



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 909**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01271116 .4**

86 Fecha de presentación : **17.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1344821**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Nueva agrecanasa.**

30 Prioridad: **18.12.2000 JP 2000-384300**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **Astellas Pharma Inc.**
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es: **Yamaji, Noboru;**
Nishimura, Kouichi y
Abe, Kunitake

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Nueva agrecanasa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva agrecanasa.

Técnica anterior

10

Las enfermedades de las articulaciones son enfermedades que muestran lesión y degeneración del cartílago de las articulaciones como los principales estados mórbidos. Si bien una enfermedad que tiene el número más numeroso de pacientes entre las enfermedades de las articulaciones es la osteoartritis (OA) (Elders M. J., J. Rheumatol., 27, Suppl., 60, 6-8, 2000), los fármacos antiinflamatorios analgésicos y las preparaciones de ácido hialurónico sólo se usan en el procedimiento terapéutico actual como un tratamiento sintomático con el fin de aliviar dolores acompañados por la degeneración de cartílago y la destrucción del cartílago subcondral, de manera que no puede decirse que estén ejerciendo suficientes efectos terapéuticos (Dieppe P., Scand. J. Rheumatol., 29, 279-281, 2000).

El cartílago de las articulaciones es un tejido compuesto principalmente por colágeno de tipo II y agrecano, que es un proteoglicano específico de cartílago, y la degradación y degeneración de ambos se observa en las enfermedades de las articulaciones. Debido a esto, durante mucho tiempo se ha considerado que el control de la degradación y la degeneración de estos componentes de matriz extracelular llevaría al tratamiento de enfermedades de las articulaciones, de manera que positivamente se ha intentado identificar las proteasas afectadas por la degradación (colagenasa y agrecanasa) y seleccionar sus inhibidores y desarrollarlos como medicamentos.

25

Como las proteasas que tienen actividades de colagenasa, se han identificado las metaloproteasas de matriz (MMP1, MMP8, MMP13, MMP14 y similares), y se han descubierto sus inhibidores selectivos. Sin embargo, a pesar de los intentos para desarrollar un gran número de inhibidores de MMP que tienen actividades de inhibición de colagenasa como fármacos terapéuticos para enfermedades de las articulaciones que incluyen OA y artritis reumatoide (AR), los inhibidores de MMP que van a usarse en estas enfermedades como la indicación todavía no se han puesto en el mercado (Greenwald R. A., Ann. New York Acad. Sci., 878, 413-419, 1999). En tales condiciones, la atención se ha dirigido a la agrecanasa que degrada selectivamente agrecano, que es otro componente constituyente principal del cartílago de las articulaciones.

Se ha descrito un papel relacionado con enfermedades de las articulaciones de una enzima agrecanasa que escinde agrecano en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ mediante los informes de Sandy y col. y Lohmander y col. declarando que todos los fragmentos del agrecano principal digerido encontrados en el fluido sinovial de pacientes con artritis humana fueron generados mediante la escisión en el sitio de digestión de la agrecanasa (Sandy J.D. y col., J. Clin. Invest., 89, 1512 - 1516, 1992; Lohmander L.S. y col., Arthritis Rheum., 36, 1214 - 1222, 1993). Por otra parte, se ha sabido que en un sistema de cultivo explante *in vitro* del cartílago de las articulaciones, la degradación del agrecano se produce en primer lugar por la inducción de IL-1 y luego se acelera la degradación de colágeno de tipo II (Dingle L.T. y col., Ann. Rheum. Dis., 34, 303 - 311, 1975; Cawston T.E. y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 215, 377 - 385, 1995; Kozaci L.D. y col., Arthritis Rheum., 40, 164 - 174, 1997). Se ha informado de que la degradación de agrecano también tiene preferencia sobre la degradación de colágeno de tipo II en un modelo de artritis en ratón (van Meurs J.B. y col., Arthritis Rheum., 42, 1128 - 1139, 1999). Estos informes sugieren una posibilidad de que la degradación de colágeno de tipo II pueda controlarse inhibiendo la degradación de agrecano precedente.

Sin embargo, aunque las características bioquímicas muestran que es una metaloproteasa que está localizada sobre el exterior de las células, que las cadenas de azúcar contribuyen a un reconocimiento de sustrato y que una actividad está inducida por IL-1, TNF o ácido retinoico, la agrecanasa no se ha identificado durante mucho tiempo como una causa de enfermedades de las articulaciones. Recientemente se notificaron ADAMTS4 (agrecanasa-11; Tortorella M. D. y col., Science, 284, 1664-1666, 1999) y ADAMTS11 (agrecanasa-2; Abbaszade I. y col., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) como la proteasa que tiene la actividad agrecanasa. Sin embargo, las expresiones génicas de estas proteasas no aumentan en el cartílago de OA humana y no están inducidas por IL-1, TNF o ácido retinoico (se sabe que estos compuestos inducen la actividad agrecanasa en un sistema de cultivo explante de cartílago articular de rodilla humana) y por tanto se sugirió la presencia de otra proteasa que está relacionada con enfermedades de las articulaciones (Flannery C. R. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999).

Además, recientemente se han identificado loci cromosomales en los que están localizados los factores genéticos que están relacionados con OA (un locus con susceptibilidad por OA) según una investigación genética de pacientes que padecen OA o familias que tienen un fuerte historial familiar de OA. Por ejemplo, se han informado de 11q (Chapman K. y col., Am. J. Hum. Genet., 65, 167-174, 1999), 4q12-4q21.2, 6q21.1-6q22.1, 16p13.1-16q12.1 y 16q21-16q23 (Loughlin J. y col., Am. J. Hum. Genet., 65, 1795-1798, 1999) como los loci con susceptibilidad por OA.

65 **Descripción de la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar un documento WO03/027282A describe proteínas que pertenecen a la familia S, concretamente ADAMTS-15, -16, -17, -18 y -19. La nueva agrecanasa causante de enfermedