos, a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para inducir dicho alivio de síntomas en los animales expuestos. La respuesta de los animales a la exposición puede supervisarse evaluando la inversión de exceso de grasa corporal, los niveles de leptina en suero elevados, o los niveles de Spexina en suero reducidos asociados con la obesidad y trastornos asociados con la obesidad.

También puede usarse un ensayo de explante de intestino para identificar agentes de ensayo que alivian síntomas de obesidad y trastornos asociados con la obesidad, por ejemplo, exceso de grasa corporal, niveles de leptina en suero elevados, niveles de Spexina en suero reducidos o una combinación de los mismos. De acuerdo con Mirabeau *et al.*, ((2007) *Genome Res.*, 17: 320-327), pueden recogerse tiras de músculos del fundus del estómago de ratas y montarse en un baño de órganos oxigenado, en el que pueden estirarse y exponerse a agentes bioactivos, actuando de este modo como un sistema de bioensayo útil. Al comienzo de cada experimento, se aplica cloruro de acetilcolina para conseguir una máxima contracción de control, y se registran las contracciones. En una realización, puede aplicarse un péptido de Spexina amidado sintético (NWTPQAMLYLKGAQ-amida [SEC ID N° 32]; Primm; véase Mirabeau *et al.*, (2007) *Genome Res.*, 17: 320-327). Para identificar un agonista con propiedades similares a Spexina, por ejemplo, pueden aplicarse después dosis individuales de un agente de ensayo hasta que se obtienen respuestas reproducibles, si las hubiera. Para identificar un antagonista de Spexina, por ejemplo, pueden aplicarse después dosis individuales de un agente de ensayo hasta que se reduzcan las respuestas de Spexina inducidas en el ensayo de explante del intestino.

Los compuestos de ensayo o agentes de la invención comprenden péptidos (tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos o péptidos solubles), moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas e inorgánicas pequeñas), ácidos nucleicos (tales como ARNip o ARN antisentido), u otros agentes que pueden unirse con una molécula polipeptídica codificada por un gen OS (por ejemplo, Spexina) y/o tienen un efecto estimulante o inhibidor en la actividad biológica de una proteína codificada por un gen OS o su expresión (por ejemplo, Spexina). Se determinará después si los agentes de ensayo pueden promover la saciedad o pérdida de peso en un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad, o si el agente de ensayo puede usarse en el tratamiento de obesidad o un trastorno asociado con la obesidad (por ejemplo, examinando si hay un cambio en un fenotipo de peso corporal, tal como una reducción en la masa de grasa corporal).

Como se usa en el presente documento, un “compuesto modulador de Spexina” se refiere a un compuesto que interacciona con el gen Spexina, o la proteína o el polipéptido Spexina, y modula su actividad y/o su expresión. El compuesto puede aumentar la actividad o expresión de una proteína Spexina. Por el contrario, el compuesto puede reducir la actividad o sobreexpresión de una proteína Spexina. El compuesto puede ser un agonista de Spexina o un antagonista de Spexina. Algunos ejemplos no limitantes de compuestos moduladores de Spexina incluyen péptidos (tales como fragmentos peptídicos que comprenden SEC ID N° 1, o anticuerpos o fragmentos de los mismos), moléculas pequeñas (orgánicas o inorgánicas), y ácidos nucleicos (tales como ARNip o ARN antisentido específicos para un ácido nucleico que comprende SEC ID N° 2). Los agonistas de Spexina pueden ser moléculas que, cuando se unen con Spexina o su receptor, aumentan o prolongan la actividad de la proteína Spexina. Los agonistas de Spexina pueden ser compuestos (por ejemplo, compuestos sintéticos u otros péptidos de origen natural) que inducen la misma actividad o una similar en comparación con Spexina. Los agonistas de Spexina incluyen, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que active la proteína Spexina. Los antagonistas de Spexina pueden ser moléculas que, cuando se unen con la proteína Spexina, reducen la cantidad o la duración de la actividad de Spexina. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que reduzca la actividad de la proteína Spexina.

“Modular” se refiere a un cambio en la actividad o expresión de un gen o proteína OS, tal como Spexina. Por ejemplo, la modulación puede provocar un aumento o una reducción de la actividad proteica, las características de unión o cualquier otra propiedad biológica, funcional o inmunológica de una proteína OS. En una realización, la proteína OS es Spexina.

En una realización, un compuesto modulador de Spexina puede ser un fragmento peptídico de la proteína Spexina que se une con la Spexina en sí misma. Por ejemplo, puede abarcar cualquier parte de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEC ID N° 1. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEC ID N° 1. Los fragmentos incluyen todas las posibles longitudes de aminoácidos entre e incluyendo aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y

aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos peptídicos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse mediante métodos de síntesis de fase líquida o fase sólida (Atherton *et al.*, (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Inglaterra). Los fragmentos peptídicos de Spexina pueden aislarse de una fuente natural, obtenerse por ingeniería genética o prepararse de forma química. Estos métodos se conocen bien en la técnica.

Un compuesto modulador de Spexina puede ser una proteína tal como un anticuerpo (monoclonal, policlonal, humanizado, quimérico o completamente humano), o un fragmento de unión del mismo, dirigido contra un polipéptido codificado por el gen de Spexina. Un fragmento de anticuerpo puede estar en forma de un anticuerpo distinto de la forma de longitud completa e incluye partes o componentes que existen dentro de anticuerpos de longitud completa. Un fragmento de anticuerpo también puede ser un fragmento de anticuerpo que se ha modificado técnicamente. Los fragmentos de anticuerpo pueden incluir, pero sin limitación, Fv monocatenarios (scFv), diacuerpos, Fv, (Fab')₂, triacuerpos, Fc, Fab, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, regiones marco conservadas, regiones constantes y similares (véase, Maynard *et al.*, (2000) *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-76; Hudson (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:395-402). Los anticuerpos pueden obtenerse comercialmente, pueden generarse a medida, o pueden sintetizarse contra un antígeno de interés de acuerdo con métodos establecidos en la técnica (por ejemplo, véase Beck *et al.*, *Nat Rev Immunol.* May 2010; 10 (5): 345-52; Chan *et al.*, *Nat Rev Immunol.* May 2010; 10 (5): 301-16; y Kontermann, *Curr Opin Mol Ther.* Abr 2010; 12 (2): 176-83.

La inhibición de ARN que codifica un polipéptido codificado por un gen OS, por ejemplo, Spexina, puede modular eficazmente la expresión de un gen OS del que se transcribe ARN. Se seleccionan inhibidores del grupo que comprende: ARNip; ARN de interferencia o ARNi; ARNbc; ADN transcrito por ARN polimerasa III; ribozimas; y ácidos nucleicos antisentido, que pueden ser ARN, ADN o un ácido nucleico artificial.

Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo ADN antisentido, ARN y moléculas de ADN/ARN, actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm uniéndose con ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios de regiones únicas de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de Spexina, por ejemplo, por técnicas de fosfodiéster convencionales (Dallas *et al.*, (2006) *Med. Sci. Monit.* 12(4): RA67-74; Kalota *et al.*, (2006) *Handb. Exp. Pharmacol.* 173:173-96; Lutzburger *et al.*, (2006) *Handb. Exp. Pharmacol.* 173:243-59). Las secuencias de nucleótidos antisentido incluyen, pero sin limitación: morfolidos, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares.

El ARNip comprende una estructura bicatenaria que contiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pares de bases, por ejemplo de aproximadamente 21 a aproximadamente 25 pares de bases, y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen diana expresado o ARN dentro de la célula. El ARNip comprende una cadena de ARN con sentido y una cadena de ARN antisentido complementaria hibridadas entre sí por interacciones de formación de pares de bases de Watson-Crick convencionales. La cadena con sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de la molécula de ARNm diana. "Sustancialmente idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana se refiere a una secuencia de ácido nucleico que difiere de la secuencia diana en aproximadamente 3 % o menos. Las cadenas con sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias, o pueden comprender una única molécula en la que dos partes complementarias forman pares de bases y se unen covalentemente por un área "en horquilla" monocatenaria. Véase también, McMnaus y Sharp (2002) *Nat Rev Genetics*, 3:737-47, y Sen y Blau (2006) *FASEB J.*, 20:1293-99.

El ARNip puede ser ARN alterado que difiere de ARN de origen natural por la adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al extremo o los extremos del ARNip o a uno o más nucleótidos internos del ARNip, o modificaciones que hacen al ARNip resistente a la digestión por nucleasa, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNip con desoxirribonucleótidos. Una o ambas cadenas del ARNip también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa en el presente documento, un saliente 3' se refiere a al menos un nucleótido desapareado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN bicatenaria. Por ejemplo, el ARNip puede comprender al menos un saliente 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, o de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, o de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

Puede producirse ARNip de forma química o biológica, o puede expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral (por ejemplo, véase patente de Estados Unidos n.º 7.294.504, patente de Estados Unidos n.º 7.148.342, y patente de Estados Unidos n.º 7.422.896. se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de

ARNbc o ARNip en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0173478 de Gewirtz, y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0072204 de Hannon *et al.*

Los ADN transcritos por ARN polimerasa III contienen promotores, tales como el promotor U6. Estos ADN pueden transcribirse para producir ARN en horquilla pequeños en la célula que pueden actuar como ARNip o ARN lineales que pueden actuar como ARN antisentido. El compuesto modulador de Spexina puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o cualquier otra combinación adecuada de modo que se inhiba el ARN y/o el gen diana. Además, estas formas de ácidos nucleicos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, tricatenarias o tetracatenarias (véase por ejemplo, Bass (2001) *Nature*, 411, 428-429; Elbashir *et al.*, (2001) *Nature*, 411, 494-498; y publicaciones de PCT n.º WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 00/01846, WO 01/29058, WO 99/07409, WO 00/44914). En una realización, pueden sintetizarse ARN en horquilla cortos de forma exógena o pueden formarse transcribiendo a partir de promotores de ARN polimerasa III *in vivo*. Se describen ejemplos para preparar y usar dichos ARNhp para silenciamiento génico en células de mamífero en, por ejemplo, Paddison *et al.*, 2002, *Genes Dev*, 16:948-58; McCaffrey *et al.*, 2002, *Nature*, 418:38-9; McManus *et al.*, 2002, *RNA*, 8:842-50; Yu *et al.*, 2002, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:6047-52. Se modifican técnicamente ARNhp en células o en un animal para asegurar la supresión continua y estable de un gen deseado. Se conoce en la técnica que pueden producirse ARNip procesando un ARN en horquilla en la célula.

Un compuesto modulador de Spexina puede ser una molécula pequeña que se une con la proteína Spexina y altera su función, o por el contrario, potencia su función. Las moléculas pequeñas son un grupo diverso de sustancias sintéticas y naturales que generalmente tienen pesos moleculares bajos. Pueden aislarse de fuentes naturales (por ejemplo, plantas, hongos, microbios y similares), se obtienen en el mercado, están disponibles como bibliotecas o colecciones, o pueden sintetizarse. Pueden identificarse moléculas pequeñas candidatas que modulan la Spexina mediante exploración por ordenador o exploración de alto rendimiento (HTPS) de bibliotecas combinatorias. La mayoría de los productos farmacéuticos convencionales, tales como aspirina, penicilina y muchos quimioterapéuticos son moléculas pequeñas, pueden obtenerse en el mercado, pueden sintetizarse químicamente o pueden obtenerse de bibliotecas aleatorias o combinatorias como se describe posteriormente (Werner *et al.*, (2006) *Brief Funct. Genomic Proteomic* 5(1):32-6).

El conocimiento de la secuencia primaria de una molécula de interés, tal como un polipéptido codificado por el gen de Spexina, y la similitud de esa secuencia con proteínas de función conocida, puede proporcionar información con respecto a los inhibidores o antagonistas de la proteína de interés, además de agonistas. La identificación y exploración de agonistas y antagonistas se facilita adicionalmente por la determinación de características estructurales de la proteína, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X, difracción de neutrones, espectrometría de resonancia magnética nuclear y otras técnicas para la determinación de la estructura. Estas técnicas posibilitan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

Pueden explorarse agentes de ensayo, por ejemplo, compuestos moduladores de Spexina de grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales (véase Wang *et al.*, (2007) *Curr Med Chem*, 14 (2): 133-55; Mannhold (2006) *Curr Top Med Chem*, 6 (10): 1031-47; y Hensen (2006) *Curr Med Chem* 13 (4): 361-76). Se usan en la actualidad numerosos medios para síntesis aleatoria y dirigida de compuestos basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Están disponibles en el mercado bibliotecas de compuestos sintéticos de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), AMRI (Albany, NY), ChemBridge (San Diego, CA), y MicroSource (Gaylordville, CT). Está disponible una biblioteca de productos químicos poco habituales de Aldrich (Milwaukee, Wis.). Como alternativa, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, Wash.) o MycoSearch (N.C.), o pueden producirse fácilmente. Adicionalmente, bibliotecas y compuestos naturales y producidos de forma sintética se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales (Blondelle *et al.*, (1996) *Tib Tech* 14:60).

Se conocen bien en la técnica métodos para preparar bibliotecas de moléculas y están disponibles en el mercado muchas bibliotecas. Se describen ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente en Fodor *et al.*, (1991) *Science* 251:767-773; Houghten *et al.*, (1991) *Nature*, 354:84-86; Lam *et al.*, (1991) *Nature* 354:82-84; Medynski, (1994) *Biotechnology* 12:709-710; Gallop *et al.*, (1994) *J. Medicinal Chemistry* 37(9):1233-1251; Ohlmeyer *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926; Erb *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-11426; Houghten *et al.*, (1992) *Biotechniques* 13:412; Jayawickreme *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1614-1618; Salmon *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11708-11712; publicación de PCT n.º WO 93/20242, fechada el 14 de octubre de 1993; y Brenner *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5381-5383.

También pueden generarse y explorarse bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Una biblioteca combinatoria de compuestos orgánicos pequeños es una colección de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y se sintetizan por técnicas orgánicas usando procesos multietapas. Las bibliotecas combinatorias incluyen un amplio número de compuestos orgánicos pequeños. Un tipo de biblioteca combinatoria se prepara por medio de métodos de síntesis en paralelo para producir una matriz de compuestos. Una matriz de compuestos puede ser una colección de compuestos identificables por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y dispuestas de modo que cada compuesto tenga un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variables. Los compuestos de dicha matriz de compuestos

se producen en paralelo en recipientes de reacción separados, identificándose y localizándose cada compuesto por su dirección espacial. Se proporcionan ejemplos de mezclas de síntesis en paralelo y métodos de síntesis en paralelo en Estados Unidos n.º de serie 08/177.497, presentado el 5 de enero de 1994 y su solicitud de patente publicada de PCT correspondiente WO95/18972, publicada el 13 de julio de 1995 y patentes de Estados Unidos n.º 5.712.171 concedida el 27 de enero de 1998 y su solicitud de patente publicada de PCT correspondiente WO96/22529.

Tratamiento de la obesidad y trastornos asociados con la obesidad

Se conocen en la técnica varios tratamientos de obesidad bien establecidos que varían de intervención no farmacéutica a farmacéutica. Las intervenciones no farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, restricción dietética, ejercicio, tratamiento psiquiátrico y tratamientos quirúrgicos para reducir el consumo de alimentos (por ejemplo, cirugía bariátrica) o eliminar grasa (por ejemplo, liposucción). Las presentes intervenciones farmacológicas pueden inducir una pérdida de peso de entre 5 y 15 kg. Los supresores del apetito y agentes modificadores de nutrientes o gasto de energía son el principal centro de atención de la intervención farmacológica. Dexfenfluramina (Redux), sibutramina (Meridia), agonistas beta3-adrenérgicos, agentes adrenérgicos simpatomiméticos (tales como anfetaminas (dextroanfetamina)), fentermina, benzfetamina, fendimetrazina, mazindol, dietilpropión, fenilpropanolamina, inhibidores de la recaptación de serotonina (5-HT) (tales como sibutramina), y lipasas gastrointestinales (tales como orlistat) son ejemplos de dichas intervenciones farmacológicas. Véase también, Bays, (2004) Obesity Research 12 (8): 1197-1211, y Klonoff *et al.*, J Diabetes Sci Technol. Sep 2008; 2 (5): 913-8. Sin embargo, si se detiene la medicación, pueden aparecer aumentos de peso renovados. Los tratamientos quirúrgicos son comparativamente exitosos, pero son complicados, caros y tienen riesgos significativos. Los tratamientos quirúrgicos se reservan para pacientes con obesidad extrema y/o con graves complicaciones médicas.

En una realización, se administra Spexina a un sujeto obeso para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. En otra realización, un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un sujeto obeso para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad. En una realización, se administra Spexina a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la pérdida de peso en el sujeto. En otra realización, un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la pérdida de peso en el sujeto. En una realización, se administra Spexina a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la saciedad en el sujeto. En otra realización, se administra un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto obeso o un sujeto aquejado de un trastorno asociado con la obesidad para promover la saciedad en el sujeto.

La Spexina, un polipéptido que comprende SEC ID N° 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un agente de ensayo de la invención (por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, una molécula inorgánica pequeña, un péptido soluble o un anticuerpo) pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, una cantidad que es suficiente para tratar la obesidad o el trastorno asociado con la obesidad, tal como aliviando síntomas asociados con la obesidad o el trastorno asociado con la obesidad (por ejemplo, niveles de leptina elevados, niveles de Spexina reducidos y masa corporal aumentada) evitando o retardando la aparición de obesidad o el trastorno asociado con la obesidad y/o reduciendo también la gravedad o frecuencia de síntomas de obesidad o el trastorno asociado con la obesidad (por ejemplo, niveles de leptina elevados, niveles de Spexina reducidos y masa corporal aumentada).

La cantidad que será terapéuticamente eficaz en el tratamiento de un trastorno o una afección de un individuo particular dependerá de los síntomas y la gravedad de la enfermedad, y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Pueden usarse también ensayos *in vitro* o *in vivo* para identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa para usar en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la obesidad o el trastorno asociado con la obesidad, y debería decidirse según el criterio de un practicante y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*, tal como un ratón *db/db*, un ratón *ob/ob*, o un modelo de ratón alimentado con dieta alta en grasas (por ejemplo el modelo de ratón con obesidad inducida por dieta (DIO)).

La Spexina es una hormona peptídica que tiene actividad biológica en el intestino pero está notablemente infraexpresada por grasa tanto omental como subcutánea en pacientes obesos (véase Ejemplos). En una realización, la Spexina es un factor de saciedad. La Spexina, o una molécula pequeña que actúa a través del mismo sistema de receptor/señalización, puede usarse para inhibir ansias alimentarias y regular el consumo calórico.

Un factor de saciedad es una señal de retroalimentación relacionada con el gasto de energía y el consumo de alimentos. Un factor de saciedad está implicado en la regulación del apetito, el consumo de alimentos, el consumo o gasto de energía, o actúa como una señal de saciedad. El factor de saciedad más estudiado hasta la fecha es la hormona leptina, que se sintetiza y se secreta predominantemente por células grasas. En una realización, la Spexina es un factor de saciedad. En una realización adicional, la Spexina como un factor de saciedad puede usarse para el tratamiento de obesidad. En otra realización, la Spexina puede ser una alternativa y/o un complemento a

tratamientos quirúrgicos para reducir el consumo de alimentos (por ejemplo, cirugía bariátrica) o eliminar grasas (por ejemplo, liposucción).

Tratamiento de otros trastornos del peso corporal

La obesidad es el más prevalente de los trastornos de peso corporal. Otros trastornos de peso corporal, tales como anorexia nerviosa y bulimia nerviosa, también son graves riesgos para la salud. Además, dichos trastornos del peso corporal como anorexia, lipodistrofia y caquexia (debilitamiento) también son características prominentes de otras enfermedades tales como cáncer, fibrosis quística, tuberculosis, insuficiencia cardíaca congestiva y SIDA. Un aspecto de la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno de peso corporal en un sujeto. En una realización, el exceso de la producción de Spexina o Spexina en circulación es responsable de la anorexia nerviosa, u otros trastornos alimentarios. En una realización, el método para diagnosticar un trastorno de peso corporal en un sujeto humano comprende: (a) obtener una muestra biológica de un sujeto y (b) detectar si hay o no una alteración en la expresión del gen de Spexina en el sujeto en comparación con un sujeto no aquejado de un trastorno del peso corporal.

El debilitamiento es un síndrome caracterizado por la pérdida de peso, atrofia muscular, fatiga, debilidad y pérdida significativa de apetito en un sujeto que no intenta activamente perder peso.

La lipodistrofia es una afección médica caracterizada por condiciones anómalas o degenerativas del tejido adiposo del cuerpo. Se caracteriza por una falta de leptina en circulación que puede conducir a osteosclerosis.

La Spexina puede desempeñar un papel en la patogénesis de, o el tratamiento de, lipodistrofia en pacientes infectados por VIH. Por lo tanto, los niveles en suero de Spexina pueden regularse en pacientes VIH+. En una realización, un antagonista de Spexina se administra a un sujeto para tratar la lipodistrofia. En otra realización, un polipéptido dirigido al aminoácido que comprende SEC ID N° 1 (por ejemplo, un anticuerpo de Spexina) se administra a un sujeto para tratar la lipodistrofia. En una realización, un antagonista de Spexina se administra a un sujeto o para promover el aumento de peso en el sujeto. En otra realización, un polipéptido dirigido al aminoácido que comprende SEC ID N° 1 (por ejemplo, un anticuerpo de Spexina) se administra a un sujeto para promover el aumento de peso en el sujeto.

Los síntomas de estos trastornos del peso corporal caracterizados por un fenotipo de peso corporal menor de lo normal (por ejemplo, caquexia o lipodistrofia) pueden aliviarse reduciendo el nivel de expresión del gen de Spexina y/o actividad del producto génico de Spexina. Por ejemplo, pueden utilizarse secuencias génicas de Spexina (por ejemplo, SEC ID N° 2) junto con un método antisentido, de "supresión" génica, de ribozimas y/o de ARNip para reducir el nivel de la expresión génica de Spexina. En una realización, un anticuerpo dirigido a la proteína Spexina puede neutralizar la actividad de Spexina por medio de la unión con la proteína Spexina.

Administración y dosificación

Puede administrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o deposición). Como alternativa, puede administrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina de la invención una vez o dos veces al día a un sujeto que lo necesite durante un periodo de aproximadamente 2 a aproximadamente 28 días, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 días. También puede administrarse una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 veces al año, o una combinación de los mismos. Además, puede coadministrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina con otro producto terapéutico, tal como dexfenfluramina (Redux), sibutramina (Meridia), un agonista beta3-adrenérgico, un agente adrenérgico simpatomimético (tal como anfetaminas (dextroanfetamina)), fentermina, benzfetamina, fendimetrazina, mazindol, dietilpropión, fenilpropanolamina, un inhibidor de la recaptación de serotonina (5-HT) (tal como sibutramina), una lipasa gastrointestinal (tal como orlistat), un factor de saciedad o una combinación de los mismos.

La Spexina o un compuesto modulador de Spexina de la invención pueden administrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar Spexina o un compuesto modulador de Spexina a células del sujeto, tales como células adiposas omentales o células adiposas subcutáneas. Por ejemplo, puede administrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina por métodos adecuados para transfectar células. Se conocen en la técnica métodos de transfección para células eucariotas, e incluyen inyección directa del ácido nucleico al núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia de liposomas o transferencia mediada por materiales lipófilos; suministro de ácidos nucleicos mediado por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación con fosfato cálcico o transfección mediada por vectores virales.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse y administrarse para reducir los síntomas asociados con obesidad o un trastorno asociado con la obesidad por cualquier medio que produzca contacto del principio activo con el sitio de acción del agente en el cuerpo de un sujeto humano o no humano. Pueden administrarse por cualquier medio convencional disponible para su uso junto con productos farmacéuticos, bien como principios activos terapéuticos individuales o en una combinación de principios activos terapéuticos. Pueden administrarse

solos, pero en general se administran con un vehículo farmacéutico seleccionado basándose en la ruta de administración seleccionada y la práctica farmacéutica convencional.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención de una manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse para una diversidad de vías de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Pueden encontrarse técnicas y formulaciones en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa (20ª ed., 2000). Para administración sistémica, es útil una inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse en soluciones líquidas, por ejemplo en tampones fisiológicamente compatibles, tales como PBS, solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones terapéuticas pueden formularse en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan como al menos estériles y sin pirógenos. Estas formulaciones farmacéuticas incluyen formulaciones para su uso humano y veterinario.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender Spexina o un compuesto modulador de Spexina (por ejemplo, de 0,1 a 90 % en peso), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender Spexina o un compuesto modulador de Spexina de la invención que se encapsulan por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles son agua, agua tamponada, solución salina normal, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % o ácido hialurónico.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelados de calcio (como por ejemplo DTPA de calcio, CaNaDTPA-bisamida), u, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden envasarse para su uso en forma líquida, o pueden liofilizarse.

Para composiciones farmacéuticas sólidas de la invención, pueden usarse vehículos farmacéuticamente aceptables sólidos no tóxicos convencionales; por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa o carbonato de magnesio.

Pueden usarse formulaciones sólidas para administración entérica (oral). Pueden formularse como, por ejemplo, píldoras, comprimidos, polvos o cápsulas. Para composiciones sólidas, pueden usarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa o carbonato de magnesio. Para administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como los vehículos previamente enumerados, y en general del 10 % al 95 % de principio activo (por ejemplo, péptido). También puede usarse una formulación no sólida para administración entérica. El vehículo puede seleccionarse de diversos aceites incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen por ejemplo almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, glicerol monoestearato, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol.

Los ácidos nucleicos, péptidos, moléculas pequeñas o polipéptidos de la invención, cuando se administran por vía oral pueden protegerse de la digestión. Esto puede conseguirse bien formando complejo con el ácido nucleico, péptido o polipéptido con una composición para hacerlo resistente a hidrólisis ácida y enzimática o empaquetando el ácido nucleico, péptido o polipéptido en un vehículo resistente de forma apropiada tal como un liposoma. Se conocen bien en la técnica medios para proteger compuestos de la digestión, véase, por ejemplo, Fix, Pharm Res. 13: 1760-1764, 1996; Samanen, J. Pharm. Pharmacol. 48: 119-135, 1996; Patente de Estados Unidos n.º 5.391.377, que describe composiciones de lípidos para suministro oral de agentes terapéuticos (por ejemplo, suministro liposómico). En una realización, puede suministrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina al canal alimentario o el intestino del sujeto mediante administración oral que puede soportar la digestión y degradación.

Para administración oral, las composiciones terapéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o capsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxopropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones,

jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga);

vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampones, agentes saporíferos, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Pueden formularse convenientemente preparaciones para administración oral para proporcionar liberación controlada del agente activo. Para administración bucal las composiciones terapéuticas pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formulados de una manera convencional. Para administración por inhalación, las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador o que contienen una mezcla de polvo de los agentes terapéuticos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Puede suministrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88: 507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983); véase también Levy *et al.*, Science 228: 190 (1985); During *et al.*, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). En otra realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionado anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se realizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

Las composiciones terapéuticas pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua. Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos estéril, antes de su uso.

Las vías de administración entéricas adecuadas para los presentes métodos incluyen suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenterales adecuadas incluyen administración intravascular (por ejemplo inyección de embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección de embolada intraarterial, infusión intraarterial e instilación de catéter en la vasculatura); inyección peri- e intratistular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intrarretiniana o inyección subretiniana); inyección o deposición subcutánea incluyendo infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa al tejido de interés, por ejemplo por un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un sedimento retiniano o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Por ejemplo, puede administrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina de la invención por inyección, infusión o suministro oral.

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones terapéuticas también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera para permear. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser a través de pulverizaciones nasales o usando supositorios. Para administración tópica, las composiciones de la invención se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conocen en general en la técnica. Puede usarse una solución de lavado localmente para tratar una lesión o

inflamación para acelerar la curación. Para administración oral, las composiciones terapéuticas se formulan en formas de administración orales convencionales tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

Una composición de la presente invención también puede formularse como una formulación de liberación sostenida y/o temporizada. Dichas formulaciones de liberación sostenida y/o temporizada pueden realizarse por medios de liberación sostenidos o dispositivos de suministro que se conocen bien por los expertos habituales en la materia, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 4.710.384; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; y 5.733.566. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para proporcionar liberación lenta o sostenida de uno o más de los principios activos usando, por ejemplo, hidropropilmetil celulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas o similares, o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en diversas proporciones. Pueden seleccionarse fácilmente formulaciones de liberación sostenida adecuadas conocidas por los expertos habituales en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, para su uso con las composiciones farmacéuticas de la invención. Están abarcadas por la presente invención formas de dosificación unitarias individuales para administración oral, tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, comprimidos encapsulados o polvos, que se adaptan para liberación sostenida.

En los presentes métodos, puede administrarse Spexina o un compuesto modulador de Spexina al sujeto bien como ARN, junto con un reactivo de suministro, o bien como un ácido nucleico (por ejemplo, un vector vírico o plásmido recombinante) que comprende secuencias que expresan el producto génico. Los reactivos de suministro adecuados para administración de Spexina o un compuesto modulador de Spexina incluyen el reactivo lipófilo TKO Mirus Transit; lipofectina; lipofectamina; cellfectin; o policationes (por ejemplo, polilisina), o liposomas.

La dosificación administrada puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición suficiente para dar como resultado alivio de síntomas de obesidad o un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto, y puede variar dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del principio activo y su modo y vía de administración; tiempo de administración del principio activo; edad, sexo, salud y peso del receptor; naturaleza y alcance de los síntomas; tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado; y velocidad de excreción.

En una realización, se administra Spexina a una dosis para conseguir una concentración en plasma de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml en pacientes obesos o pacientes aquejados de un trastorno asociado con la obesidad. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la Spexina administrada es de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 2 ng/ml, al menos aproximadamente 3 ng/ml, al menos aproximadamente 4 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 7,5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 15 ng/ml, al menos aproximadamente 20 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 30 ng/ml, al menos aproximadamente 35 ng/ml, al menos aproximadamente 40 ng/ml, al menos aproximadamente 45 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 60 ng/ml, al menos aproximadamente 70 ng/ml, al menos aproximadamente 80 ng/ml, al menos aproximadamente 90 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 125 ng/ml, al menos aproximadamente 150 ng/ml, al menos aproximadamente 175 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 250 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 350 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 450 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, al menos aproximadamente 600 ng/ml, al menos aproximadamente 700 ng/ml, al menos aproximadamente 800 ng/ml, al menos aproximadamente 900 ng/ml, al menos aproximadamente 1000 ng/ml, al menos aproximadamente 1250 ng/ml, al menos aproximadamente 1500 ng/ml, al menos aproximadamente 1750 ng/ml, al menos aproximadamente 2000 ng/ml, al menos aproximadamente 2500 ng/ml, al menos aproximadamente 2750 ng/ml, al menos aproximadamente 3000 ng/ml, al menos aproximadamente 3500 ng/ml, al menos aproximadamente 3750 ng/ml, al menos aproximadamente 5000 ng/ml, al menos aproximadamente 7500 ng/ml, o al menos aproximadamente 10.000 ng/ml. En una realización, se administra Spexina a una dosis de 0,2 ml de Spexina al día (2500 ng/ml). En otra realización, se administra Spexina por inyección intraperitoneal diaria (IP).

En otras realizaciones, la cantidad eficaz de compuesto modulador de Spexina administrado es al menos aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,025 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,05 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,075 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,25 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,5 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,75 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 25 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 75 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 150 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 300 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, al menos

aproximadamente 400 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 450 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 550 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 600 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 650 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 700 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 800 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 850 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 900 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 950 µg/kg de peso corporal, o al menos aproximadamente 1000 µg/kg de peso corporal. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto modulador de Spexina administrado es de al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal.

En una realización, se administra Spexina o un compuesto modulador de Spexina al menos una vez al día. En otra realización, se administra Spexina o un compuesto modulador de Spexina al menos dos veces al día. En algunas realizaciones, se administra Spexina o un compuesto modulador de Spexina durante al menos 1 semana, durante al menos 2 semanas, durante al menos 3 semanas, durante al menos 4 semanas, durante al menos 5 semanas, durante al menos 6 semanas, durante al menos 8 semanas, durante al menos 10 semanas o durante al menos 12 semanas. En realizaciones adicionales, se administra Spexina y/o un compuesto modulador de Spexina en combinación con un segundo agente terapéutico.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Son útiles agentes terapéuticos que muestran grandes índices terapéuticos. Pueden usarse composiciones terapéuticas que muestran algunos efectos secundarios tóxicos.

Una dosis terapéuticamente eficaz de Spexina o un compuesto modulador de Spexina puede depender de varios factores conocidos por los expertos habituales en la materia. La dosis o las dosis de Spexina o un compuesto modulador de Spexina pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la identidad, la talla y la condición del sujeto o la muestra que se trate, dependiendo adicionalmente de la vía por la que se administre la composición, si es aplicable, y el efecto que el practicante desea que la Spexina o un compuesto modulador de Spexina tengan sobre el ácido nucleico o polipéptido de la invención. Estas cantidades pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia.

Terapia génica y métodos de reemplazo de proteínas

La invención proporciona métodos para tratar la obesidad o un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto. En una realización, el método puede comprender administrar al sujeto Spexina o un compuesto modulador de Spexina, que puede ser un polipéptido, molécula pequeña, anticuerpo o un ácido nucleico.

Pueden llevarse a cabo diversos enfoques para restaurar la actividad o función de genes de identificación de obesidad (OS) (por ejemplo, Spexina) en un sujeto, tal como los que portan un locus de gen de Spexina alterado. Por ejemplo, el aporte de función de Spexina de tipo silvestre a dichos sujetos puede suprimir la expresión fenotípica de obesidad o un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto. Puede conseguirse aumento de los niveles de expresión o la actividad de Spexina mediante terapia génica o proteica.

Puede introducirse un ácido nucleico que codifica un gen OS, o una parte funcional del mismo (tal como Spexina) en las células de un sujeto. Por ejemplo, también puede introducirse el gen de Spexina de tipo silvestre (o una parte funcional del mismo) en las células del sujeto que lo necesite usando un vector como se describe en el presente documento. El vector puede ser un vector viral o un plásmido. El gen también puede introducirse como ADN desnudo. El gen puede proporcionarse para que se integre en el genoma de las células hospedadoras receptoras, o para permanecer extracromosómico. La integración puede producirse aleatoriamente o en sitios definidos con precisión, tal como mediante recombinación homóloga. Por ejemplo, puede insertarse una copia funcional del gen de Spexina en reemplazo de una versión alterada en una célula, mediante recombinación homóloga. Las técnicas adicionales incluyen pistola génica, transfección mediada por liposoma o transfección mediada por lípido catiónico. Puede conseguirse terapia génica por inyección génica directa o administrando células modificadas genéticamente preparadas *ex vivo* que expresen un polipéptido funcional.

Puede efectuarse suministro de ácidos nucleicos a células viables *ex vivo*, *in situ* o *in vivo* mediante el uso de vectores, y más específicamente vectores virales, (por ejemplo, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado, o un retrovirus), o *ex vivo* mediante el uso de métodos de transferencia de ADN físicos (por ejemplo, liposomas o tratamientos químicos). Las técnicas no limitantes adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, y el método de precipitación con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, Anderson, Nature, suplemento del vol. 392, n.º 6679, pp. 25-20 (1998)). También puede conseguirse introducción de un ácido nucleico o un gen que codifica un polipéptido de la invención con sustratos extracromosómicos (expresión transitoria) o cromosomas artificiales (expresión estable). Las células también pueden cultivarse *ex vivo* en presencia de composiciones terapéuticas de la

presente invención para proliferar o para producir un efecto deseado en o actividad en dichas células. Pueden introducirse después células tratadas *in vivo* para fines terapéuticos.

Pueden insertarse ácidos nucleicos en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Se han usado varios virus como vectores de transferencia génica, incluyendo papovavirus, por ejemplo, SV40 (Madzak *et al.*, 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner *et al.*, 1988; Gorziglia y Kapikian, 1992; Quantin *et al.*, 1992; Rosenfeld *et al.*, 1992; Wilkinson *et al.*, 1992; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990), virus *vaccinia* (Moss, 1992), virus adenoasociados (Muzyczka, 1992; Ohi *et al.*, 1990), herpesvirus incluyendo VHS y VEB (Margolskee, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Fink *et al.*, 1992; Breakfield y Geller, 1987; Freese *et al.*, 1990), y retrovirus de origen aviar (Biandyopadhyay y Temin, 1984; Petropoulos *et al.*, 1992), murino (Miller, 1992; Miller *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1984; Mann y Baltimore, 1985; Miller *et al.*, 1988), y humano (Shimada *et al.*, 1991; Helseth *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1990; Buchschacher y Panganiban, 1992). Los ejemplos no limitantes de técnicas de transferencia génica *in vivo* incluyen transfección con vectores virales (por ejemplo, retrovirales) (véase Patente de Estados Unidos n.º 5.252.479) y transfección mediada por liposoma-proteína de cubierta viral (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology 11: 205-210 (1993), incorporada completamente por referencia). Por ejemplo, se conocen en general en la técnica vacunas de ADN desnudo; véase Brower, Nature Biotechnology, 16: 1304-1305 (1998), que se incorpora por referencia en su totalidad. Pueden suministrarse vectores de terapia génica a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen, *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye el vehículo de suministro génico. Como alternativa, cuando el vector de suministro génico completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro génico.

Para revisiones de protocolos de terapia génica y métodos véase Anderson *et al.*, Science 256:808-813 (1992); patentes de Estados Unidos n.º 5.252.479, 5.747.469, 6.017.524, 6.143.290, 6.410.010, 6.511.847; y publicaciones de solicitud de Estados Unidos n.º 2002/0077313 y 2002/00069. Para revisiones adicionales de la tecnología de terapia génica, véase Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); Miller, Nature, 357: 455-460 (1992); Kikuchi *et al.*, J Dermatol Sci. May 2008; 50 (2): 87-98; Isaka *et al.*, Expert Opin Drug Deliv. Sep 2007; 4 (5): 561-71; Jager *et al.*, Curr Gene Ther. Ago 2007; 7 (4):272-83; Waehler *et al.*, Nat Rev Genet. Ago 2007; 8 (8): 573-87; Jensen *et al.*, Ann Med. 2007; 39 (2):108-15; Herweijer *et al.*, Gene Ther. Ene 2007; 14 (2): 99-107; Eliyahu *et al.*, Molecules, 31 Ene 2005; 10 (1): 34-64; y Altaras *et al.*, Adv Biochem Eng Biotechnol. 2005; 99: 193-260.

La terapia de reemplazo de proteínas puede aumentar la cantidad de proteína introduciendo de forma exógena proteína de tipo silvestre o biológicamente funcional por medio de infusión. Puede sintetizarse un polipéptido de reemplazo de acuerdo con técnicas químicas conocidas o puede producirse y purificarse mediante técnicas de biología molecular conocidas. Se ha desarrollado terapia de reemplazo de proteínas para diversos trastornos. Por ejemplo, una proteína de tipo silvestre puede purificarse a partir de un sistema de expresión celular recombinante (por ejemplo, células de mamífero o células de insecto, véase patente de Estados Unidos n.º 5.580.757 de Desnick *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 6.395.884 y 6.458.574 de Selden *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 6.461.609 de Calhoun *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 6.210.666 de Miyamura *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 6.083.725 de Selden *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 6.451.600 de Rasmussen *et al.*; patente de Estados Unidos n.º 5.236.838 de Rasmussen *et al.* y patente de Estados Unidos n.º 5.879.680 de Ginns *et al.*), placenta humana o leche animal (véase patente de Estados Unidos n.º 6.188.045 de Reuser *et al.*), u otras fuentes conocidas en la técnica. Después de la infusión, la proteína exógena puede captarse por tejidos mediante un mecanismo no específico o mediado por receptor.

Estos métodos descritos en el presente documento no son de ningún modo completamente incluyentes, y se entienden métodos adicionales para ajustarse a la aplicación específica por el experto en la materia. Además, la cantidad eficaz de las composiciones puede aproximarse adicionalmente mediante analogía con compuestos que se sabe que ejercen el efecto deseado.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se describen posteriormente métodos y materiales ejemplares, aunque también pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención.

Ejemplos

Se proporcionan ejemplos en el presente documento para facilitar un entendimiento más completo de la invención. Los siguientes ejemplos ilustran los modos ejemplares de realización y práctica de la invención. Sin embargo, el alcance de la invención no se limita a realizaciones específicas desveladas en estos ejemplos, que son solamente para fines de ilustración, ya que pueden utilizarse métodos alternativos para obtener unos resultados similares.

Ejemplo 1. IDENTIFICACIÓN DE SPEXINA COMO UN FACTOR DE SACIEDAD POTENCIAL QUE ESTÁ APROXIMADAMENTE 15 VECES MENOS REPRESENTADO EN GRASA OMENTAL Y SUBCUTÁNEA EN PACIENTES OBESOS

Se ensayan los modelos humano y de ratón de obesidad con respecto a los niveles en suero de Spexina mediante radioinmunoensayo (RIA) para ver si los niveles de Spexina en circulación se correlacionan con niveles de expresión de depósito tisular. Además, se llevan a cabo transferencias de western de tejidos humanos para medir los niveles de expresión y para determinar los pesos moleculares de péptidos expresados. La secuencia genómica y el ARNm expresado de Spexina de fuentes humanas (tanto obesas como normales) se caracteriza para ver si variantes de secuencia (por ejemplo, SNP, inserciones, deleciones, etc.) explican la expresión diferencial de Spexina, o si existen variantes de corte y empalme de Spexina, que no se reconocen por la sonda en las matrices Codelink usadas en estos estudios.

Usando análisis de micromatrices de genoma completo de muestras de grasa humanas de dos depósitos diferentes, se compararon los niveles de expresión génica entre pacientes obesos frente a de peso normal (Figura 1). Se han identificado varios miles de genes que se expresan diferencialmente de forma significativa entre los dos grupos ($p < 0,05$, sin corrección para múltiples ensayos). De todos estos, el gen con la mayor infraexpresión (factor de cambio de 14,9) en grasa de sujetos obesos fue Spexina (nor = 24,95 frente a obeso = 1,68; $p = 0,0292$; "Péptido A" en la Figura 9), una hormona peptídica secretada recientemente identificada que induce contracciones estomacales en un ensayo de explante del intestino

Ya que la Spexina está significativamente infrarrepresentada por grasa tanto omental como subcutánea en pacientes obesos, y tiene actividad biológica en el intestino, sin quedar ligado a la teoría, es un factor expresado por tejidos de grasa normales para indicar la saciedad. Sin quedar ligado a la teoría, la falta casi completa de expresión de Spexina en grasa de sujetos obesos puede contribuir a la pérdida de un bucle de retroalimentación que normalmente inhibe el consumo de alimentos y el almacenamiento de energía/lípidos, lo que conduce a obesidad.

Sin quedar ligado a la teoría, la Spexina se expresa por adipocitos en condiciones normales, para indicar un estado saciado, o de energía saturada. Por tanto, en condiciones normales, esta señalización tendría un efecto amortiguador en el comportamiento de búsqueda de energía.

Materiales y métodos

Pacientes. La población de estudio consistió en 11 pacientes que se sometían a procedimientos quirúrgicos laparoscópicos abdominales clínicamente indicados, que consintieron la retirada de una muestra de grasa omental durante la cirugía para estudios de transporte de LCFA y una muestra de sangre venosa para la medición de los niveles en plasma de insulina y leptina. Siete de los pacientes (todas mujeres) eran obesos, y se estaban sometiendo a procedimientos quirúrgicos bariátricos en relación con su obesidad. Los otros cuatro pacientes (todas mujeres) no eran obesos, y se estaban sometiendo a una diversidad de procedimientos laparoscópicos clínicamente indicados adicionales.

Estudios de expresión génica

Recogida de tejidos: se recogieron muestras de grasa en el momento de la cirugía bariátrica. Solamente se colocaron de uno a dos gramos de tejido en RNAlater a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

Aislamiento de ARN total: se descongelaron las muestras de grasa, después se homogeneizaron en 5 ml de TRIzol (Invitrogen). Después de la separación de fase convencional y de aislamiento de ARN, el sedimento se resuspendió en agua, tampón de lisis RLT y etanol para limpieza de ARN y tratamiento con DNasa en columna (Qiagen). El ARN eluido tenía uniformemente relaciones de A260/A280 $> 2,0$. La integridad del ARN total se verificó por la presencia de picos 18S y 28S robustos en el electroferograma BioAnalyzer.

Marcaje e hibridación de diana de micromatrices: ARNc marcados con biotina por procedimientos establecidos. Brevemente, se usaron 2 μg de ARN total para sintetizar ADNc bc. Este se incubó con 11-UTP marcado con biotina en una reacción de transcripción *in vitro*. Se purificó ARNc por columnas RNeasy (Qiagen), y se cuantificó por espectrometría UV a 260 nm. La distribución de tamaños del ARNc marcado con biotina se verificó en un Bioanalyzer (Agilent). Se hibridaron 10 μg de ARNc fragmentado durante una noche en micromatrices 10K humanas CodeLink. Se detectaron ARNc hibridados por estreptavidina- Cy 5 fluor (GE Healthcare).

Análisis de datos: se realizó detección de puntos con el explorador GenePix Serie B (Axon Instruments) y se realizó cuantificación de puntos usando análisis de expresión CodeLink™ v5.0. Se describen parámetros de cuantificación claves brevemente en el presente documento. Se lleva a cabo resta de fondo local en las intensidades de puntos individuales, seguido de una clasificación de cada matriz individualmente basándose en la intensidad de matrices general. Después de normalización con respecto a la mediana, los conjuntos de datos individuales se cargaron en el paquete de análisis de datos de micromatrices GeneSifter para análisis posterior.

Resultados

Identificación de Ch12; orf39 (Spexina) como significativamente infraexpresados en grasa de sujetos obesos. El punto de datos de tenomodulina se identifica para validar el conjunto de datos, ya que se presentó recientemente que este gen estaba sobreexpresado en muestras de grasa de sujetos obesos (Figura 1; Tolppanen, 2007; Saki, 2009). Otro biomarcador es quitinasa, que indica activación de macrófagos, lo que refleja un estado inflamatorio que se conoce bien en la obesidad (Figura 1). Tanto Spexina como anhidrasa carbónica III están significativamente sobreexpresadas en grasa normal en comparación con grasa de sujetos obesos (Figura 1).

Ch12;orfS9 es un péptido recién identificado con actividad GI (Mirabeau, 2007; Rucinski, 2010), y un factor de saciedad potencial que está infraexpresado en grasa de sujetos obesos (Figura 1).

La Tabla 1 a continuación representa datos de expresión de ARNm para Spexina.

Tabla 1. Datos de expresión de ARNm de Spexina, muestra a muestra						
Grupo	Condición	N	Media	ETM	ETM/Media	
1	obeso	12	1,6869	+/-0,4284	25,4 %	
2	normal	8	24,9532	+/-5,2260	20,9 %	

• Por diana

Grupo	Muestra	Expresión normalizada con respecto a la mediana
Obeso	Subcu	2,1212
Obeso	Subcu	5,5443
Obeso	Subcu	1,8812
Obeso	Subcu	1,2796
Obeso	Omental	0,4901
Obeso	Subcu	1,5738
Obeso	Omental	0,2394
Obeso	Omental	2,6547
Obeso	Omental	2,6115
Obeso	Omental	0,6285
Obeso	Omental	0,3092
Obeso	Omental	0,9090
normal	Subcu -1-	22,1529
normal	Subcu -2-	45,3350
normal	Subcu -3-	16,7751
normal	Subcu -4-	29,0327
normal	Omental -1-	19,6793
normal	Omental -2-	8,5981
normal	Omental -3-	10,3961
normal	Omental -4-	47,6567

De todos los genes que están infraexpresados en grasa de sujetos obesos, la Spexina demuestra el mayor factor de cambio entre muestras de sujetos obesos (1,687) y normales (24,95) ($p < 0,00292$) (Figura 2, Tabla 2).

Tabla 2. Datos de expresión de ARNm de Spexina, muestra a muestra (valores normalizados con respecto a la mediana para cada muestra clasificada por grupo [obesos frente a normales]). Análisis estadístico por ensayo de T de dos colas, suponiendo una varianza desigual en los dos conjuntos de muestras ($p = 0,00292$).

Obeso	Normal
2,1212	22,1529
5,5443	42,335
1,8812	16,7751
1,2796	29,0327
0,4901	19,6793
1,5738	8,5981

Obeso	Normal
0,2394	10,3961
2,6547	47,6567
2,6115	
0,6285	
0,3092	
0,909	
1,686875	24,95324

La Spexina es un péptido recién identificado con actividad GI. Mirabeau *et al.* (2007) fue el primer informe que describía Spexina, y usaron análisis de modelización de Markov basándose en características comunes con las hormonas peptídicas, para encontrar nuevas en secuencias del proteoma humano. Una de las hormonas que identificaron fue la Spexina, que demostró actividad contráctil en un ensayo de explante de estómago de rata, lo que indica una actividad biológica. La Spexina se secreta. Wan *et al.* (2010) describieron secreción sensible a brefeldina A (BFA) de Spexina de células transfectadas, lo que indica un mecanismo dependiente del Golgi, y que presenta un papel en la función biológica de la placenta. La Spexina está conservada entre diversas especies como se indica en el alineamiento de múltiples secuencias de homólogos de Spexina mostrado en la Figura 3.

Referencias

1: Mirabeau O, Perlas E, Severini C, Audero E, Gascuel O, Possenti R, Birney E, Rosenthal N, Gross C. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. *Genome Res.* Mar 2007; 17 (3):320-7. Epub 6 Feb 2007

2: Rucinski M, Porzionato A, Ziolkowska A, Szyszka M, Macchi V, De Caro R, Malendowicz LK. Expression of the spexin gene in the rat adrenal gland and evidences indicating that spexin inhibits adrenocortical cell proliferation. *Peptides.* 4 Ene 2010.

3: Saiki A, Olsson M, Jernas M, Gummesson A, McTernan PG, Andersson J, Jacobson P, Sjöholm K, Olsson B, Yamamura S, Walley A, Froguel P, Carlsson B, Sjöström L, Svensson PA, Carlsson LM. Tenomodulin is highly expressed in adipose tissue, increased in obesity, and down-regulated during diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 2009; 94 (10): 3987-94.

4: Tolppanen AM, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Schwab U, Lindström J, Tuomilehto J, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Tenomodulin is associated with obesity and diabetes risk: the Finnish diabetes prevention study. *Obesity (Silver Spring).* May 2007; 15 (5): 1082-8.

Ejemplo 2 – EXPRESIÓN DE SPEXINA EN MUESTRAS DE SUERO DE SUJETOS OBESOS Y NORMALES

El ejemplo 1 analiza la infraexpresión significativa de Spexina en muestras de grasa omental y subcutánea de pacientes obesos. Por lo tanto, se decidió ensayar Spexina en muestras de suero de pacientes con peso normal y obesos, para ver si las diferencias en la expresión génica en grasa de sujetos obesos daba como resultado diferencias significativas en los niveles de Spexina en circulación. También se midieron los niveles de leptina ya que se sabe que la leptina es una adipocina en circulación que está elevada en el estado obeso. Sin quedar ligado a la teoría, la Spexina y Leptina en circulación pueden ser hormonas/adipocinas “antagonistas” que están implicadas en la regulación de la saciedad, el consumo de alimentos y el peso corporal.

Muestras de suero: se ensayaron muestras de suero de 7 pacientes humanos mujeres de peso normal y 7 obesas en estos estudios iniciales.

Ensayo de Spexina: se ensayaron los niveles de Spexina en circulación en suero usando el kit de EIA de Spexina / NPQ (humano, de ratón, bovino) de Phoenix Pharmaceuticals, Inc, n.º de catálogo EK-023-81, Lote n.º 601716. Este kit mide lo que se cree que es el péptido bioactivo, procesado:

Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-NH₂ (SEC ID N° 3)

No se ha confirmado la naturaleza (secuencia primaria y estructura) de Spexina en circulación en suero humano, ni se ha presentado en ninguna bibliografía hasta la fecha. El ensayo usado se ha diseñado para detectar el péptido SEC ID N° 3.

El intervalo de detección de Spexina en circulación es de 0-100 ng/ml. Ya que este EIA es un ensayo de competición, la densidad óptica medida (DO) a 450 nm es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno libre en la muestra (véase Figura 4).

Con el descubrimiento de infraexpresión significativa de Spexina en muestras de grasa omental y subcutánea de pacientes obesos (véase Figura 5), las concentraciones de Spexina se ensayaron en muestras de suero de pacientes de peso normal y obesos para ver si la expresión génica reducida en grasa de sujetos obesos daba como resultado diferencias significativas en los niveles de Spexina en circulación. La Spexina en circulación tiene una concentración aproximadamente 1/10 menor en suero de sujetos obesos, lo que está razonablemente de acuerdo con la diferencia de 15 veces en la expresión génica de Spexina indicada anteriormente (Figura 5).

Se sabe que la leptina está elevada en el estado obeso. Sin desear quedar ligado a la teoría, la Spexina y Leptina en circulación pueden ser hormonas/adipocinas "antagonistas" o de contrapeso que están implicadas en la regulación de la saciedad, el consumo de alimentos y el peso corporal. La magnitud de la diferencia presentada en la Figura 6 (0,69/0,15 = aumento de 4,6 veces en leptina en circulación en suero de sujetos obesos) es equivalente a la indicada en Considine, *et al.* (1996), en la que la magnitud de aumento en leptina en circulación en pacientes obesos fue de 4,17 veces usando un RIA de nuevo desarrollo. Considine, *et al.* ensayaron leptina humana en circulación en hombres y mujeres de peso normal frente a obesos (n= 139 hombres y mujeres) (n= 136). Los niveles medios (+/- DT) de leptina fueron de 31,3 +/- 24,1 ng/ml en pacientes obesos, y 7,5 +/- 9,3 ng/ml en pacientes de peso normal. Los niveles de leptina en circulación son significativamente mayores en pacientes obesos (Figura 10).

La correlación negativa fuerte ($r = -0,9444$) entre leptina y Spexina en el suero de pacientes obesos y controles de peso normal apoya la idea de que estos dos péptidos desempeñan papeles antagonistas en la regulación normal del hambre, la saciedad, el peso corporal y la adiposidad (Figura 7). Sin quedar ligado a la teoría, cada hormona puede actuar como parte de un bucle de retroalimentación negativo, en el que un aumento en una conduce a una reducción de la otra (y viceversa). En ausencia de Spexina en circulación, la leptina se sobreexpresa en la grasa, y se sobreproduce en el suero. Por lo tanto, cuando la Spexina está infraexpresada en grasa, lo que conduce a una reducción significativa de Spexina en circulación, la leptina está sobreexpresada en la grasa de pacientes obesos, dando como resultado niveles patofisiológicos de leptina en suero.

El cálculo de las relaciones de valores correlacionados negativamente puede aumentar las diferencias en la expresión génica entre grupos, y actuar como marcadores de diagnóstico sensibles y fiables (Gordon *et al.*, 2002, 2003) para distinguir grupos. Se presenta una extensión de esta idea en la Figura 8, en la que relaciones de expresión de proteínas confirman las clasificaciones basándose en IMC. Aunque puede parecer que esto no añade ninguna información nueva en este momento, puede ser posible en el futuro, una vez que se analicen más muestras, distinguir subclases (síndrome metabólico, prediabético, obeso mórbido, hiperlipidémico, etc.) de pacientes en cada grupo con este algoritmo.

Referencias:

- 1: Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, *et al.* Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1 Feb 1996; 334 (5): 292-5.
- 2: Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, Gullans SR, Blumenstock JE, Richards WG, Jaklitsch MT, Sugarbaker DJ, Bueno R. Using gene expression ratios to predict outcome among patients with mesothelioma. *J Natl Cancer Inst.* 16 Abr 2003; 95 (8): 598-605. PubMed PMID: 12697852.
- 3: Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, Gullans SR, Blumenstock JE, Ramaswamy S, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res.* 1 Sep 2002; 62 (17): 4963-7.

Ejemplo 3 – INFUSIÓN DE SPEXINA PARA DETERMINAR EL PAPEL DE SPEXINA EN LA SACIEDAD

Experimentos de determinación de dosis inicial. Se ensayarán ratones con dieta alta en grasas tanto obesos como de peso normal con respecto a los niveles en circulación de leptina, insulina y Spexina. El nivel de Spexina en suero humano es de aproximadamente 10 ng/ml en sujetos normales (por ejemplo, sujetos no obesos), por lo tanto se ensayarán las siguientes cuatro dosis en los estudios iniciales: aproximadamente 3 ng, aproximadamente 10 ng, aproximadamente 30 ng, aproximadamente 100 ng, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 10 µg y aproximadamente 100 µg.

Se ha sintetizado Spexina de uso farmacéutico (un péptido de 14 aminoácidos normalmente en circulación en ratones y seres humanos) por química de estado sólido convencional, y se ha purificado hasta >95 % de identidad por Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA). Este agente se solubilizará en solución salina estéril 1X (pH 7,4) a cuatro concentraciones diferentes, de modo que pueden administrarse dosis de 1,5 µg/kg/QD, 5 µg/kg/QD, 15 µg/kg/QD o 50 µg/kg/QD a 5 ratones en cada grupo de dosis. Se suministrarán dosis totales finales de

3 µg/kg/día, 10 µg/kg/día, 30 µg/kg/día, 100 µg/kg/día o 250 µg/kg/día en volúmenes de 0,2 ml/dosis/día mediante inyecciones IP. Por ejemplo, para suministrar 10 µg totales por día, se administrarán dos inyecciones diarias de 5 µg cada una IP (las concentraciones de reserva de Spexina serán de 25 µg/ml). Como alternativa, para suministrar 10 µg por día, también puede administrarse una inyección diaria de 10 µg IP (las concentraciones de reserva de Spexina serán de 50 µg/ml). En un ejemplo adicional, para suministrar 50 µg por día, también puede administrarse una inyección diaria de 50 µg IP (las concentraciones de reserva de Spexina serán de 2500 µg/ml).

Como alternativa, se administrarán cinco dosis de Spexina (3 ng, 10 ng, 30 ng, 100 ng y 500 ng) durante 30 días mediante infusiones de mini bomba osmótica (véase Fan *et al*, J Nutr. Sep 2003; 133 (9): 2707-15). Las dosis se seleccionarán para variar en torno a las calculadas para imitar las contracciones de Spexina vistas en animales de peso normal. Se extraerán muestras de sangre semanalmente a través de la vena de la cola para confirmar los niveles en circulación de Spexina, leptina e insulina. También se supervisarán y registrarán diariamente los pesos corporales, la dieta y el consumo de agua.

Administración de dosis eficaz de Spexina en diversos modelos murinos de obesidad

Una vez que se ha identificado una dosis segura y eficaz de Spexina, esta se usará para ensayar los efectos de Spexina en varios modelos murinos de obesidad bien conocidos.

Las cepas de ratón para usar incluyen: (1) fondo de C57BL/6J como controles; (2) ratones DIO (obesidad inducida por dieta), también conocidos como ratones alimentados con dieta alta en grasas; (3) ob/ob; (4) ob/ob tratados con leptina como un control positivo; (5) db/db (ratón diabético); (5) gordo; y (6) rechoncho.

Se extraerán muestras de sangre semanalmente para confirmar los niveles en circulación de Spexina, leptina e insulina. Se supervisarán y registrarán diariamente los pesos corporales, la dieta y el consumo de agua.

Se iniciarán ajustes de dosis de Spexina (si es necesario para una cepa o un modelo específico) en nuevos conjuntos de animales.

Al final del experimento, se recogerán almohadillas adiposas de corazón, hígado y epidídimo para captación de ácidos grasos, qRT-PCR y análisis de transferencia de western de transportadores de ácidos grasos y enzimas clave de la ruta de fosforilación oxidativa.

Ejemplo 4 – LA EXPRESIÓN DE LEPTINA ESTÁ REGULADA POSITIVAMENTE DE FORMA SELECTIVA EN GRASA OMENTAL DE SUJETOS OBESOS

Introducción: la leptina es una adipocina que se expresa en diversos depósitos de grasas. Aunque estudios anteriores han indicado que la expresión de leptina varía entre tejidos omentales, subcutáneos y mesentéricos, hay pocos datos que comparen la expresión de leptina en diferentes depósitos tisulares entre pacientes obesos y normales.

Métodos: se recogieron muestras quirúrgicas y se almacenaron a -80 °C en RNAlater. Se recogieron ARN totales de depósitos de grasa omental (7 obesos, 4 controles) y subcutánea (5 obesos, 4 controles) de los mismos pacientes. Se generaron ARNc usando protocolos convencionales, y se hibridaron durante una noche con micromatrices de genoma completo humano Codelink. Se analizaron los datos de expresión normalizados con respecto a la mediana (unidades de expresión arbitraria) por el paquete de datos GeneSifter. Los resultados se presentan como media +/- ETM.

Resultados: la expresión de leptina total no fue significativamente mayor en grasa de sujetos obesos frente a normales (90,7 +/- 15,1 frente a 77,7 +/- 24,9). Hay una gran diferencia en la expresión de leptina entre grasa omental y subcutánea normal (130,5 +/- 30,8 frente a 24,9 +/- 8,6), mientras que en muestras de sujetos obesos, la diferencia en la expresión de leptina entre los depósitos fue menos pronunciada (118,4 +/- 30,0 frente a 71,0 +/- 11,6; sub cu frente a omental). La expresión de leptina no cambia entre obesos y normales en el depósito subcutáneo (130,5 +/- 30,8 frente a 118,4 +/- 30,0). Sin embargo, se vio un aumento drástico en la expresión de leptina en las muestras de grasa omental de sujetos obesos frente a normales (71,0 +/- 11,6 frente a 24,9 +/- 8,6).

Conclusiones: el estado obeso altera la expresión de leptina en el depósito omental, mientras que la expresión no tiene cambios en grasa subcutánea de los mismos pacientes.

Ejemplo 5 – LA ACUMULACIÓN DE ADIPOCITOS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA EN LA OBESIDAD ES MULTIFACTORIAL, RESULTANDO DE CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS AUMENTADA Y ACTIVIDAD REDUCIDA DE GENES IMPLICADOS EN LA UTILIZACIÓN DE GRASAS

Visión de conjunto. La epidemia de obesidad provoca una morbilidad y mortalidad significativas. El conocimiento de la función celular y la expresión génica en tejido adiposo de sujetos obesos proporcionará información acerca de la

patogénesis de la obesidad e indicará dianas terapéuticas. Este ejemplo se dirige a estudiar los procesos que determinan la acumulación de grasa en el tejido adiposo de pacientes obesos.

Brevemente, se recogió grasa omental de dos cohortes de pacientes con cirugía bariátrica obesos y donantes de peso normal del mismo sexo. Se compararon los adipocitos aislados con respecto al tamaño celular, el volumen y la captación de ácidos grasos de cadena larga (LCFA). Se exploraron ARN de grasa omental por micromatriz 10K (cohorte 1: 3 obesos, 3 normales) o micromatriz de genoma completo (cohorte 2: 7 obesos, 4 normales). Se identificaron diferencias estadísticas en la expresión génica y de ruta en la cohorte 1 usando software GeneSifter (Geospiza) con los resultados clave confirmados en muestras de la cohorte 2 por micromatriz, qRT-PCR y análisis de ruta.

Los adipocitos omentales obesos tenían área de superficie, volumen y $V_{\text{máx}}$ aumentados para captación de LCFA saturable. La dodecenil-coenzima A delta isomerasa (DCI), central para el metabolismo de LCFA, estaba aproximadamente 1,6 veces menos expresada en grasa de sujetos obesos en las cohortes 1 y 2. Adicionalmente, el análisis de ruta de la enciclopedia de genes y genómica de Kioto (KEGG) identificó las rutas de fosforilación oxidativa y metabolismo de ácidos grasos como con regulación negativa coordinada, no aleatoria, de la expresión génica en ambas cohortes.

En grasa omental de sujetos obesos, la captación de LCFA de adipocitos saturables era mayor que en los controles, y la expresión de genes clave implicados en la lipólisis y oxidación β y el metabolismo de ácidos grasos se redujeron. Por tanto, tanto la captación aumentada como el metabolismo reducido de LCFA contribuyen a la acumulación de LCFA en adipocitos obesos.

Introducción. Los estudios (A1-15) han mostrado que la captación de LCFA celular se produce por dos procesos distintos, de los que la difusión es el componente menor. A las concentraciones de LCFA típicamente halladas entre comidas, el 80-95 % de la captación de LCFA celular total es mediante un proceso de transporte saturable, regulable, facilitado (A7, A8). Los estudios en animales y pacientes indican que la regulación de la captación de LCFA en adipocitos es un punto de control importante para la adiposidad corporal (A16-21). Sin embargo, como en el hígado (A22-24), muchos procesos adicionales también contribuyen a la acumulación de LCFA y TG. Por lo tanto, para entender la totalidad de los procesos que conducen a obesidad, es importante definir el patrón global de expresión génica en el tejido adiposo. Los datos publicados indican que al menos 50 genes distintos están implicados potencialmente en el establecimiento y el mantenimiento de la obesidad (A22).

Este ejemplo realiza múltiples procesos para determinar la acumulación de grasa en tejido adiposo de pacientes obesos. Se recogió el tejido adiposo omental de pacientes que experimentaban cirugía bariátrica para el tratamiento de obesidad mórbida, y se analizaron como parte de una cohorte inicial, pequeña de muestras. El estudio produjo un hallazgo patofisiológico y una ilustración valiosa de la investigación de traducción que puede realizarse mediante la acción combinada de cirujanos bariátricos y científicos básicos. Se consiguieron validación tanto técnica como biológica de los resultados originales en un estudio continuado de una segunda cohorte mayor de muestras de pacientes. Además, los cambios observados en genes clave de la primera cohorte se validaron usando tanto una plataforma de micromatrices alternativa como qRT-PCR en muestras de la segunda cohorte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

La población de estudio inicial (cohorte 1) consistía en 6 pacientes que se sometían a procedimientos quirúrgicos laparoscópicos abdominales clínicamente indicados que consintieron la retirada de una muestra de grasa omental durante la cirugía para estudios de transporte de LCFA. Tres de los pacientes (dos hombres, una mujer) eran obesos, y estaban sometidos a procedimientos quirúrgicos bariátricos relacionados con su obesidad. A pesar de la obesidad y el hecho de que ninguno tomaba medicamentos que influyeran en el metabolismo de la glucosa, ninguno de los sujetos tenía concentraciones de glucosa en sangre en ayunas elevadas. Los otros tres pacientes (dos hombres, una mujer) no eran obesos, y estaban sometidos a diversos otros procedimientos laparoscópicos clínicamente indicados. Ninguno era diabético, tenían una enfermedad inflamatoria crónica o tumor maligno significativo, o estaba tomando medicamentos que pudieran influir en el metabolismo de la glucosa y, de nuevo, ninguno tenía una glucosa en sangre en ayunas elevada. La cohorte 2 consistía en 7 mujeres obesas pacientes de cirugía bariátrica y 4 controles de mujeres no obesas, sometidos todos a procedimientos quirúrgicos laparoscópicos.

Estudios fisiológicos

Materiales: se obtuvo ácido 9,10- ^3H oleico (OA) de NEN Life Science Products, collagenasa de tipo I para aislamiento de adipocitos de Sigma (St. Louis, MO), albúmina de suero bovino sin ácidos grasos (BSA) de Boehringer Mannheim (Indianápolis, IN), y kits de RIA específicos de insulina humana y de leptina humana de Linco Research, Inc. (St. Charles, MO).

Aislamiento de adipocitos: se prepararon suspensiones de adipocitos humanos por digestión con collagenasa de muestras de grasa omental (A2, A9, A16). Se mantuvieron las suspensiones a temperatura ambiente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) durante hasta 3 horas hasta que se calentó a 37 °C para su uso (A16), y cumplían los criterios de viabilidad establecidos (A2, A9, A16). Los adipocitos aislados se midieron por microscopía óptica directa a 100X, usando una retícula de ocular con la que se midieron los diámetros celulares en unidades arbitrarias (1 U = 9,6 μ). Las áreas de superficie celular medias correspondientes (SA) y volúmenes celulares (Vol) se calcularon como se describe (A25).

Estudios de captación de LCFA: la velocidad inicial de captación de [³H]-OA por adipocitos omentales se determinó por filtración rápida como se ha descrito (A1, A2, A16). Brevemente, se añadieron suspensiones celulares con recuentos celulares conocidos, en 100 μl de DMEM, a 240 μl de DMEM que contenía BSA 500 μM y diversas concentraciones de [³H]-OA, y se incubaron durante 0-30 s a 37 °C. En cuatro puntos temporales específicos, se detuvo la captación (A1, A2), las células se filtraron y se lavaron en los filtros, y los filtros con las células se contaron por espectrometría de centelleo líquido (A2, A16). La captación de adipocitos [³H]-OA es lineal sobre los 30 s iniciales de incubación (A2, A16). Las pendientes de las curvas de captación acumulativa frente al tiempo, que representan velocidad de captación inicial (V₀), se calcularon a partir de cuatro muestras obtenidas por triplicado sobre esta parte de la curva por regresión lineal.

Cálculos y ajuste de datos cinéticos: la concentración del oleato no unido ([OA_u]) en cada solución de ensayos se calculó a partir de la relación molar OA:BSA (v) (A26), usando las constantes de unión LCFA:BSA de Spector *et al* (A27). La justificación para el uso de estas constantes de unión particulares en lugar de varias alternativas (A28-30) se ha presentado en detalle previamente (A8). Basándose en los análisis previos (por ejemplo A5-8), las mediciones de velocidad de captación de oleato inicial a valores de v de 0,25-2,0 se ajustaron a la suma de una función saturable y una no saturable del [OA_u] correspondiente, de acuerdo con la ecuación [A1]:

$$UT([OA_u]) = (V_{\max} \cdot [OA_u]) / (K_m + [OA_u]) + k \cdot [OA_u],$$

en la que UT([OA_u]) es la medición experimental de captación, en pmol/s/50.000 células, a la [OA_u] estipulada; V_{máx} y K_m son la velocidad de captación máxima del componente de captación de ácido oleico saturable y el valor de [OA_u] a la mitad de la velocidad de captación máxima; y k es la constante de velocidad para captación no saturable (A2, A7, A8, A19, A21). El ajuste de datos fue mediante la versión SAAM II del programa de simulación, análisis y modelización (SAAM) (A31), modificado para ejecución en un PC portátil (A32). Los estudios previos han documentado que, en las condiciones específicas empleadas en los presentes estudios, V₀ y parámetros derivados tales como V_{máx} son medidas de transporte transmembrana, en gran medida no modificadas por fenómenos premembrana tales como disociación limitante de velocidad de BSA y los efectos de la capa de agua no agitada pericelular en la disponibilidad del sustrato en la superficie celular (A33), o de unión intracelular o metabolismo (A1). Los estudios en los que un aumento en V_{máx} estaba precedido de un aumento en el tamaño de los adipocitos pronto en el desarrollo de la obesidad (A19) y una reducción en V_{máx} precedió una reducción en el tamaño de adipocitos durante la pérdida de peso inducida por leptina (A17) estableció que los cambios en V_{máx} no reflejaban simplemente cambios en el volumen celular.

Consideraciones estadísticas: los valores para variables fisiológicas se presentan como la media ± DT, calculada de acuerdo con métodos convencionales de estadística descriptiva (A34). La significación de diferencias entre grupos se evaluó con ensayo de t de dos colas de Student considerándose significativa α ≤ 0,05.

Estudios de expresión génica

Recogida de tejidos: se recogieron muestras de grasa omental en el momento de la cirugía laparoscópica. Las muestras se dividieron, y se colocaron 1-2 gramos de tejido de cada biopsia en RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA) a -80 °C para almacenamiento a largo plazo.

Aislamiento de ARN total: las muestras de grasa se descongelaron, y después se homogeneizaron en 15 l de TRIzol (Invitrogen). Después de separación de fases convencional y aislamiento de ARN, el sedimento se resuspendió en agua, tampón de lisis RLT y etanol para limpieza de ARN y tratamiento con DNasa en columna (Qiagen). El ARN eluido tuvo uniformemente relaciones de A260/A280 > 2,0. La integridad del ARN total se verificó por la presencia de picos de 18S y 28S robustos en electroferogramas BioAnalyzer (Agilent).

Marcaje e hibridación de dianas de micromatrices: se generaron ARNc marcados con biotina por procedimientos establecidos. Brevemente, se usaron 2 μg de ARN total para sintetizar ADNc bc. Este se incubó con 11-UTP marcado con biotina en una reacción de transcripción *in vitro*. Se purificó ARNc por columnas RNeasy (Qiagen), y se cuantificó por espectrofotometría UV a 260 nm. La distribución de tamaños del ARNc marcado con biotina se verificó por electroforesis capilar (Bioanalyzer, Agilent). Se hibridaron 10 μg de ARNc fragmentado durante una noche en micromatrices 10K humanas CodeLink (cohorte 1) o micromatrices de genoma completo humano (cohorte 2). Se detectaron ARNc hibridados por estreptavidina-Cy5 flúor (GE Healthcare).

Validación por qRT-PCR: la expresión de siete genes que se había descubierto que estaban infraexpresados por análisis de micromatriz en la cohorte 2 se examinó en las mismas muestras por qRT-PCR. Se diseñaron cebadores de PCR de genes individuales usando software Primer 3 (v.0.4.0) en <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> (Tabla 3).

5

Tabla 3. Secuencias de cebadores para estudios de qRT-PCR.

Gen	Cebador	Tm	Secuencia (5'-3')	SEC ID N°:	Tamaño de producto (nt)
Genes de Control (constitutivos)					
BBS4	Directo	59.93	atcccaaatacaaagcaccag	4	157
	Inverso	59.97	ggcttgtgaactgggatgt	5	
MTIF2	Directo	59.99	tcagaaagcccgtgagaagt	6	171
	Inverso	59.93	atggcctcaacagaaccatc	7	
PGBD3	Directo	59.99	ccacctgtctgggtacatt	8	211
	Inverso	59.93	gcctgatgtcccattgaact	9	
PAICS	Directo	59.96	ctggggaggttcaggatgtgt	10	183
	Inverso	59.96	tcagcctgcttcaaggaaat	11	
Genes diana					
DCI-SP1	Directo	59.82	acaccctggagaacaccatc	12	185
	Inverso	62.55	ctgtcgagcatggtctggaat	13	
ECHD	Directo	59.99	cagcttctcccagactcac	14	218
	Inverso	59.70	atgttgggcaagctctgaat	15	
ADH1A	Directo	60.13	gtgccactgaatgcataac	16	195
	Inverso	60.17	ggttttgggaatcaggaggt	17	
ATP5D	Directo	59.85	caaggcaaaactggagaagg	18	175
	Inverso	60.06	gggcagttcatccagaggt	19	
COX4I1	Directo	59.53	ggcactgaaggagaaggaga	20	204
	Inverso	60.02	gggccgtacacatagtgtt	21	
CYC1	Directo	59.95	ccagctaccatgtccagat	22	166
	Inverso	59.87	tcaggactgaccactgtgtc	23	
NDUFS7	Directo	60.12	agttctctgtggcccatgac	24	197
	Inverso	59.17	ggcatctggtcgtagacctt	25	

Los criterios de selección incluían T_{ms} de aproximadamente 60 °C, y longitudes de producto de PCR entre 150 y 250 pb. Se sintetizaron ADNc de primera cadena a partir de muestras de ARN totales usando el kit de reactivo de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems), con oligo dT como cebadores. Se realizaron PCR en el sistema en tiempo real 7300 (Applied Biosystems), con la mezcla maestra de PCR SYBR® GREEN (Applied Biosystems) en un volumen total de 50 µl que contenía 500 ng de ADNc como se detalla en las instrucciones del fabricante. Las condiciones de PCR fueron: ciclo 1 a 50,0 °C durante 2 min, ciclo 2 a 95,0 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos (dos etapas; 95,0 °C durante 0,15 min, después 60,0 °C durante 1,00 min.). Cada PCR se realizó por duplicado. BBS4, MIT1F, PGBD3 y PAICS se seleccionaron como genes de control basándose en su expresión robusta, con diferencias mínimas entre las muestras de grasa omental de sujetos obesos y normales en el análisis de cohorte 1. Se usaron las medias de sus niveles de expresión para normalizar la expresión de genes diana DCI-SP1, ECHD, ADH1A, ATP5D, COX4I1, CYC1 y NDUFS7 en todas las muestras. Se calculó el factor de cambio promedio (AFC) usando la diferencia promedio en el ΔC_t entre cada gen de ensayo y la media de los 4 genes de control para cada muestra, es decir, $AFC = 2^{-(\text{promedio}_{\Delta C_t})}$.

Análisis de datos: se realizó detección de puntos de micromatrices con el explorador GenePix Serie B (Axon Instruments) y se realizó cuantificación de puntos usando análisis de expresión CodeLink™ v4.1 (cohorte 1) o análisis de expresión CodeLink™ v5.0 (cohorte 2). Los parámetros de cuantificación claves se describen brevemente posteriormente. Se lleva a cabo resta de fondo local en las intensidades de puntos individuales, seguido de una clasificación de cada matriz individualmente basándose en la intensidad de matriz general. Después de normalización con respecto a la mediana, el umbral de control negativo se calcula usando un conjunto de sondas de control negativo como se han descrito (A35).

Ontología génica y análisis de ruta de KEGG: después se importaron los valores de expresión génica normalizados con respecto a la mediana en el paquete de análisis de expresión génica GeneSifter (Geospiza, Seattle, WA). Se superpusieron datos de matrices para genes expresados diferencialmente de forma significativa sobre rutas ontológicas (<http://www.geneontology.org/>) (A36) y rutas KEGG (www.genome.jp/kegg/) (A37) usando software

GeneSifter. Los análisis de ruta KEGG y ontológica proporcionan datos sobre genes individuales en el contexto del papel de ese gen en las rutas biológicas/bioquímicas descritas. Una ruta se consideró significativamente alterada a partir del perfil de expresión génica de control si su puntuación z era menor de -2 o mayor de 2.

- 5 Las puntuaciones z se calcularon en GeneSifter como: puntuación $z = \frac{\left(r - n \frac{R}{N}\right)}{\sqrt{n \left(\frac{R}{N}\right) \left(1 - \frac{R}{N}\right) \left(1 - \frac{n-1}{N-1}\right)}}$ en la que R =

número total de genes que cumplen los criterios de selección, N = número total de genes medidos, r = número de genes que cumplen los criterios de selección con el término de ontología génica (GO) especificado, y n = número total de genes medidos con el término de GO específico (38). Se considera que las puntuaciones z con un valor absoluto de $\geq 2,0$ indican una regulación significativamente alterada de la ruta en comparación con los controles. El significado de la puntuación z depende del contexto de la puntuación presentada. Cuando se presenta como una puntuación hacia arriba z, una puntuación z positiva igual a o mayor que 2 indica que un número significativo de genes en la lista de genes expresados diferencialmente están regulados positivamente en el grupo experimental en esa ruta en particular. Por el contrario, una puntuación hacia arriba z negativa de -2 o menos, también es significativa, e indica que se sobreexpresan menos genes de los esperados en la ruta. Para puntuaciones hacia abajo z, la interpretación es la siguiente: una puntuación hacia abajo z positiva indica que se infraexpresan más genes de lo esperado, y una puntuación hacia abajo z negativa indica que se infraexpresan menos genes de los esperados en la ruta.

RESULTADOS

Pacientes: las características demográficas y clínicas de los pacientes se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de pacientes del estudio

Grupo	Sexo	Edad (años)	IMC (BSA kg/m ²)	Insulina (ng/ml)	Leptina (ng/ml)	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)
Cohorte 1								
Obeso 1	2 M, 1 F	53,7 ± 7,8	42,7 ± 5,7*	9,7 ± 1,5	22,0 ± 4,9**	88,3 ± 7,5****	237 ± 38	211 ± 44
Control 1	2 M, 1 F	50,7 ± 126	23,7 ± 0,4	8,6 ± 3,8	2,2 ± 4,9	63,0 ± 5,8	176 ± 19	146 ± 17
Cohorte 2								
Obeso 2	7 F	51,6 ± 6,0*	48,6 ± 2,6***	NR	NR	92,0 ± 3,1	196 ± 20	130 ± 23
3Control 2	4 F	30,0 ± 6,0	22,1 ± 2,3	NR	NR	87,3 ± 10,3	161 ± 6	79 ± 24
*p<0,05; **p<0,02; ***p<0,001; ****0,1>p>0,05 en comparación con controles de cohorte								
NR no realizado								

La población de estudio inicial (cohorte 1) consistía en tres sujetos obesos y tres no obesos, con dos hombres y una mujer en cada grupo. La cohorte 2 consistía en 7 pacientes mujeres obesas y 4 no obesas. Las edades promedio de los pacientes obesos en ambas cohortes y pacientes de control en la cohorte 1 fueron similares. Los pacientes no obesos en la cohorte 2 eran más jóvenes. Prácticamente por definición, el IMC era significativamente mayor en los pacientes obesos que en los pacientes de control en ambas cohortes. Los valores para sujetos obesos y no obesos en las dos cohortes eran muy similares. En estudios adicionales en la cohorte 1, la concentración de leptina en plasma en ayunas fue significativamente mayor en sujetos obesos que en los de control. Aunque la glucosa en sangre en ayunas media, insulina en plasma y colesterol y triglicéridos en suero eran todos mayores en los pacientes obesos que en los controles, solamente la diferencia en los niveles de glucosa entre los pacientes obesos y no obesos de la cohorte 1 consiguió significación estadística.

Tamaños de adipocitos: se presentan mediciones del tamaño de los adipocitos y los resultados de los estudios de captación de LCFA en adipocitos (cohorte 1 solamente) en la Tabla 5.

Tabla 5. Mediciones de adipocitos y cinética de captación de ácidos grasos.

Grupo	Diámetro (μm)	Área de superficie por célula (μm^2)	Volumen por célula (pL)	$V_{\text{máx}}$ (pmol/s/50.000 células)
Cohorte 1				
Obeso	94,7 $\pm$ 6,8**	32,717 $\pm$ 9,492****	486 $\pm$ 191	19,6 $\pm$ 4,7*
Control	53,4 $\pm$ 4,4	9,953 $\pm$ 1,659	81 $\pm$ 18	4,8 $\pm$ 2,0
Cohorte 2				
Obeso 2	101,6 $\pm$ 4,4***	32,799 $\pm$ 2,784***	568 $\pm$ 71***	ND
Control 2	58,165,8	10,910 $\pm$ 2,630	112 $\pm$ 42	ND
Grupo	K_m (nM)	k (ml/s/50.000 células)	$V_{\text{máx}}/S_{A \times 108}$ (pmol/s/ μm^2)	
Cohorte 1				
Obeso	149 $\pm$ 15	0,0105 $\pm$ 0,0055	1,20 $\pm$ 0,45	
Control	142 $\pm$ 49	0,0068 $\pm$ 0,0018	0,96 $\pm$ 0,43	
Cohorte 2				
Obeso 2	NR	NR	NR	
Control 2	NR	NR	NR	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $0,1 > p > 0,05$ en comparación con controles de cohorte

Los adipocitos de pacientes obesos eran apreciablemente mayores que los de controles no obesos en ambas cohortes. Los diámetros celulares medios eran 1,7-1,8 veces mayores, las áreas de superficie 3,0-3,3 veces mayores, y los volúmenes celulares 5,1 – 6,0 veces mayores en pacientes obesos que en no obesos de ambas cohortes.

Cinética de captación de LCFA: se ilustran ajustes por ordenador de las curvas de captación de LCFA en los seis sujetos del estudio en la cohorte 1 en la Figura 13. Como en una serie previamente presentada (A16), no hubo solapamiento en absoluto en las curvas de sujetos obesos, en comparación con los no obesos. Tanto la $V_{\text{máx}}$ para captación de LCFA saturable como la constante de velocidad (k) para captación no saturable aumentaron en adipocitos de los pacientes obesos. El aumento en $V_{\text{máx}}$ fue estadísticamente significativo; los aumentos en k, y en la relación de $V_{\text{máx}}$ con respecto al área de superficie celular no. Como con algunos de los valores bioquímicos y medidas del tamaño de adipocitos, las comparaciones entre sujetos obesos y no obesos se asemejaban a las presentadas en la serie anterior, mayor (A16). La incapacidad de las diferencias entre grupos para algunos parámetros para conseguir significación estadística en el presente estudio resulta principalmente de los pequeños tamaños de los grupos que comprenden la cohorte 1.

Análisis de micromatrices: en la cohorte 1, se midió la expresión de aproximadamente 10.000 genes humanos y marcadores de secuencia expresados (EST) usando micromatriz 10K humana Codelink en cada muestra de grasa omental de individuos obesos (n=3) y donantes de peso normal (n=3). En la cohorte 2, micromatrices de genoma completo humano Codelink consultaron la expresión de ~50.000 genes y EST en cada muestra. Por lo tanto, se evaluaron muestras en la cohorte 2 con respecto a expresión de ~5 veces tantos genes y EST como los de la cohorte 1. Se analizaron los valores de expresión normalizados con respecto a la mediana usando el paquete de software GeneSifter (Geospiza, Seattle, WA) para la identificación de genes expresados diferencialmente, y de rutas de KEGG con expresión génica significativamente alterada.

Medidas de control de calidad de los datos de expresión: en los estudios de la cohorte 1, se ve una representación de log-log de las medias de valores de expresión de sujetos obesos (ordenadas) frente a normales (abscisas) para cada punto de datos en la Figura 14A (conjunto de datos completo) y la Figura 14B (sección agrandada enmarcada

por el cuadrado magenta). La dispersión de datos limitada en cada uno de los lados de la línea de identidad indica la equivalencia general de los dos conjuntos de datos, mientras que los genes estadísticamente significativos (ensayo de T, sin corrección para múltiples ensayos) indican lo ajustado de la dispersión de datos para genes individuales. Una segunda indicación de esta equivalencia general es una comparación de los cuatro genes ribosómicos mitocondriales (L12, L38, L42 o S7) en las microplacas. Ninguno de estos cuatro “genes constitutivos” demuestra diferencias significativas en la expresión entre los dos conjuntos de muestras, mostrando la equivalencia metabólica general entre los depósitos de grasa de sujetos obesos y normales. Una tercer medida de la equivalencia general puede verse en las representaciones de cuantiles correspondientes (Figura 14C: obesos, izquierda, y normales, derecha), que no revelan ninguna diferencia sistemática entre los conjuntos de datos. Estas tres medidas globales de la expresión génica indican que no hay diferencias sistemáticas entre los dos conjuntos de datos, lo que indica que pueden extraerse conclusiones biológicas válidas si se detectan diferencias en la expresión para genes individuales particulares. Se obtuvieron comparaciones de control de calidad altamente similares de las muestras de la cohorte 2.

Identificación de genes individuales que se expresan diferencialmente en grasa de sujetos obesos: se analizaron comparaciones por pares entre las tres muestras de sujetos obesos y las tres normales en la cohorte 1 con factores de cambio mínimos en la expresión, seguido de ensayos de t convencionales y correcciones para múltiples ensayos. Usando criterios de una diferencia de expresión de $\geq 1,5$ -veces y un p valor de $\leq 0,05$, se identificaron 166 genes expresados diferencialmente y EST en los análisis de cohorte 1. Sin embargo, después de aplicar la corrección de Benjamini y Hochberg para ensayos múltiples (A39), solamente un gen de este conjunto, dodecenil-Coenzima A delta isomerasa (3,2 – trans-enoil-Coenzima A isomerasa) (DCI) demostró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos en la cohorte 1, que se infraexpresaba 1,6 veces en grasa de sujetos obesos (Figura 15A). Este gen codifica un miembro de la superfamilia de hidratasa/isomerasa. La proteína codificada es una enzima mitocondrial clave implicada en la oxidación beta de ácidos grasos insaturados. Cataliza la transformación de ésteres 3-cis y 3-trans-enoil-CoA que surge durante la degradación por etapas de ácidos grasos cis-, mono-, y poliinsaturados a los intermedios de 2-trans-enoil-CoA. Para muestras de la cohorte 2, los resultados fueron casi idénticos para las diferencias de expresión de DCI entre muestras de grasa omental de sujetos obesos y normales (Figura 15B).

Expresión génica relacionada con lipólisis en grasa de sujetos obesos: la etapa inicial en la liberación de ácidos grasos de almacenes de triacilglicerol es su hidrólisis mediante lipólisis regulada hormonalmente. Dos genes clave en este proceso, adenilato ciclasa 6 (Figura 16A y figura 16B) y receptor del péptido activador de adenilato ciclasa 1 (Figura 16C y Figura 16D) están ambos infraexpresados en las muestras de grasa de sujetos obesos en ambas cohortes. La adenilato ciclasa 6 codifica una enzima asociada a membrana que cataliza la formación del segundo mensajero adenosin monofosfato cíclico (AMPc). El receptor de polipéptido activador de adenilato ciclasa 1 tipo I, codifica una proteína receptora asociada a membrana que media en diversas acciones biológicas del polipéptido activador de adenilato ciclasa 1, y está acoplado positivamente con adenilato ciclasa. El hecho de que ambos de estos genes clave en la cascada de señalización de adenilato ciclasa estén infraexpresados en grasa omental de sujetos obesos indica que este tejido puede demostrar respuestas reducidas a estimulación fisiológica por hormonas lipolíticas.

Análisis de ruta de KEGG: para identificar un grupo mayor de genes expresados diferencialmente para inclusión en el análisis de ruta, todos los genes en una comparación por pares se seleccionaron con un p valor no corregido $\leq 0,05$, sin corrección para ensayos múltiples, ya que el análisis de ruta en sí mismo se aplica a un filtro estadístico de segundo nivel. Usando este criterio de p valor no corregido, se identificaron 612 genes expresados diferencialmente y EST entre grasa de sujetos obesos y normal de la lista de 10.000 que se consultaron en la cohorte 1. Esta lista de genes expresados diferencialmente se sometió a análisis de ruta de KEGG para identificación de rutas biológicas con expresión génica significativamente alterada en grasa de sujetos obesos frente a normal, como se indica por puntuaciones de z hacia arriba o z hacia abajo significativas. El conjunto completo de rutas de KEGG reguladas negativamente hallado en la cohorte 1 se presenta en la Tabla 6. Ninguna ruta con puntuaciones z hacia arriba tuvo suficientes genes expresados diferencialmente para considerarse biológicamente significativas.

Tabla 6. Rutas de KEGG con puntuaciones z hacia abajo significativas.

Ruta de KEGG	Genes en matriz	Genes regulados	Hacia arriba	Hacia abajo	Puntuación z hacia abajo	
					Cohorte 1	Cohorte 2
Fosforilación oxidativa	51	8	0	8	4,22	3,67
Síntesis y degradación de cuerpos de cetona	5	2	0	2	3,99	2,95
Metabolismo de ácidos grasos	37	6	0	6	2,31	1,59

De las rutas con mutaciones z hacia abajo significativas y un número suficiente de genes implicados para indicar relevancia biológica, destacan la fosforilación oxidativa y el metabolismo de ácidos grasos, ambos directamente

relacionados con el metabolismo de energía y biosíntesis y degradación de ácidos grasos (A37). De los genes en cada ruta que demuestran expresión diferencial en la cohorte 1, todos están infraexpresados en muestras de grasa de sujetos obesos en relación con las muestras de individuos de peso normal (ocho genes en la ruta de fosforilación oxidativa, y seis genes en la ruta de metabolismo de ácidos grasos), en 12 de 14 casos con un factor de cambio de $\geq 1,2$. Los resultados para estos 12 genes en la cohorte 2 fueron en general muy similares a los descritos a continuación (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Genes regulados negativamente en la ruta de fosforilación oxidativa.

Gen	ID	EC	Complejo	Factor de cambio hacia abajo	
				Cohorte 1	Cohorte 2
Proteína NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S 7, 20 kDa (NADH Coenzima Q reductasa)	NDUFS7	1.6.5.3; 1.6.99.3	I	1,48	1,31
Complejo de succinato deshidrogenasa, subunidad A, flavoproteína (Fp)	SDHA	1.3.5.1	II	1,40	1,16
Citocromo c-1	CYC1	1.10.2.2	III	1,48	1,37
Citocromo c oxidasa subunidad IV isoforma 1	COX4I1	1.9.3.1	IV	1,51	1,11
ATPasa, transportadora de H ⁺ , lisosómica 50/57 kDa, subunidad V1 H	ATP6V1H	3.6.3.14	V	1,55	1,24
ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo mitocondrial F0, subunidad G	ATP5L	3.0.1.14	V	1,35	1,37
ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo mitocondrial F1, subunidad delta	ATP5D	3.6.1.14	V	1,51	1,12

Tabla 8. Genes regulados negativamente en la ruta del metabolismo de ácidos grasos.

Gen	ID	EC	Factor de cambio hacia abajo	
			Cohorte 1	Cohorte 2
Acil-Coenzima A oxidasa 1, palmitoilo	ACOX1	1.3.3.6	1,36	1,02
Alcohol deshidrogenasa 1A (clase 1), alfa polipéptido	ADH1A	1.1.1.1	2,21	1,91
Dodecenol-Coenzima A delta isomerasa (3,2-trans-enoil-DCI Coenzima A isomerasa)		5.3.3.8	1,59	1,64
3-hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa	ECHD	1.1.1.35	1,59	1,54
D3, D2-enoil-CoA isomerasa peroxisómica	PECI	5.3.3.8	1,25	1,08

Los genes individuales que se infraexpresaron en la ruta de fosforilación oxidativa en la cohorte 1 con un factor de cambio $\geq 1,2$ se presentan en la Tabla 7. Incluyen dos ATP sintasas mitocondriales transportadoras de H⁺, una ATPasa transportadora de H⁺ lisosómica, dos genes de citocromo c, y dos deshidrogenasas (ubiquinona y flavoproteína). De los cientos de proteínas que componen los diversos complejos de transporte de electrones y enzimáticos hallados en la membrana mitocondrial interna, la expresión de los genes que codifican siete de estas proteínas está regulada negativamente en grasa omental de sujetos obesos. Cinco de estos genes codifican proteínas que son enzimas reguladoras o moléculas de transporte, y estas se extienden a través de los 5 complejos grandes que comprenden la cadena de transporte de electrones. Como resultado, incluso una regulación negativa menor de cada uno de estos, cuando se tienen en cuenta juntos, pueden dar como resultado una diferencia funcional importante en la producción de ATP por el complejo V. La organización funcional de estos genes regulados negativamente y su regulación coordinada se ha destacado por la nueva ruta de análisis empleada en este estudio.

En el complejo I, NADH deshidrogenasa (1.6.5.3/1.6.99.3) es la primera enzima del complejo que cataliza la transferencia de electrones de NADH a Coenzima Q. En el complejo II, la succinato deshidrogenasa (1.3.5.1) reduce el succinato a fumarato. En el complejo III, ubiquinol-citocromo-c reductasa (1.10.2.2) es el componente que contiene hemo del complejo citocromo b-cl, que acepta electrones de la proteína Rieske y transfiere electrones al citocromo c en la cadena respiratoria mitocondrial. En el complejo IV, Cox4I1 (1.9.3.1) es una de las cadenas polipeptídicas de codificación nuclear de la citocromo c oxidasa, la oxidasa terminal en el transporte de electrones mitocondrial. En el complejo V, el complejo mitocondrial F1, transportador H⁺, ATPasa, subunidad delta (ATP6V1H, 3.6.3.14) activa la actividad ATPasa de la enzima y acopla la actividad ATPasa al flujo de protones. Se presentan genes infraexpresados con un factor de cambio $\geq 1,2$ en muestras de grasa de sujetos obesos de la cohorte 1 que son componentes de la ruta del metabolismo de ácidos grasos en la Tabla 77. Estos genes incluyen acil Coenzima A

oxidasa, alcohol deshidrogenasa 1A, DCI, otra isomerasa (D3,D2-enoil-CoA isomerasa peroxisómica), e hidroxiaxil-Coenzima A deshidrogenasa.

qRT-PCR: se examinó la expresión de siete genes de las rutas de fosforilación oxidativa o metabolismo de ácidos grasos que se descubrió que estaban infraexpresados por análisis de micromatriz en la cohorte 1 en las muestras de cohorte 2 por qRT-PCR. Los genes son ECHD (3-Hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa); ADH1a (Alcohol deshidrogenasa 1A); DCI (Dodecenoil-Coenzima A delta isomerasa); ATP5D (ATP sintasa, mito F1); CYC1 (citocromo c-1); NDUFS7 (NADH deshidrogenasa Fe-S); COX4I1 (citocromo c oxidasa IV) (Figura 17). Siete de estos genes estaban infraexpresados en la cohorte 2 como se evaluó con la micromatriz de genoma humano completo. Por lo tanto, hubo concordancia completa entre la matriz de genoma humano completo y qRT-PCR con respecto a la dirección de la regulación de expresión de estos 7 genes. Además, para los siete genes consultados, la dirección de diferencia en la expresión entre obesos y controles también es uniforme entre los dos conjuntos de muestras (cohorte 1 and cohorte 2), ya que estos siete genes están todos infraexpresados en las muestras de grasa de sujetos obesos. Estos hallazgos son coherentes con un metabolismo de energía reducido en general en grasa de sujetos obesos.

ANÁLISIS

La obesidad es la deposición aumentada de LCFA, principalmente en forma de TG, en tejidos adiposos y otros. El hecho de que esta deposición sea altamente selectiva, y que su alcance y renovación difieran incluso entre diferentes depósitos de tejido adiposo (por ejemplo A40-43), indica que hay una patofisiología subyacente compleja que implica mucho más que la difusión pasiva, desregulada, de LCFA, los componentes básicos esenciales de TG, a través de las membranas celulares. Muchos procesos pueden contribuir a la acumulación de TG: captación o síntesis de LCFA aumentada, aumento de la conversión de LCFA en TG, o captación aumentada de TG preformados de lipoproteínas; o como alternativa retirada de TG o LCFA reducida por la reducción de la lipólisis de TG, excreción de LCFA y TG reducida como componentes de VLDL, u oxidación de LCFA reducida (A18, A22-24, A44-46). Estos múltiples procesos implican múltiples genes, por ejemplo para transportadores de LCFA de membrana plasmática e intracelulares; para enzimas de síntesis de ácidos grasos o triglicéridos; para receptores, enzimas y otras proteínas asociadas con la importación y/o la hidrólisis de lipoproteínas-triglicéridos preformados, tales como el receptor de LDL, lipasa hepática y lipasa lipoproteica (LPL); genes asociados con síntesis, ensamblaje y exportación de VLDL; y proteínas y enzimas de oxidación de ácidos grasos; sin mencionar numerosos factores de transcripción y otros genes reguladores. Sería deseable ensayar estos procesos simultáneamente. Aunque los genes clave implicados en muchos de estos procesos se han identificado, para otros procesos, incluyendo captación de LCFA celular, se desconocen los genes clave (A47, A48). Varios de los procesos, tales como captación y oxidación de LCFA celular, pueden ensayarse directamente. Aunque la cuantificación directa de otros es más difícil, puede obtenerse una aproximación de primer orden mediante estudios de expresión de ARN.

Análisis de expresión de micromatrices. Sin quedar ligado a la teoría, el número de genes conocidos potencialmente implicados en la patogénesis de obesidad es de al menos 50 (A22). La tecnología de micromatriz de expresión de ARN es un enfoque eficaz para analizar un gran número de genes, y también para identificar genes cuyo papel en el proceso de interés, en este caso la obesidad, se desconoce. Las micromatrices supervisan simultáneamente la expresión de miles de ARNm de muestras individuales. Además de proporcionar información con respecto a la expresión de genes candidatos preseleccionados, la naturaleza de alto rendimiento de análisis de micromatrices es ideal para la identificación de genes candidatos y/o rutas responsables de la patofisiología de enfermedades complejas tales como obesidad.

Los datos analizados en el presente documento se analizaron usando un enfoque de dos estadios. El primer estadio era identificar genes individuales cuya expresión era significativamente diferente entre muestras de grasa omental normales y de sujetos obesos. Usando un punto de corte convencional de una diferencia de 1,5 veces en la expresión, junto con corrección de Benjamini y Hochberg para múltiples ensayos (39), se identificó un único gen, dodecenoil-Coenzima A delta isomerasa (DCI) o 3,2 trans-enoil-Coenzima A isomerasa, en la cohorte 1 como infraexpresado en grasa omental de sujetos obesos. Su infraexpresión se confirmó en la cohorte 2 tanto por micromatriz como por análisis de expresión de qRT-PCR, proporcionando una validación tanto biológica como técnica de este resultado. Este gen es un enzima mitocondrial implicada en la oxidación β de ácidos grasos insaturados. Los intermedios metabólicos producidos durante la degradación por etapas de LCFA insaturados entran en el ciclo de ácido cítrico, donde contribuyen a la producción de APT por fosforilación oxidativa. La obesidad central se ha asociado positivamente con un aumento en los ácidos grasos n-6 insaturados, y se ha asociado de forma inversa con ácidos grasos monoinsaturados (A49).

Organización genómica de DCI. Este gen está localizado en el locus cromosómico 16 p13.3, que codifica una proteína predicha de 302 aminoácidos (ENTREZ [NM_001919]). El locus 16p13.3 se ha ligado dos veces con factores relacionados con la obesidad, incluyendo IMC, tanto por la fundación de logaritmo de la probabilidad (puntuación LOD) del marcador microsatélite D16S510 en un estudio de familias Amish de orden antiguo (A50) y en una exploración de genoma de familias afroamericanas con alta neuropatía no diabética (A51). Estos informes y la reducción de la expresión de DCI descrita en el presente documento hacen a este un gen candidato para estudio posterior en obesidad. La pérdida de ~50 % de la expresión de DCI es coherente con la pérdida funcional de un alelo

de DCI, que podría reflejar microdeleciones en esta región génica, o polimorfismos de un único nucleótido (SNP) que afectan de forma adversa al corte y empalme o estabilidad del mensaje de DCI.

Análisis de la ruta de KEGG. La potencia de análisis de micromatrices es que permite la exploración simultánea de miles de genes en cada muestra, sin desviaciones por preselección de genes candidatos. Recientes avances en el software permiten considerar cambios en la expresión génica en el contexto de rutas biológicas. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) consortium (www.genome.jp/kegg ; 37) ha establecido una colección de rutas génicas cuyos miembros génicos se sabe que interaccionan como parte de un todo mayor. Los cambios significativos en expresión génica de miembros de la ruta, especialmente cuando los cambios están coordinados (por ejemplo: que implican varios miembros secuenciales de una ruta de señalización) indican que son probables alteraciones biológicamente significativas de la regulación y/o función de la ruta. Además, cambios relativamente pequeños en la expresión de múltiples genes en una ruta, cada uno demasiado pequeño para conseguir significación individualmente, pueden conducir a alteraciones biológicamente significativas en el rendimiento a lo largo de una ruta. Por ejemplo, usando un modelo simplista, una regulación negativa del 10 % de 7 genes en una ruta, en los que cada uno puede supervisarse por análisis de un único gen, podría dar como resultado una reducción biológicamente significativa de ≥ 50 % en el rendimiento a lo largo de la ruta.

Ruta de KEGG de fosforilación oxidativa. La ruta de fosforilación oxidativa captura energía liberada por oxidación de NADH y succinato en el ciclo de ácido cítrico, produciendo adenosin trifosfato (ATP) mediante ATP sintasa. De los 51 genes en esta ruta que se incluyen en las matrices usadas en este estudio, siete se expresan diferencialmente, y estos siete están todos infraexpresados en la grasa de sujetos obesos. Los datos analizados en el presente documento muestran que dos componentes proteicos del complejo de ATP sintasa están regulados negativamente en grasa de sujetos obesos: la subunidad G del complejo de ATP sintasa F₀, y las subunidades delta del complejo F₁). Estos resultados muestran además que también están infraexpresados componentes de la cadena de transporte de electrones, incluyendo citocromo c oxidasa, y citocromo c-1, más NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa (subunidad A). Sin quedar ligado a la teoría, la producción de ATP puede reducirse en tejidos grasos de sujetos obesos si también se reducen los niveles de las proteínas correspondientes. Es importante reconocer que cada uno de los cinco complejos está compuesto de muchas subunidades, que dependen de una macroestructura delicada.

Los datos analizados en el presente documento que muestran la infraexpresión de 7 de los 7 genes expresados diferencialmente implicados en la fosforilación oxidativa están de acuerdo con hallazgos similares en gemelos monocigóticos que eran discordantes para obesidad (A52). El análisis de micromatrices de biopsias de grasa identificó 30 genes en la ruta de fosforilación oxidativa que estaban infraexpresados en los sujetos obesos en comparación con sus gemelos no obesos. También se infraexpresaron varios de estos genes, incluyendo ATP5L, ATP5B, ATPV1H y CYC1. Mustelin *et al.* también descubrieron miembros del complejo de NADH deshidrogenasa que estaban infraexpresados en grasa de sujetos obesos. Se han presentado datos similares en Patti *et al.* (A53), que descubrieron una reducción coordinada en la expresión génica de metabolismo oxidativo en el músculo esquelético de mejicanos americanos diabéticos de tipo II, en relación con la expresión reducida de dos factores de transcripción, factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1) y coactivador de PPAR γ 1, que se sabe que regulan la expresión de genes en la ruta de fosforilación oxidativa. Los genes que codifican estos factores de transcripción no están presentes en las micromatrices 10K usadas en los estudios originales. En las muestras de la cohorte 2, NRF-1 y coactivador PPAR γ 1 esencialmente no tuvieron cambios, lo que indica que otro mecanismo puede ser responsable de la regulación negativa uniforme de los genes de la ruta de fosforilación oxidativa en grasa omental de sujetos obesos.

Ruta de KEGG de metabolismo de ácidos grasos. La ruta del metabolismo de ácidos grasos incluye las enzimas responsables de la biosíntesis y degradación de los LCFA, que conduce a la producción de acetil-CoA, que después se dirige al ciclo de TCA. A partir de ahí, la oxidación de NADH y succinato produce ATP mediante ATP sintasa en la ruta de fosforilación oxidativa. De los 37 genes explorados por las matrices, seis de seis con expresión diferencial estaban todos infraexpresados en grasa de sujetos obesos. Cada uno de estos genes infraexpresados desempeña un papel en el metabolismo de LCFA, y ya se ha indicado que varios desempeñan un papel en la obesidad. Se ha indicado que la expresión de acil-Coenzima A oxidasa 1 (1.3.3.6) en grasa omental predice el resultado de pérdida de peso después de cirugía de derivación gástrica (A54). DCI (5.3.3.8), agrupado con 3-hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa (1.1.1.35) en la Figura 12, desempeña un papel clave en la degradación de LCFA. Se ha presentado una mayor incidencia de obesidad infantil en niños con 3-hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD) o deficiencia de proteína trifuncional (TFP). Proporcionando a estos niños dietas bajas en grasas, altas en proteínas y bajas en carbohidratos, se produjo un menor consumo de energía y aumento del gasto de energía (A55).

Expresión génica relacionada con la lipólisis. Los resultados analizados en el presente documento que mostraban expresión reducida de genes clave en la señalización mediada por AMPc de lipólisis estimulada hormonalmente son coherentes con informes que muestran una respuesta lipolítica mitigada a la estimulación por catecolamina en individuos obesos, especialmente en grasa abdominal (A56) y adipocitos de individuos obesos, debido en parte a la expresión reducida de lipasa sensible a hormonas (A57). Sin embargo, para un mayor entendimiento de este sistema complejo son necesarios estudios de transcriptoma en curso.

Ruta de KEGG de transportadores ABC. Uno de los genes de esta ruta codifica un casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 3 (ABCD3), un miembro de la superfamilia de transportadores de casetes de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan diversas moléculas a través de membranas extra e intracelulares. ABCD3 es un miembro de la subfamilia ALD, que está implicado en la importación peroxisómica de ácidos grasos y/o acil-CoA grasos en el orgánulo. Aunque se conoce poco acerca de este gen en obesidad humana, su regulación positiva analizada en el presente documento es interesante a la luz de su papel conocido en el transporte de LCFA intracelular. Sin quedar ligado a la teoría, la importación de LCFA peroxisómico aumentada y posterior oxidación pueden sustituir en parte la oxidación β mitocondrial reducida indicada por otros hallazgos lo que justifica estudio adicional.

Validación de resultados. Está ampliamente aceptado que los análisis de resultados de micromatrices requieren validación. Esto puede implicar la validación biológica en un segundo conjunto de muestras recogido de forma independiente, y validación tecnológica usando una plataforma de micromatrices alternativa o una tecnología completamente diferente tal como qRT-PCR. También puede conseguirse validación por mediciones de las proteínas codificadas por genes regulados, o de actividad biológica. En el presente estudio, se consiguió validación biológica por el estudio de dos conjuntos de muestras recogidas de forma independiente, y la validación técnica mediante el uso de dos plataformas de micromatrices diferentes y qRT-PCR.

En los comienzos del análisis de micromatrices se consideraban esenciales tamaños de muestras muy grandes debido a preocupaciones acerca de los problemas estadísticos implicados en la realización de miles de comparaciones simultáneas en una muestra dada. A medida que se desarrolló la teoría estadística para este problema, los números requeridos han descendido drásticamente. El informe de consenso de una conferencia importante patrocinada por todas las agencias científicas gubernamentales principales en 2006 concluyó que un $n = 5$ por grupo era suficiente para la mayoría de análisis de micromatrices (A58). Desde esa conferencia los números se han reducido más. Se ha publicado un número apreciable de artículos sobre micromatrices en revistas reputadas basándose en estudios en cohortes aún más pequeñas, incluyendo en las que $n=3$ por grupo (por ejemplo A59-61). El presente estudio está dentro de las directrices de 2006 publicadas.

Debido a que diferentes poblaciones celulares dentro de un tejido pueden expresar genes particulares a tasas diferentes, antes se consideraba importante fraccionar los tejidos en poblaciones celulares purificadas antes de realizar análisis de micromatrices. Esto aún puede ser útil en casos específicos, pero los estudios de matrices de expresión génica han tendido a alejarse de esto ya que los procedimientos de aislamiento celular en sí mismos pueden introducir cambios artificiales importantes en la expresión génica. Esto se ha estudiado especialmente bien en comparaciones de sangre completa frente a PBMC, en las que los cambios en la expresión de ARN debido a manipulación experimental pueden enmascarar gravemente lo que sucede *in vivo* (A62). Muchas personas creen en la actualidad que el fraccionamiento celular es esencial solamente en situaciones específicas. Los presentes estudios se preformaron en muestras de tejido adiposo no fraccionadas. Sin quedar ligado a la teoría, la infiltración de macrófagos aumentada en grasa de sujetos obesos influye en las comparaciones con resultados en grasa de sujetos no obesos parece poco probable en un estudio, tal como este, en el que los resultados clave son regulación negativa de múltiples genes biológicamente relevantes en las muestras de grasa de sujetos obesos. Además, la relación de expresión de 23 genes específicos de macrófagos en grasa omental de sujetos obesos frente a no obesos no fraccionada promedió $1,1 \pm 0,06$, lo que es un fuerte argumento contra la posibilidad de que la regulación negativa observada de DCI y los genes relacionados reflejen infiltración de macrófagos.

Modelo de trabajo de acumulación de ácidos grasos de cadena larga en adipocitos de sujetos obesos. Muchos laboratorios han examinado el equilibrio entre la captación de LCFA, la disposición de LCFA y el contenido de TG celular en el hígado en lo que se refiere a la patogénesis de esteatosis hepática (A18, A22-24, A44-46). Se aplican consideraciones similares a adipocitos y la patofisiología de obesidad. En adipocitos de sujetos de peso normal, que permiten la variación diurna relacionada con los alimentos, la captación de LCFA (incluyendo transporte facilitado) y degradación (incluyendo oxidación β) o eliminación (por ejemplo, lipólisis) están en equilibrio. En consecuencia, la cantidad neta de grasa en cada célula es esencialmente constante a lo largo del tiempo, dando como resultado los pesos relativamente estables vistos en sujetos no obesos. Por el contrario, en adipocitos de sujetos obesos, la combinación de captación de LCFA facilitada aumentada, mostrada en los estudios de captación analizados en el presente documento, y oxidación β reducida, lipólisis y metabolismo de LCFA, indicado por análisis de expresión génica, conduce a la acumulación de LCFA y TG a lo largo del tiempo.

El resultado de los cambios observados en cinética de LCFA y expresión de genes metabólicos será la acumulación crónica de LCFA y TG, dando como resultado adipocitos agrandados y aumento de peso significativo a lo largo del tiempo. La potencia de este estudio es la combinación del primer estadio de alto rendimiento, en el que se consultan miles de genes; y los sistemas de enfoque biológico del segundo estadio, en el que se identifican rutas establecidas que contienen un número estadísticamente significativo de genes con expresión alterada. La combinación de análisis de micromatrices con filtración de ruta extensiva de genes identificados se considera cada vez más un enfoque de estado de la técnica, que debería guiar la validación experimental futura. Sin quedar ligado a la teoría, los efectos sinérgicos de cócteles farmacológicos cuyos componentes se dirigen a diversas dianas en estas rutas pueden actuar a dosis individuales menores, con menos toxicidad, y en más pacientes, que los fármacos que se dirigen solamente a uno de los muchos componentes génicos de una ruta. La interfaz entre la cirugía bariátrica y la

ciencia básica puede demostrar ser el lugar óptimo para llevar a cabo esta investigación traduccional críticamente importante.

REFERENCIAS

- 5 A1. Stremmel W, Berk PD. Hepatocellular influx of [14C]oleate reflects membrane transport rather than intracellular metabolism or binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83 (10): 3086-3090.
- 10 A2. Schwieterman W, Sorrentino D, Potter BJ, *et al*. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Ene 1988; 85 (2): 359-363.
- 15 A3. Sorrentino D, Stump D, Potter BJ, *et al*. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest*. Sep 1988; 82 (3): 928-935.
- A4. Stremmel W. Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest*. Dic 1988; 82 (6): 2001-2010.
- 20 A5. Nunes RM IL, Sorrentino D, Berk PD. Oleate uptake by isolated hepatocytes consists of two components, each driven by the unbound oleate concentration: Proceedings, 3rd International Congress, Mathematical Modelling of Liver Excretory Process, Juntendo University Press, Tokio, 1990; 312-316.
- 25 A6. Stump DD, Nunes RM, Sorrentino D, Isola LM, Berk PD. Characteristics of oleate binding to liver plasma membranes and its uptake by isolated hepatocytes. *J Hepatol*. 1992; 16 (3): 304-315.
- A7. Berk PD, Stump DD. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem*. Feb 1999; 192 (1-2): 17-31.
- 30 A8. Stump DD, Fan X, Berk PD. Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res*. Abr 2001; 42 (4): 509-520.
- A9. Abumrad NA, Perkins RC, Park JH, Park CR. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem*. 10 Sep 10 1981; 256 (17): 9183-9191.
- 35 A10. Abumrad NA, Park JH, Park CR. Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. *J Biol Chem*. 25 Jul 1984; 259 (14): 8945-8953.
- 40 A11. Glatz JF, van Nieuwenhoven FA, Luiken JJ, Schaap FG, van der Vusse GJ. Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Oct 1997; 57 (4-5): 373-378.
- 45 A12. Luiken JJ, Turcotte LP, Bonen A. Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J Lipid Res*. 1999; 40 (6): 1007-1016.
- A13. Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Fatty acid transport proteins facilitate fatty acid uptake in skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*. Oct 2000; 25 (5): 333-352.
- 50 A14. Kampf JP, Kleinfeld AM. Fatty acid transport in adipocytes monitored by imaging intracellular free fatty acid levels. *J Biol Chem*. 20 Ago 2004; 279 (34): 35775-35780.
- A15. Kleinfeld AM, Kampf JP, Lechene C. Transport of 13C-oleate in adipocytes measured using multi-imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. Nov 2004; 15 (11): 1572-1580.
- 55 A16. Petrescu O, Fan X, Gentileschi P, *et al*. Long-chain fatty acid uptake is upregulated in omental adipocytes from patients undergoing bariatric surgery for obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29 (2): 196-203.
- A17. Fan X, Bradbury MW, Berk PD. Leptin and insulin modulate nutrient partitioning and weight loss in ob/ob mice through regulation of long-chain fatty acid uptake by adipocytes. *J Nutr*. 2003; 133 (9): 2707-2715.
- 60 A18. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis*. 2004; 8 (3): 639-671.
- 65 A19. Berk PD, Zhou SL, Kiang CL, Stump D, Bradbury M, Isola LM. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulindependent diabetes mellitus. *JBiol Chem*. 1997; 272 (13): 8830-8835.

- A20. Berk PD, Zhou SL, Bradbury M, Stump D, Kiang CL, Isola LM. Regulated membrane transport of free fatty acids in adipocytes: role in obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1997; 108: 26-40.
- 5 A21. Berk PD, Zhou S, Kiang C, Stump DD, Fan X, Bradbury MW. Selective up-regulation of fatty acid uptake by adipocytes characterizes both genetic and diet-induced obesity in rodents. *J Biol Chem.* 1999; 274 (40): 28626-28631.
- A22. Berk PD. The Master's Perspective: Regulatable fatty acid transport mechanisms are central to the pathophysiology of obesity, fatty liver, y metabolic syndrome. *Hepato* 2008; 48: 1362-1376.
- 10 A23. Verna EC, Berk PD. Role of fatty acids in the pathogenesis of obesity and fatty liver: Impact of bariatric surgery. *Semin Liver Dis* 2008; 28 (4): 407-426.
- A24. Goldberg IJ, Ginsberg HN. Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroent* 2006; 130 (4): 1343-1346.
- 15 A25. Di Girolamo M, Mendlinger S y Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol* 1971; 221: 850-858.
- 20 A26. Wosilait WD y Nagy P. A method of computing drug distribution in plasma using stepwise association constants: clofibrate acid as an illustrative example. *Comput Programs Biomed* 1976; 6: 142-148.
- A27. Spector AA, Fletcher JE y Ashbrook JD. Analysis of long-chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry* 1971; 10: 3229-3232.
- 25 A28. Bojesen IN y Bojesen E. Binding of arachidonate and oleate to bovine serum albumin. *J Lipid Res* 1994; 35: 770-778.
- A29. Richieri GV, Anel A y Kleinfeld AM. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 1993; 32: 7574-7580.
- 30 A30. Rose H, Conventz M, Fischer Y, Jungling E, Hennecke T y Kammermeier H. Long-chain fatty acid-binding to albumin: re-evaluation with directly measured concentrations. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215: 321-326.
- 35 A31. Berman M y Weiss MF. Users' manual for SAAM US Government Printing Office: Washington DC 1967.
- A32. SAAM II user guide, SAAM Institute: Seattle, WA 1998.
- 40 A33. Sorrentino D, Robinson RB, Kiang CL y Berk PD. At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. *J Clin Invest* 1989; 84: 1325-1333.
- 45 A34. Snedecor GW y Cochran WG. Statistical methods 6ª edn. Iowa State University Press: Ames, Iowa 1967.
- A35. Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M, Zhu X, Patterson M, Shippy R, Sendera TJ, Mazumder A. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30 (7): e30.
- 50 A36. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000; 25 (1):25-29.
- 55 A37. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 D277-280.
- A38. Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol.* 2003; 4 (1): R7.
- 60 A39. Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). "Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing," *Journal of the Royal Statistical Society B*, 1995; 57, 289-300.
- 65 A40. Fried, S. K. y Kral, J. G. Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int J Obes* 1987; 11 (2): 129-140.

A41. Edens, N. K., Fried, S. K., Kral, J. G., Hirsch, J., y Leibel, R. L. In vitro lipid synthesis in human adipose tissue from three abdominal sites. *Am J Physiol* 1993; 265 (3 Pt 1): E374-379.

A42. Ostman, J., Arner, P., Engfeldt, P., y Kager, L. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism* 1979; 28 (12): 1198-1205.

A43. Russell, C. D., Petersen, R. N., Rao, S. P., Ricci, M. R., Prasad, A., Zhang, Y., Brolin, R. E., y Fisher, F. M., McTernan, P. G., Valsamakis, G., Chetty, R., Harte, A. L., Anwar, A. J., Starcynski, J., Crocker, J., Barnett, A. H., McTernan, C. L., y Kumar, S. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res* 2002; 34: 650-654.

A44. Chirieac DV, Chirieac LR, Corsetti JP, Cianci J, Sparks CE, Sparks JD. Glucose-stimulated insulin secretion suppresses hepatic triglyceride-rich lipoprotein and apoB production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279 (5): E1003-1011.

A45. Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res.* 2005; 33 (2): 138-144.

A46. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* Jun 2007; 45 (6): 1366-1374.

A47. Kampf JP, Parmley D, Kleinfeld AM. Free fatty acid transport across adipocytes is mediated by an unknown membrane protein pump. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293 (5): E1207-1214.

A48. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab.* Mar 2009; 20 (2): 7 2-7.

A49. Garaulet M, Perez-Llamas F, Perez-Ayala M, Martinez P, de Medina FS, Tebar FJ, Zamora S. Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 585-591.

A50. Hsueh WC, Mitchell BD, Schneider JL, *et al.* Genomewide scan of obesity in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1199 -205.

A51. Freedman BI, Langefeld CD, Rich SS, Valis CJ, Sale MM, Williams AH, Brown WM, Beck SR, Hicks PJ, Bowden DW. A genome scan for ESRD in black families enriched for nondiabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15 (10): 2719-2127.

A52. Mustelin L, Pietiläinen KH, Rissanen A, Sovijärvi AR, Piirilä P, Naukkarinen J, Peltonen L, Kaprio J, Yki-lärvinen H. Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295 (1): E148-54.

A53. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (14): 8466-71.

A54. Kim K, Perroud B, Espinal G, Kachinskas D, Austrheim-Smith I, Wolfe B M, Warden, CH. Genes and networks expressed in perioperative omental adipose tissue are correlated with weight loss from Roux-en-Y gastric bypass. *International Journal of Obesity* (2008) 32: 1395-1406.

A55. Gillingham MB, Purnell JQ, Jordan J, Stadler D, Haqq AM, Harding CO. Effects of higher dietary protein intake on energy balance and metabolic control in children with long-chain 3-hydroxy acyl-CoA deshydrogenasa (LCHAD) or trifunctional protein (TFP) deficiency. *Mol Genet Metab.* 2007; 90 (1): 64-69.

A56. Buijs M M, Burggraaf J, Wijbrandts C, de Kam M L, Frölich M, Cohen A F, Romijn J A, Sauerwein H P, Meinders A E, y Pijl H. Blunted lipolytic response to fasting in abdominally obese women: evidence for involvement of hyposomatotropism. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 544-550.

A57. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes.* 2005; 54 (11): 3190-3197.

A58. Shi, L., Reid, L.H., Jones, W.D., Shippy, R., Warrington, J.A., Baker, S.C., Collins, P.J., de Longueville, F., Kawasaki, E.S., Lee, K.Y., *et al.* 2006. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24: 1151-1161.

- 5 A59. Bardag-Gorce F, Oliva J, Dedes J, Li J, French BA, French SW. Chronic ethanol feeding alters hepatocyte memory which is not altered by acute feeding. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33 (4): 684-692.

A60. Trentin L, Giordan M, Dingermann T, Basso G, Te Kronnie G, Marschalek R. Two independent gene signatures in pediatric t (4; 11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Eur J Haematol*. 25 jun 2009.

- 10 A61. Ukena SN, Koenecke C, Geffers R, Fuehner T, Welte T, Ganser A, Buer J, Franzke A. T helper type 2 differentiation is associated with induction of antibacterial defense mechanisms in blood lymphocytes of patients with sarcoidosis. *Immunol Invest*. 2009; 38 (1): 49-66.

- 15 A62. Kennedy L, Vass JK, Haggart DR, Moore S, Burczynski ME, Crowther D, Miele G. Hematopoietic Lineage Transcriptome Stability and Representation in PAXgene Collected Peripheral Blood Utilising SPIA Single-Stranded cDNA Probes for Microarray. *Biomark Insights*. 2008; 3:4 03-417.

20 Ejemplo 6 – Experimento de respuesta a dosis de Spexina en ratones DIO C57BL/6J

El efecto de la Spexina en la pérdida de peso se investigará por inyecciones IP diarias de Spexina (aproximadamente 3 µg/kg/día, aproximadamente 10 µg/kg/día, aproximadamente 30 µg/kg/día y aproximadamente 100 µg/kg/día) en ratones con obesidad inducida por dieta (DIO), en los que todos los sistemas de señalización conocidos están intactos. Los ratones tanto de peso normal como DIO se ensayarán con respecto a niveles en circulación de leptina, insulina y Spexina.

Se ha sintetizado Spexina de uso farmacéutico (un péptido de 14 aminoácidos que normalmente está en circulación en ratones y seres humanos) por química de estado sólido convencional, y se ha purificado a >95 % de identidad por Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA). Este agente se solubilizará en solución salina estéril 1X (pH 7,4) a cuatro concentraciones diferentes, de modo que pueden administrarse dosis de 10 µg/kg/día/QD, 50 µg/kg/día/QD, 250 µg/kg/día/QD o 500 µg/kg/día/QD a 5 ratones en cada grupo de dosis. Se suministrarán dosis totales finales de 10 ng/día, 50 ng/día, 250 ng/día o 500 ng/día, en volúmenes de 0,2 ml/dosis/día mediante inyecciones IP. Por ejemplo, para suministrar 10 ng totales por día, se administrarán dos inyecciones diarias de 5 ng cada una IP (las concentraciones de reserva de Spexina serán de 25 ng/ml). Como alternativa, para suministrar 10 ng por día, también puede administrarse una inyección diaria de 10 ng IP (las concentraciones de reserva de Spexina serán de 50 ng/ml). Las dosis se calculan para dar como resultado niveles fisiológicos de Spexina con alguna latitud introducida para permitir las estimaciones aproximadas basándose en los datos actuales disponibles y la caracterización preliminar de parámetros farmacológicos básicos de Spexina.

Los ratones DIO C57BL/6J de Jackson Labs, cuyo peso promedio es aproximadamente 30 % mayor que sus controles de la misma edad a las 17 semanas, se aclimatarán a las condiciones de laboratorio antes de iniciar los estudios de dosificación de Spexina.

45 Perfiles experimentales

Experimento de respuesta a dosis de Spexina. El objetivo de este experimento será determinar la dosis o las dosis de Spexina para usar en estudios posteriores. Los efectos de Spexina se seguirán por supervisión diaria de los pesos corporales, el consumo de alimentos y agua, y su plasma se ensayará con respecto a leptina, insulina y Spexina periódicamente.

Cepa de ratón	Número
DIO/HFD 60 % (controles negativos sin tratamiento)	5
DIO/HFD 60 % (controles negativos con inyección de solución salina)	5
DIO/HFD 60 % (5 animales a cada una de 4 dosis diferentes) (dosis = 10, 50, 250 y 500 ng de Spexina/inyección/QD)	20
C57BL/6J (controles negativos de inyección de solución salina)	5
C57BL/6J (Spexina a 30 ng/inyección/QD)	5
Total	40

Dosificación de Spexina en diversos modelos murinos de obesidad

Cepa de ratón	Solución salina	Spexina	Leptina (como control +)
Fondo de C57BL/6J como controles	6	6	
DIO/HFD 60 %	6	6	
ob/ob	6	6	
ob/ob tratado con leptina como control positivo			6
db/db	6	6	
Gordo	6	6	
Rechoncho	6	6	
Animales adicionales para experimentos de dosis ajustada	6	6	
subtotales	42	42	6
Total	90		

Total general =130 animales

5 Los estudios descritos en el presente documento se expandirán midiendo y/o analizando Spexina y sus acciones en el hipotálamo mediante técnicas de neurociencia tradicionales, tales como inmunohistoquímica, y por captura de imágenes funcional, tal como exploraciones de PET, de animales vivos en ausencia o presencia de Spexina, así como en ausencia o presencia de Spexina en una diversidad de condiciones fisiológicas.

Ejemplo 7 – EXPERIMENTO DE SPEXINA EN RATONES DIO C57BL/6J

10 La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en adultos y niños de los Estados Unidos, y está ligada a una multitud de comorbilidades, incluyendo resistencia a insulina, el síndrome metabólico, diabetes de tipo 2 y enfermedad de hígado graso. Se usaron micromatrices de genoma humano completo para identificar genes individuales y rutas biológicas cuya expresión está alterada en muestras de grasa omentales y subcutáneas de
15 pacientes obesos. El gen con la infraexpresión más drástica en grasa de sujetos obesos fue Spexina, un péptido recientemente identificado de función desconocida, cuya expresión nunca se ha indicado en grasa. Los datos indican que el mensaje de Spexina está altamente expresado en grasa omental y subcutánea de sujetos humanos de peso normal, pero está drásticamente reducido (aproximadamente 15 veces) en muestras de grasa de sujetos obesos (p<0,00292). Los niveles de péptido Spexina en suero son aproximadamente 10X menores en pacientes obesos que no obesos (p<0,0002), y los niveles de Spexina y leptina en el suero de pacientes obesos y controles de peso normal demuestran una fuerte correlación negativa (r= -0,92). Estos resultados en pacientes humanos y hallazgos paralelos en ratones obesos alimentados con dieta alta en grasas (HFD) indican que la Spexina desempeña un papel en la regulación del consumo de alimentos, el metabolismo de energía y el peso corporal.

25 La Spexina se administró a 10 µg/kg de peso corporal/día IP a ratones obesos alimentados con HFD C57BL/6J. Las inyecciones redujeron el consumo de alimentos y el peso corporal en los ratones con obesidad inducida por HFD, mientras que los ratones HFD de control correspondientes, que recibían solamente vehículo, continuaron aumentando de peso. Se ha mostrado previamente que la regulación de la captación de LCFA por adipocitos es un punto de control importante para la adiposidad corporal, se administró posteriormente Spexina durante 7 semanas a
30 una dosis para mantener el peso corporal en ratones alimentados con HFD obesos (Figura 19).

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> The Trustees of Columbia University in the City of New York
<120> Genes relacionados con la obesidad y sus proteínas y usos de los mismos
<130> JL67637P.EPP
40 <140> EP11833512.4
<141> 14-10-2011
<150> US 61/393.634
<151> 15-10-2010
45 <160> 32
<170> PatentIn versión 3.5
50 <210> 1

ES 2 564 358 T3

<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

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

<210> 2
<211> 638
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ctgacaagat gtcctgtggt actcccaaac tctactccag atggggaggt gcccttaaca	60
ccaagatttt aaaagctcca atttcagagc aagagtcgaa aactcacaga taaagttata	120
gttatttcag ggttctgaaa agacgcagaa catgaaggga ctcagaagtc tggcagcaac	180
aaccttggtc cttttcctgg tgtttgtttt cctgggaaac tccagctgcg ctccgcagag	240
actgttggtg agaaggaact ggactcctca agctatgctc tacctgaaag gggcacaggg	300
tgcgcgcttc atctccgacc agagccggag aaaggacctc tccgacgggc cactgccgga	360
aagacgaagc ccaaattccc aactactaac tattccggag gcagcaacca tcttactggc	420
gtcccttcag aaatcaccag aagatgaaga aaaaaacttt gatcaaacca gattcctgga	480
agacagtctg cttaactggt gaaaatatac tggattatgt ttaattatgg ttctattctc	540
tttgaaaaca tgaaccatgt gaataaaacc ttgggaccct ttttaaaaaa aaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	638

<210> 3
<211> 14

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

	Asn	Trp	Thr	Pro	Gln	Ala	Met	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln
5	1				5					10				
	<210> 4													
	<211> 20													
	<212> ADN													
	<213> Secuencia artificial													
10	<220>													
	<223> Cebador directo													
	<400> 4													
15	atcccaaadc aaagcaccag 20													
	<210> 5													
	<211> 20													
	<212> ADN													
20	<213> Secuencia artificial													
	<220>													
	<223> Cebador inverso													
	<400> 5													
25	ggctttgtga actgggatgt 20													
	<210> 6													
	<211> 20													
30	<212> ADN													
	<213> Secuencia artificial													
	<220>													
	<223> Cebador directo													
35	<400> 6													
	tcagaaagcc cgtgagaagt 20													
	<210> 7													
40	<211> 20													
	<212> ADN													
	<213> Secuencia artificial													
	<220>													
45	<223> Cebador inverso													
	<400> 7													
	atggcctcaa cagaaccatc 20													
50	<210> 8													
	<211> 20													
	<212> ADN													
	<213> Secuencia artificial													
55	<220>													
	<223> Cebador directo													
	<400> 8													
60	ccacctgtct gggctacatt 20													
	<210> 9													
	<211> 20													
	<212> ADN													
	<213> Secuencia artificial													

	<220> <223> Cebador inverso	
5	<400> 9 gcctgatgtc ccattgaact	20
10	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador directo	
	<400> 10 ctggggagtt caggatgtgt	20
20	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 11 tcagcctgct tcaaggaaat	20
30	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador directo	
40	<400> 12 acaccctgga gaacaccatc	20
45	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 13 ctgtcgagca tggctctggaa t	21
55	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo	
60	<400> 14 cagcttctcc ccagactcac	20
65	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Cebador inverso	
5	<400> 15 atgttgggca agctctgaat	20
10	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador directo	
20	<400> 16 gtgccactga atgcatcaac	20
25	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador inverso	
35	<400> 17 ggttttggga atcaggaggt	20
40	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador directo	
50	<400> 18 caaggcaaac ttggagaagg	20
55	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador inverso	
65	<400> 19 gggcagttca tccagaggt	19
	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo	
	<400> 20 ggcactgaag gagaaggaga	20
	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 564 358 T3

	<220>		
	<223> Cebador inverso		
5	<400> 21 gggccgtaca catagtgtt	20	
	<210> 22		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo		
15	<400> 22 ccagctacca tgtcccagat	20	
	<210> 23		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso		
25	<400> 23 tcaggactga ccaactgtgc	20	
	<210> 24		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo		
35	<400> 24 agttctctgt ggcccatgac	20	
	<210> 25		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador inverso		
	<400> 25 ggcatctggt cgtagacctt	20	
50	<210> 26		
	<211> 115		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
55	<400> 26		
	Met Lys Gly Leu Arg Ser Leu Ala Ala Thr Thr Leu Ala Leu Phe Leu		
	1 5 10 15		
	Val Phe Val Phe Leu Gly Asn Ser Ser Cys Ala Pro Gln Arg Leu Leu		
	20 25 30		
	Glu Arg Arg Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Gly Ala Gln		
	35 40 45		

ES 2 564 358 T3

Gly Arg Arg Phe Ile Ser Asp Gln Ser Arg Arg Lys Asp Leu Ser Asp
50 55 60

Arg Pro Leu Pro Glu Arg Arg Ser Pro Asn Pro Gln Leu Leu Thr Ile
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ala Thr Ile Leu Leu Ala Ser Leu Gln Lys Ser Pro Glu
85 90 95

Asp Glu Glu Lys Asn Phe Asp Gln Thr Arg Phe Leu Glu Asp Ser Leu
100 105 110

Leu Asn Trp
115

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> *Pan troglodytes*

5

<400> 27

Met Lys Gly Leu Arg Ser Leu Ala Ala Thr Thr Leu Ala Leu Phe Leu
1 5 10 15

Val Phe Val Phe Leu Gly Asn Ser Ser Cys Ala Pro Gln Arg Leu Leu
20 25 30

Glu Arg Arg Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala
35 40 45

Gln Gly Arg Arg Phe Ile Ser Asp Gln Ser Arg Arg Lys Asp Leu Ser
50 55 60

Asp Arg Pro Leu Pro Glu Arg Arg Ser Pro Asn Pro Arg Leu Leu Thr
65 70 75 80

Ile Pro Glu Ala Ala Thr Ile Leu Leu Ala Ser Leu Gln Lys Ser Pro
85 90 95

Glu Val Gln Ser Ile Ser Asn Cys Ser Ala Asp Ala Arg Leu Ile Gly
100 105 110

Ile His Arg Ala Phe Val Lys Gly
115 120

10

<210> 28
<211> 134
<212> PRT
<213> *Canis lupus*

15

<400> 28

ES 2 564 358 T3

Met Lys Gly Leu Arg Ser Leu Val Ala Thr Thr Leu Ala Leu Phe Leu
1 5 10 15

Val Phe Ser Phe Leu Gly Ser Ser Ser Ser Ala Pro Gln Gly Leu Phe
20 25 30

Glu Arg Arg Asn Trp Thr Pro Gln Ser Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala
35 40 45

Gln Gly Arg Arg Phe Ile Ser Asp Gln Ser Arg Lys Lys Asp Pro Ser
50 55 60

Asp Arg Pro Pro Pro Glu Arg Arg Ser Pro Asn Pro Gln Leu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Pro Glu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Thr Ser Leu Gln Lys Pro Gln
85 90 95

Glu Glu His Ser Asp Asp Ser Val Lys Lys Ala Glu Cys Asp Tyr Gly
100 105 110

Pro Glu Ser Asn Asn Lys Asn Cys Asn Asn Trp Asn Asn Thr Gly Arg
115 120 125

Ser Thr Met Cys Gln Met
130

<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

5

<400> 29

Met Lys Gly Phe Lys Ser Leu Val Val Met Thr Leu Thr Leu Phe Leu
1 5 10 15

Val Phe Ser Phe Met Gly Asn Cys Asn Ser Ala Pro Gln Arg Leu Phe
20 25 30

Glu Arg Arg Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala
35 40 45

Gln Gly Arg Arg Phe Leu Ser Asp Gln Ser Arg Arg Lys Asp Leu Ser
50 55 60

Asp Arg Pro Pro Leu Glu Arg Arg Ser Pro Asn Ser Gln Gln Leu Thr
65 70 75 80

Leu Pro Glu Ala Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Lys Pro Gln
85 90 95

Glu Ala Gly Asp Glu Asn Leu Asp Gln Thr Arg Phe Leu Glu Asp Ser
100 105 110

Leu Leu Asn Trp
115

10 <210> 30

<211> 76
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 30

Met	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Lys	Glu	Leu	Ala	Asp	Arg	Pro	Pro	Pro	Glu	Arg	Arg	Asn	Pro
			20					25						30	
Asp	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Leu	Ala
		35					40						45		
Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Gln	Lys	Gly	Ala	Asp	Glu	Gly	Gly	Asn	Phe	Asp
	50					55						60			
Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	Asp	Arg	Leu	Phe	Asn	Trp				
65					70					75					

<210> 31
<211> 114
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 31

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

Tyr Trp

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de spexina amidado sintético
<400> 32

Asn	Trp	Thr	Pro	Gln	Ala	Met	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln
1				5						10			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en uno o más de:
 - el tratamiento de obesidad o un trastorno asociado con obesidad en un sujeto obeso;
 - para promover la saciedad en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad;
 - 10 para promover la pérdida de peso en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad;
 - para reducir los niveles de leptina en suero en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad;
 - 15 para reducir la captación de ácidos grasos de cadena larga en tejido de adipocitos en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad;
 - para reducir el consumo de alimentos en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad; y
 - para reducir el consumo de ácidos grasos en el tejido cardíaco o tejido hepático en un sujeto obeso o un sujeto obeso aquejado de un trastorno asociado con la obesidad.
 - 20
- 25 2. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el sujeto es un ser humano o animal no humano.
- 30 3. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el animal no humano es un ratón, rata, perro o gato.
- 35 4. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el trastorno asociado con la obesidad comprende un trastorno metabólico, hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, un trastorno relacionado con lípidos, diabetes mellitus de tipo II, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño, cáncer, síndrome de ovario poliquístico (SOP), o una combinación de los mismos.
- 40 5. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el trastorno metabólico comprende hiperglucemia, resistencia a insulina, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, o una combinación de los mismos.
- 45 6. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el trastorno relacionado con lípidos comprende aterosclerosis, lipodistrofia por VIH, enfermedad cardíaca coronaria, dislipidemia, o una combinación de los mismos.
- 50 7. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 30 kg/m².
- 55 8. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor de aproximadamente 35 kg/m².
9. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto presenta una reducción en la masa de tejido adiposo después de tratamiento con un polipéptido que comprende SEC ID N°: 3.
- 60 10. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 1 ng/ml en el suero.
11. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 3 ng/ml en el suero.

12. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 10 ng/ml en el suero.
- 5 13. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 30 ng/ml en el suero.
- 10 14. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 100 ng/ml en el suero.
- 15 15. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 250 ng/ml en el suero.
- 20 16. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad administrada da como resultado al menos aproximadamente 500 ng/ml en el suero.
- 25 17. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido se administra al menos una vez al día o al menos dos veces al día.
- 30 18. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido se administra durante al menos 1 semana, durante al menos 2 semanas, durante al menos 3 semanas, durante al menos 4 semanas, durante al menos 5 semanas, durante al menos 6 semanas, durante al menos 8 semanas, durante al menos 10 semanas, durante al menos 12 semanas, durante al menos 24 semanas, o durante al menos 48 semanas.
- 35 19. Un polipéptido que consiste en al menos 85 % de identidad con SEC ID N°: 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido se administra durante al menos 1 año, durante al menos 1,5 años, durante al menos 2 años, durante al menos 2,5 años, o durante al menos 5 años.

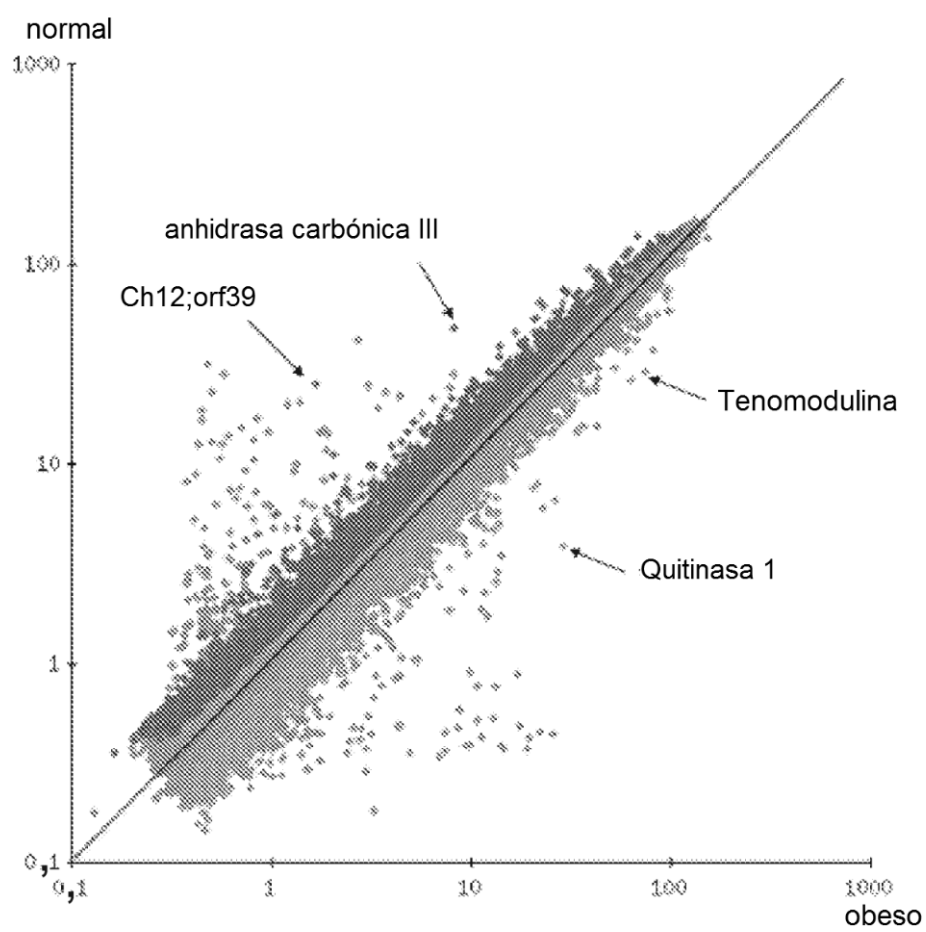


FIG. 1

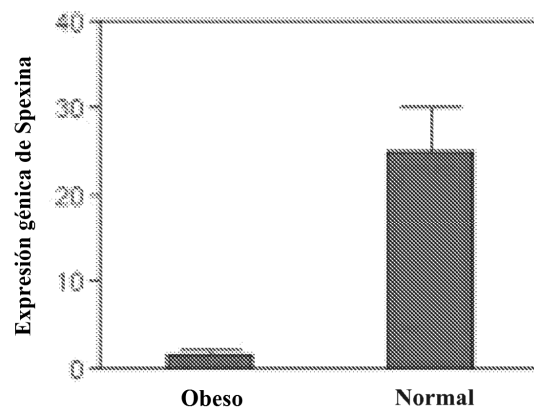


FIG. 2

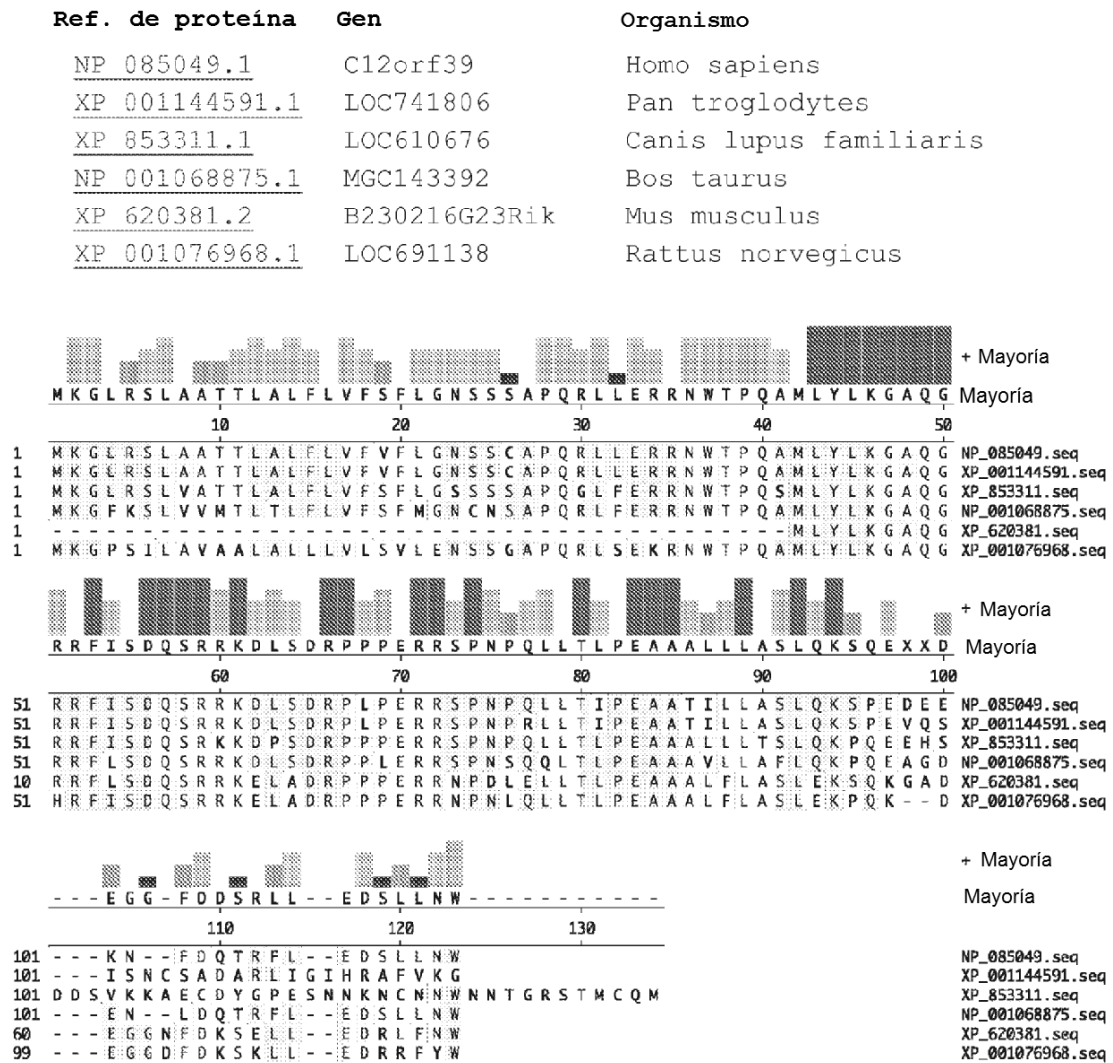


FIG. 3

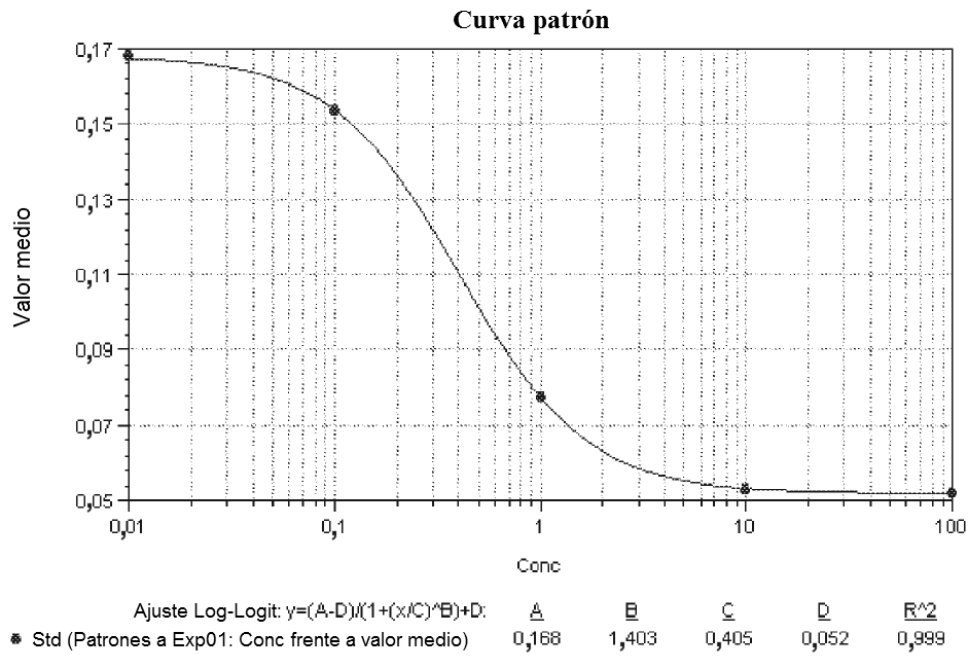


FIG. 4

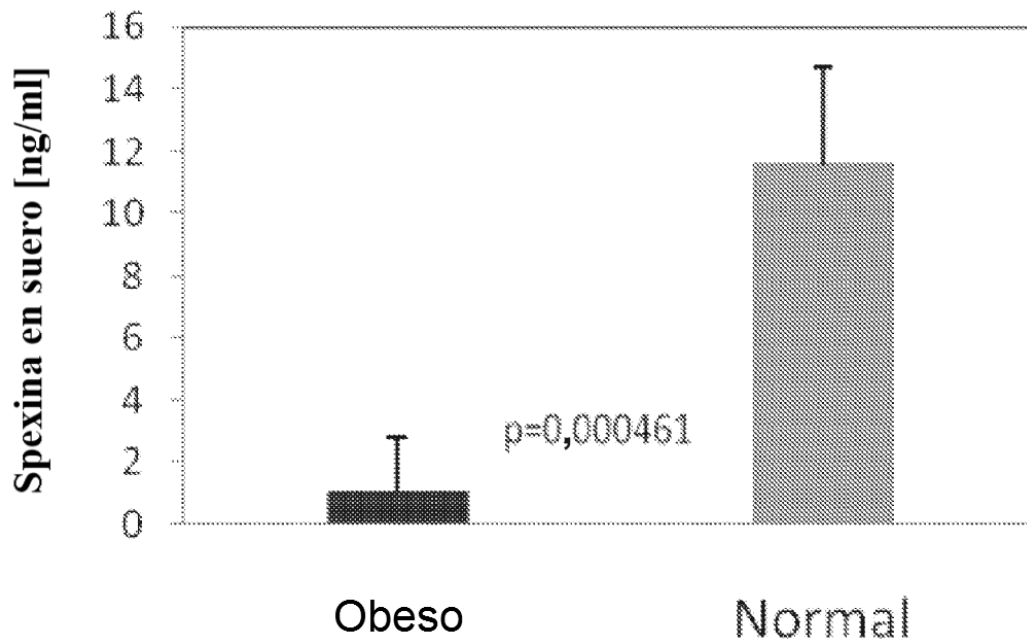


FIG. 5

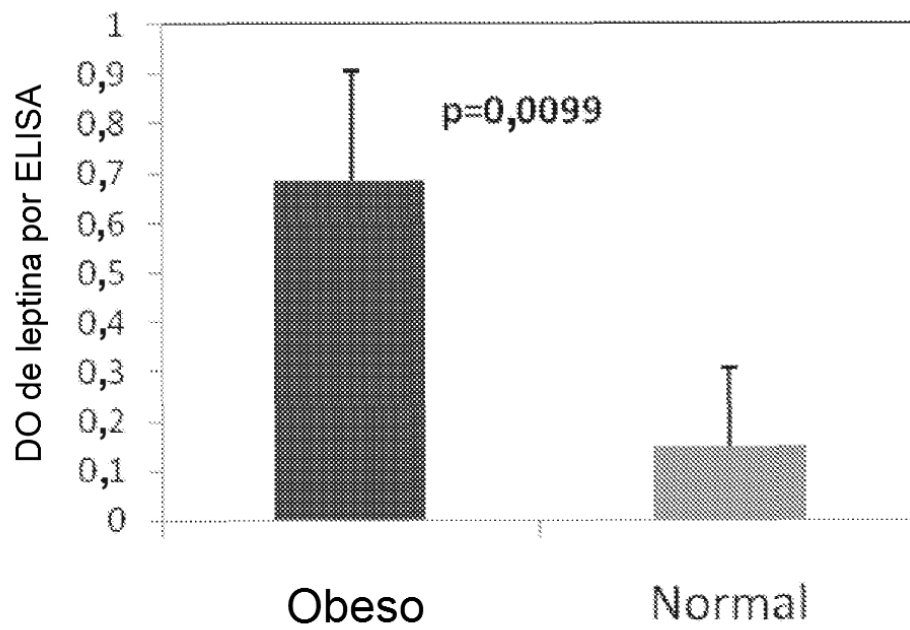


FIG. 6

Leptina frente a Spexina en suero

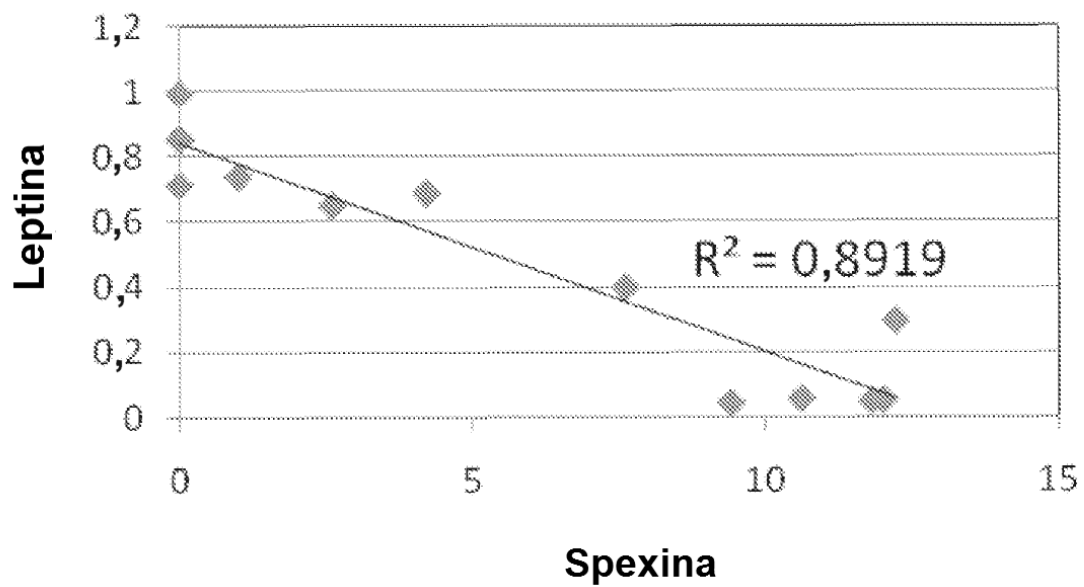


FIG. 7

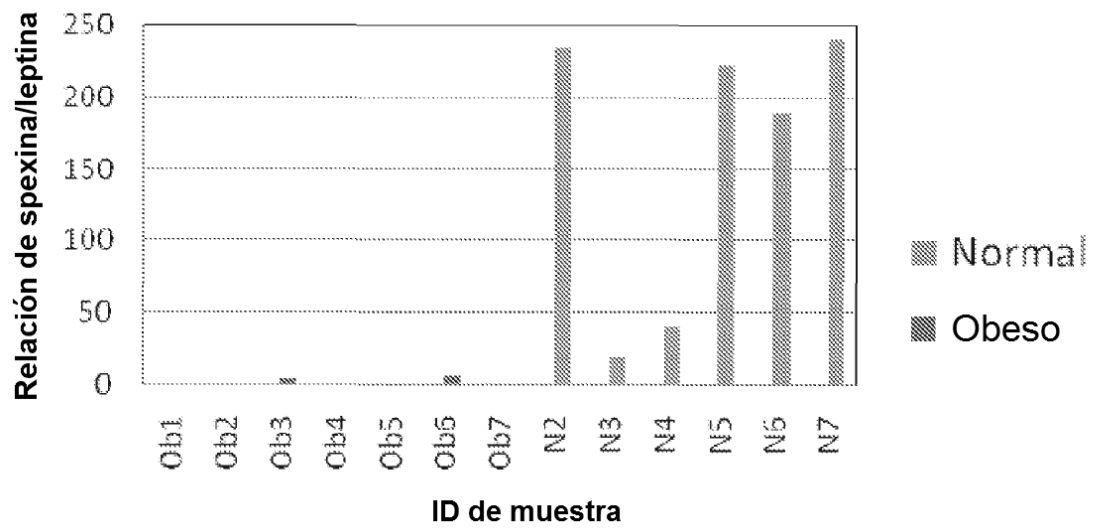


FIG. 8

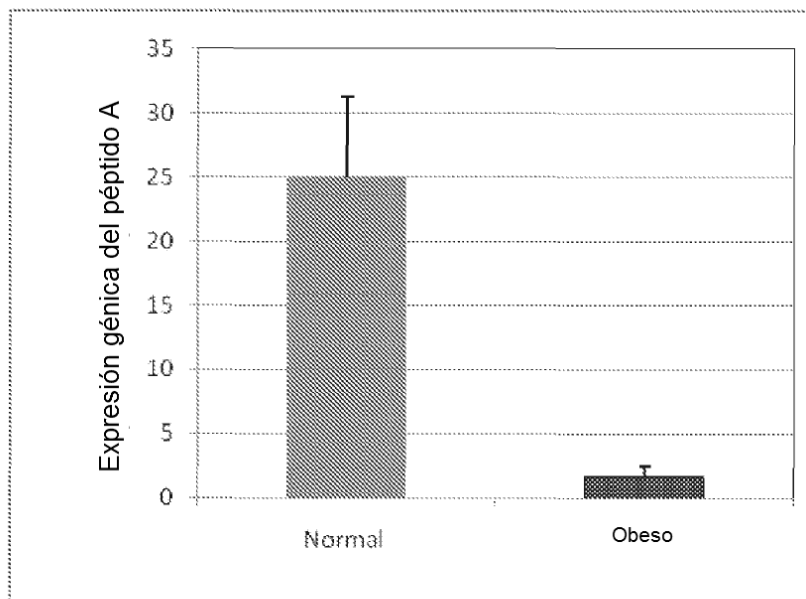


FIG. 9

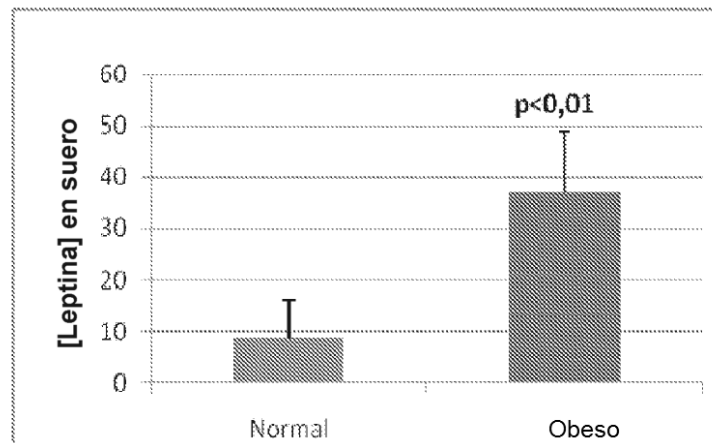
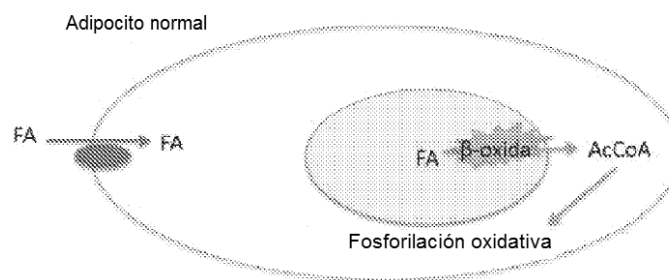


FIG. 10

A



B

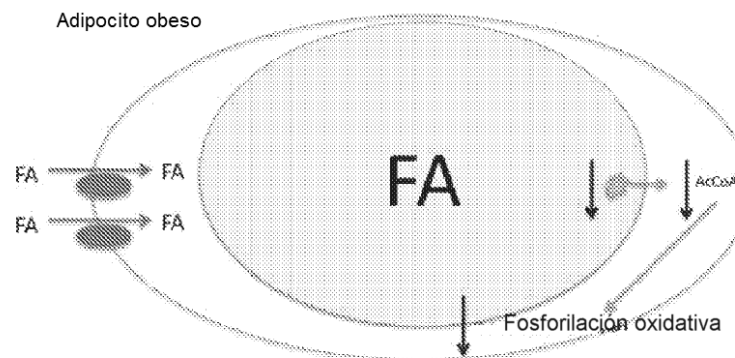


FIG. 11

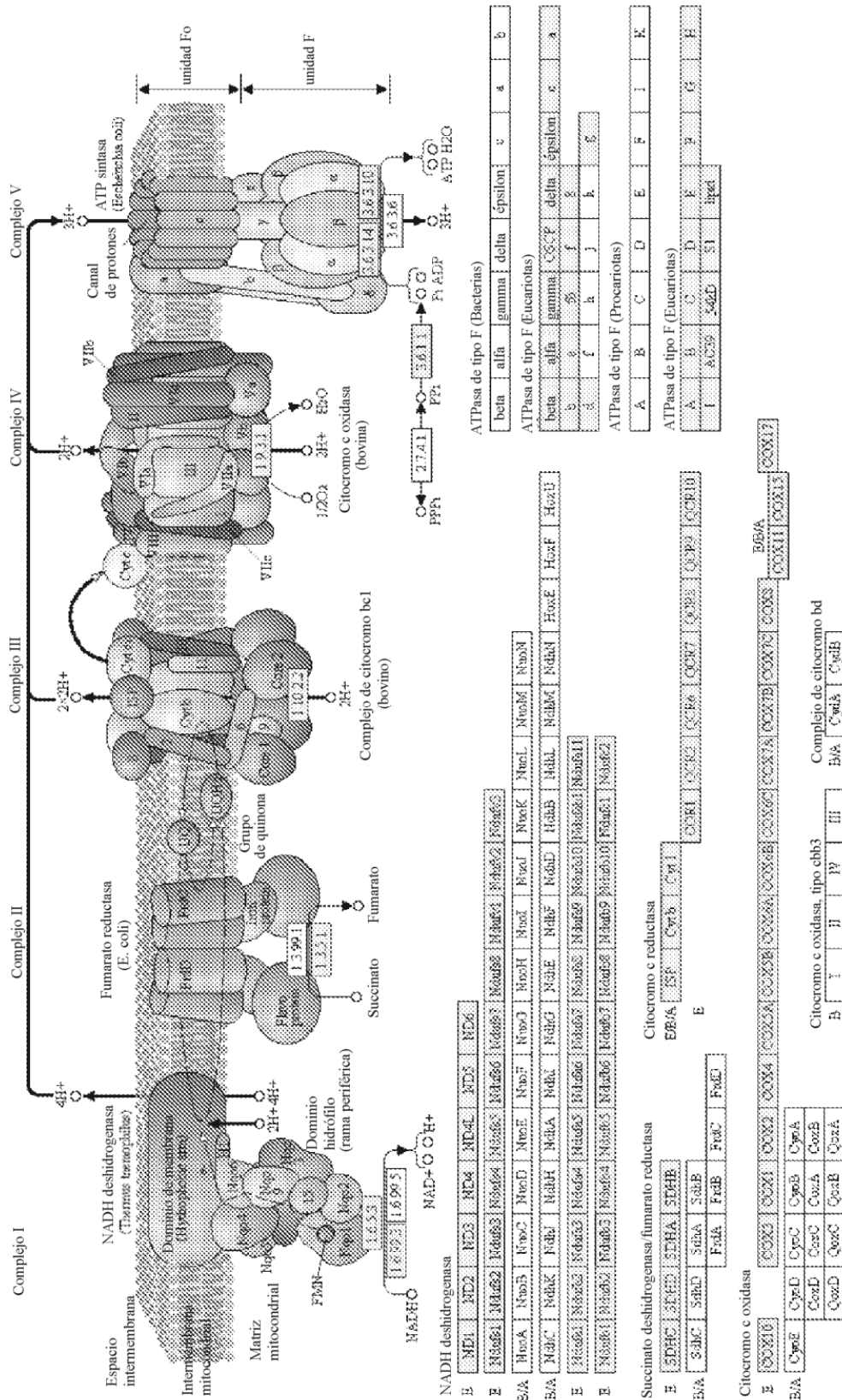


FIG. 12

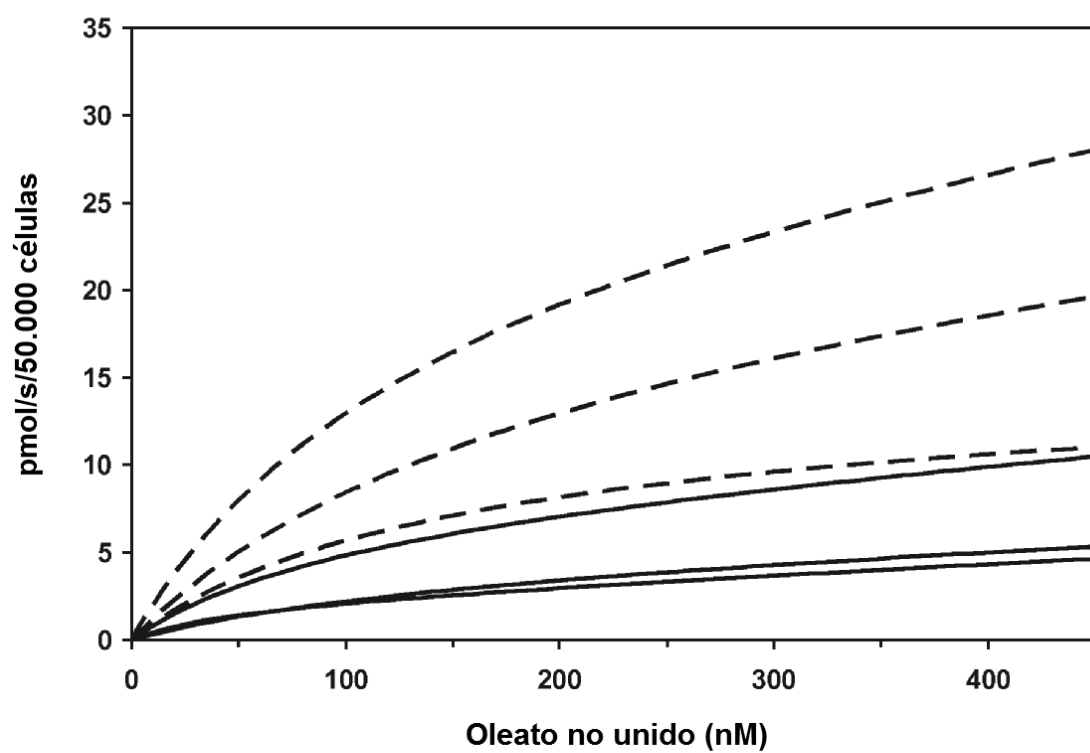


FIG. 13

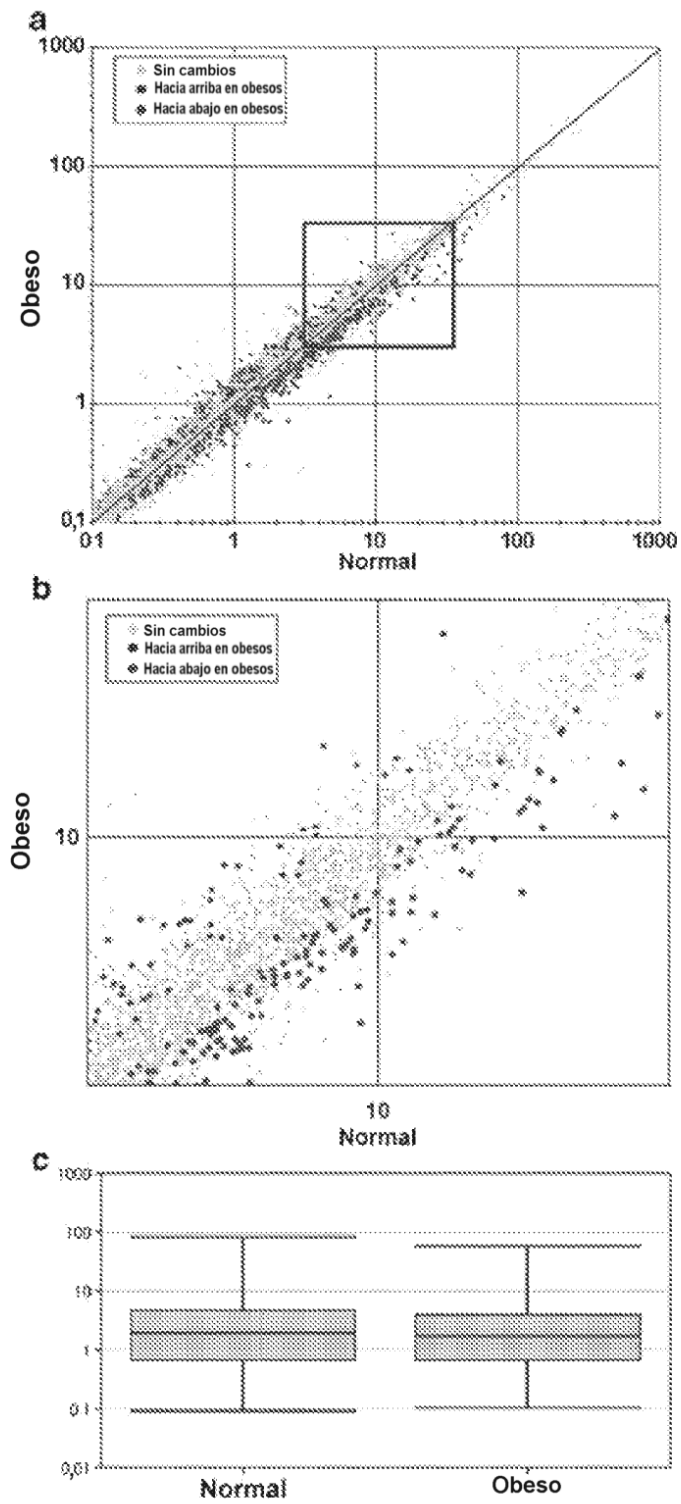


FIG. 14

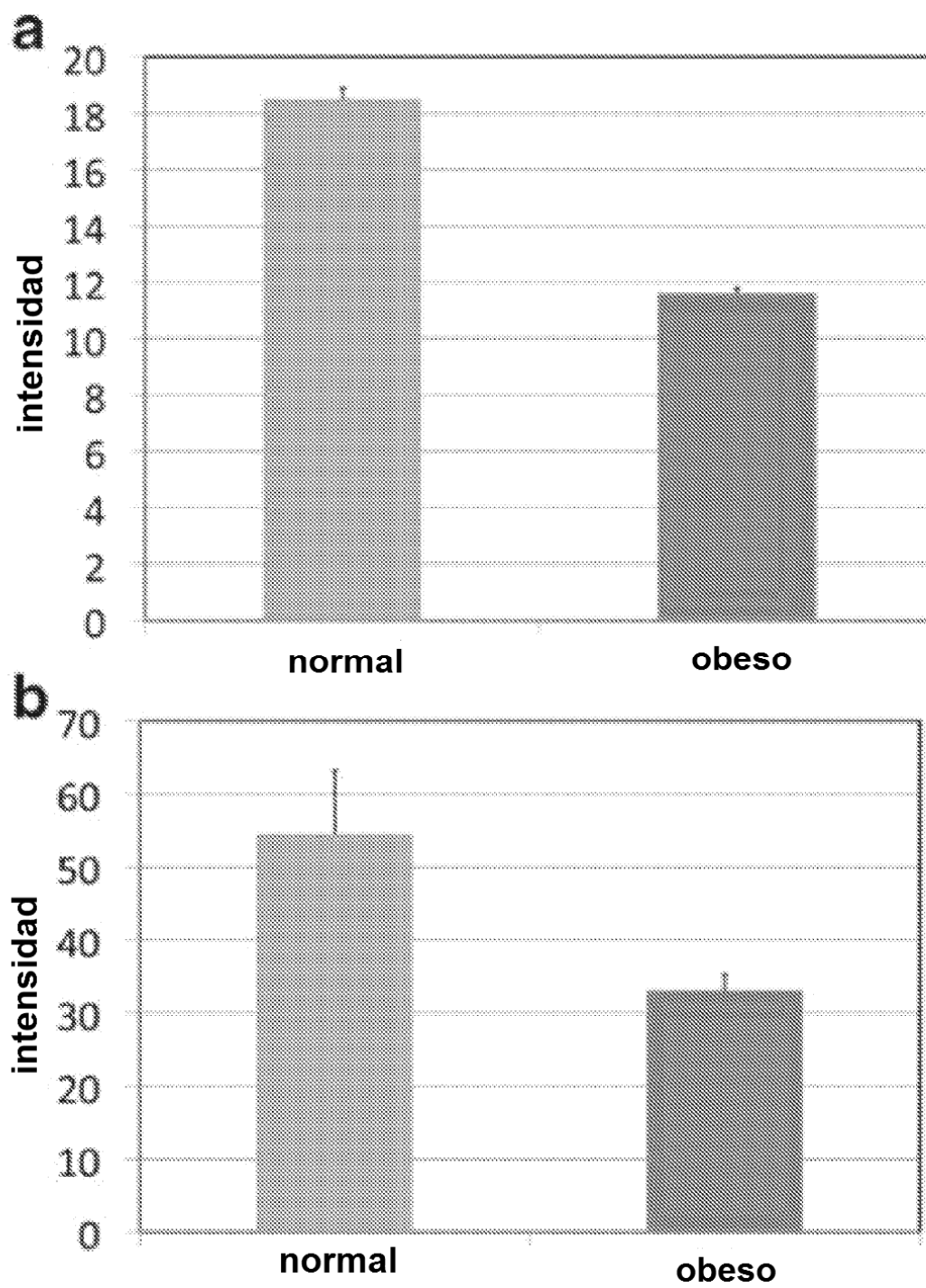
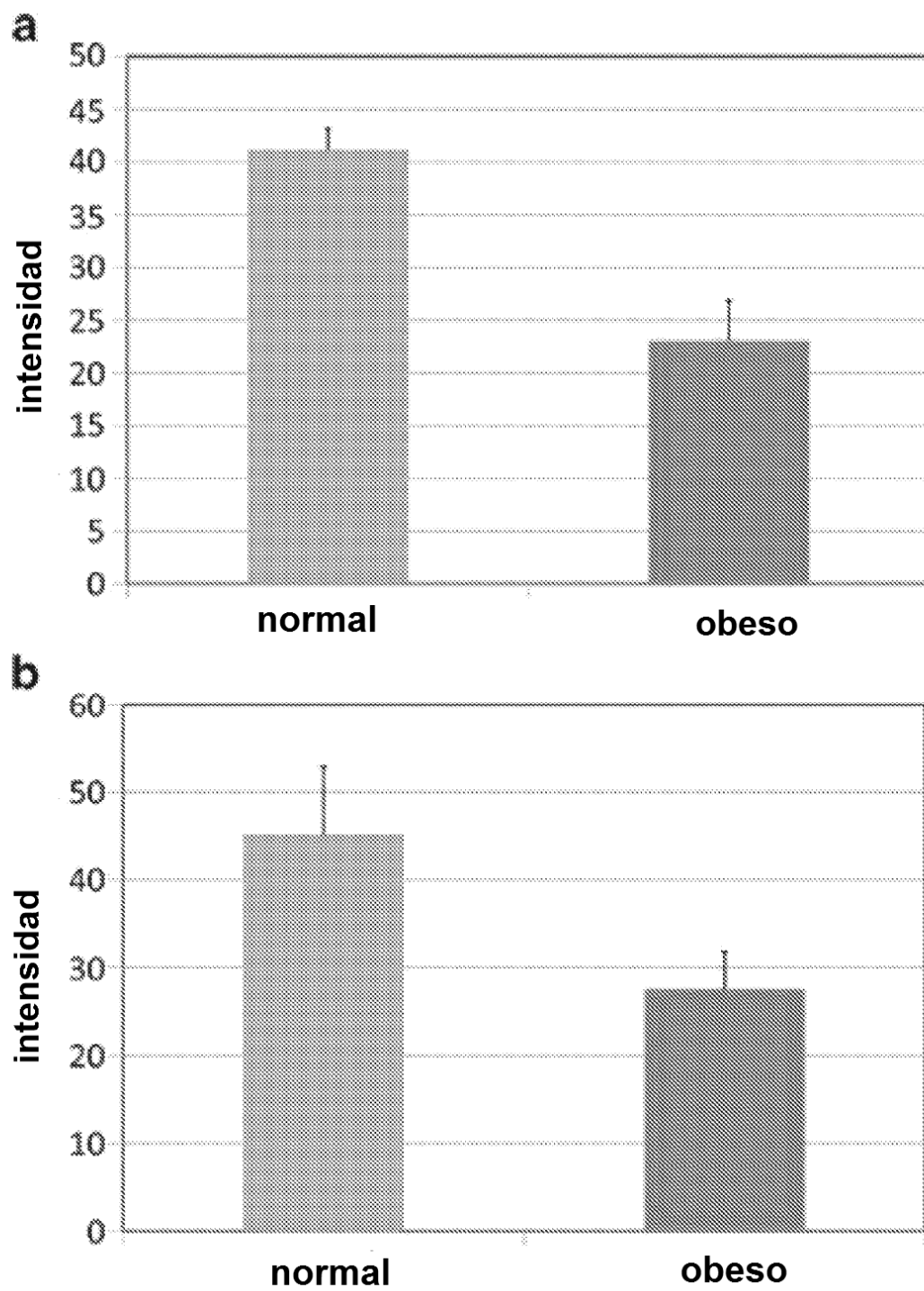
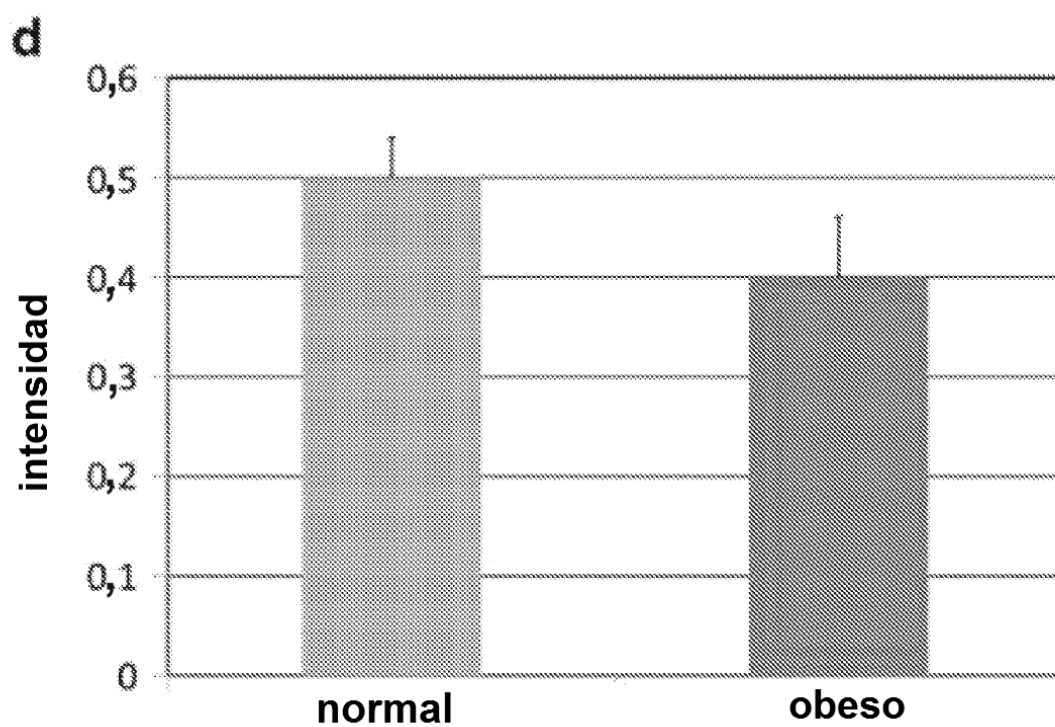
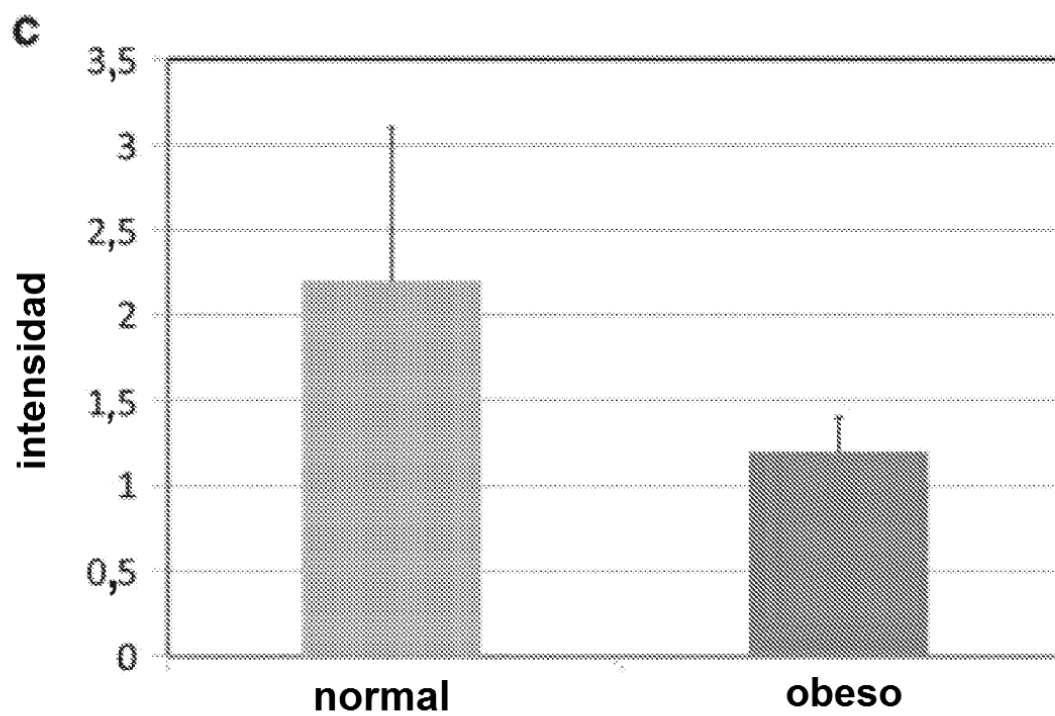


FIG. 15



FIGS. 16A-B



FIGS. 16C-D

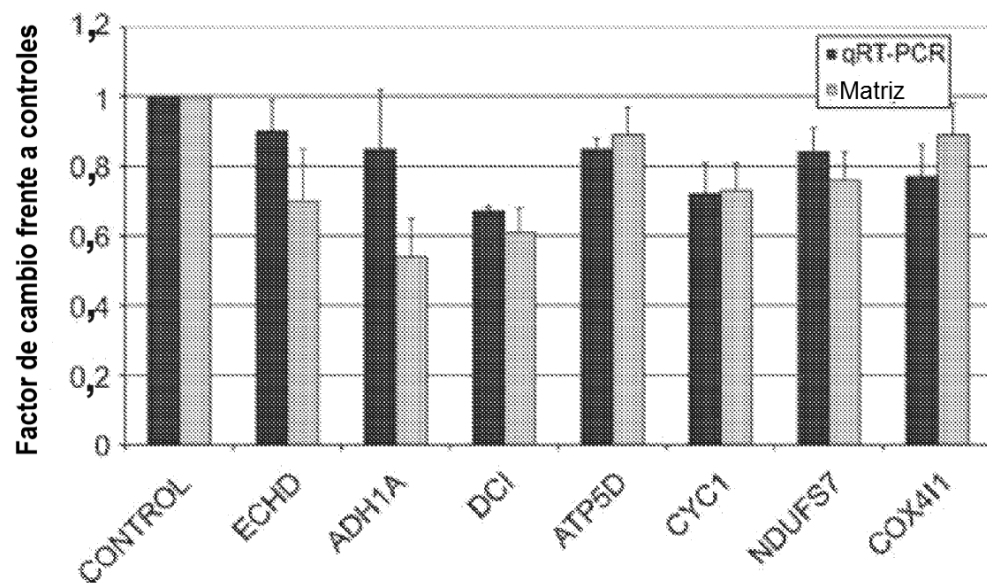


FIG. 17

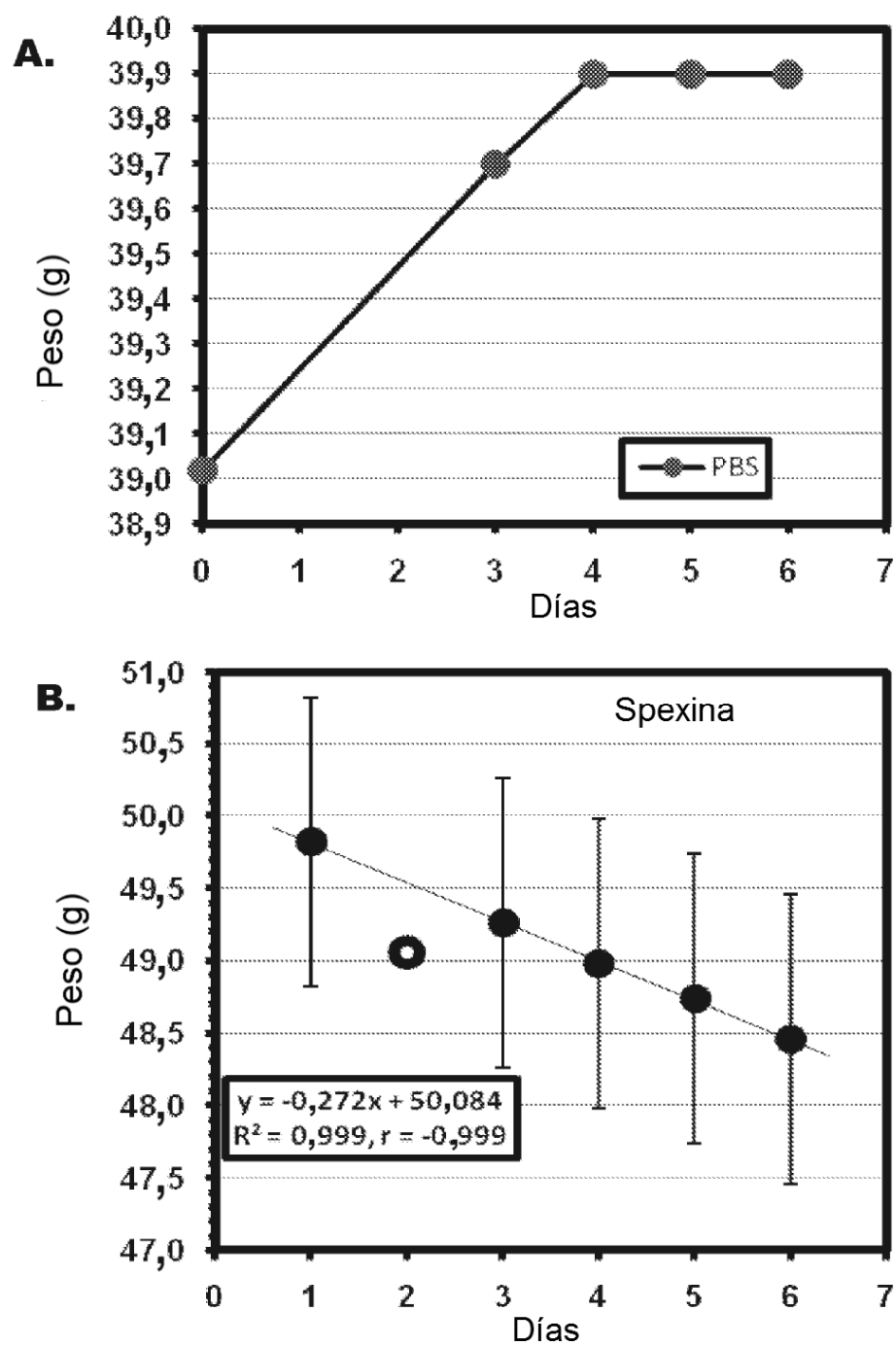


FIG. 18

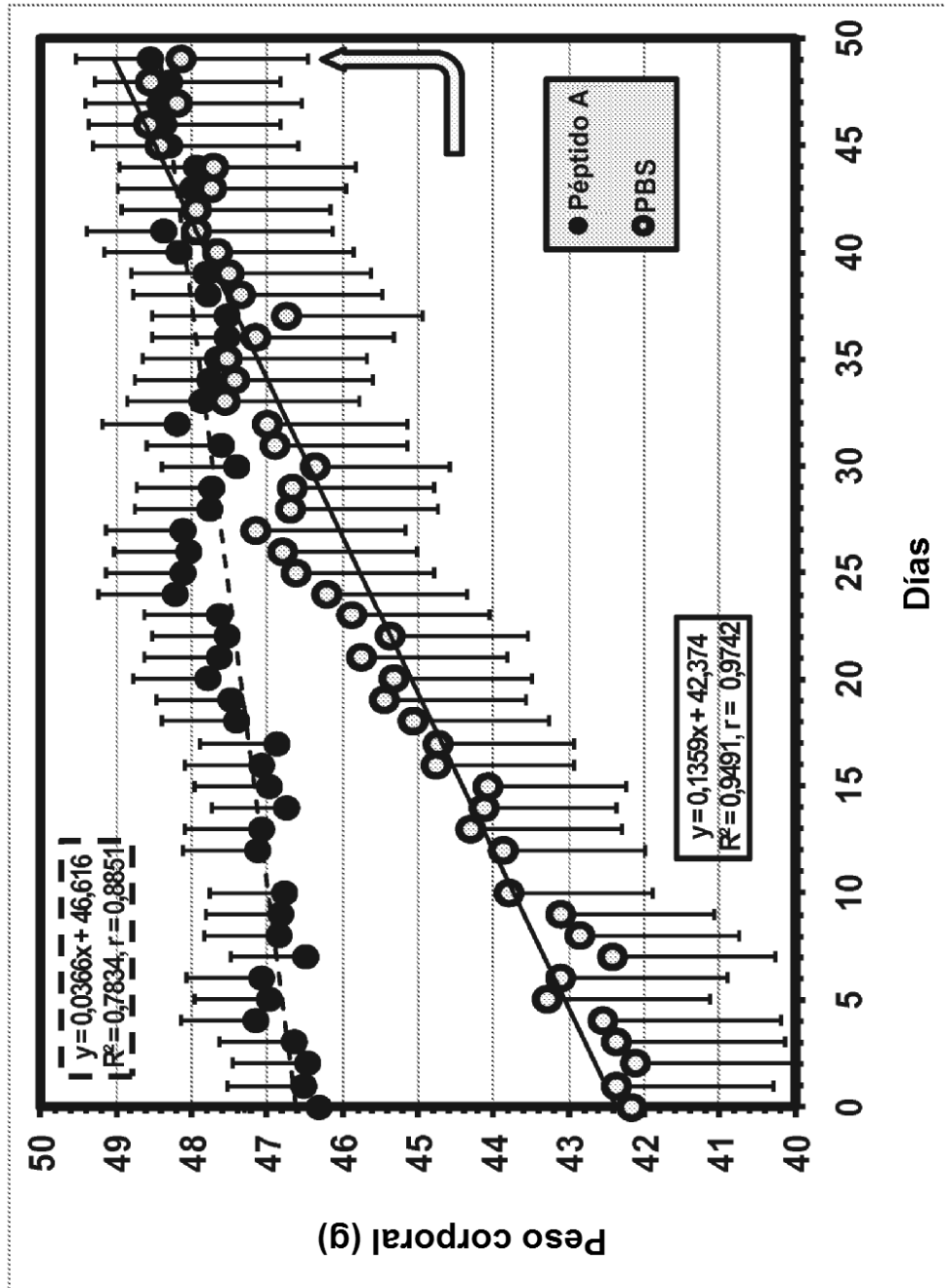


FIG. 19

**Expresión de ARNm
de spexina humana
por tejido**
(Compilación de datos de Affymetrix
del buscador de genoma de la UCSD)

Relaciones		Absoluto
Relaciones	sangre completa	tráquea
	BM-CD34+	cuerpo uterino
	BM-CD105+ endotelial	útero
	BM-CD33+ mielóide	músculo esquelético
	BM-CD71+ temprano eritroide	lengua
	médula ósea	músculo esquelético
	ganglio linfático	miocitos cardiacos
	amígdala	corazón
	timo	nudo aurioventricular
	ganglio de la raíz dorsal	islotos pancreáticos
Relaciones	ganglio cervical superior	páncreas
	ganglio del trigémino	glándula salival
	ganglio ciliar	próstata
	médula espinal	corteza adrenal
	bulbo raquídeo	glándula adrenal
	puente	glándula hipofisaria
	bulbo olfatorio	tiroides
	globus pallidus	tiroides fetal
	núcleo caudado	adipocito
	núcleo subtalámico	piel
Relaciones	talamo	apéndice
	hipotálamo	adenocarcinoma colorrectal
	amígdala	leucemia crónica mielógena (K562)
	pedunculos cerebelosos	linfoma Burkitts Daudi
	cerebelo	leucemia promielocítica (HL60)
	corteza cingulada	leucemia Burkitts Raji
	corteza prefrontal	linfoblastos 721 B
	lóbulo occipital	leucemia linfoblástica (mol-4)
	lóbulo parietal	PB-CD19+ linfocitos B
	lóbulo temporal	PB-CD8+ linfocitos T
Relaciones	cerebro completo	PB-CD4+ linfocitos T
	cerebro fetal	PB-CD56+ linfocito NK
		PB-CD14+ monocitos
		PB-BDCA4+ células dendríticas

Datos de Atlas 2 de expresión GNF de microplacas de U133A y GNF1H

Relaciones		Absoluto
Relaciones	túbulo seminífero testicular	
	intersticial testicular	
	célula germinal testicular	
	célula de Leydig testicular	
Relaciones	testículo	
	ovario	
	placenta	
	hígado	
Relaciones	hígado fetal	
	riñón	
	pulmón	
	pulmón fetal	
Relaciones	células epiteliales bronquiales	

Los conjuntos de microplacas U133A y GNF1H
juntos completan el conjunto de matriz humana
de Affymetrix

FIG. 20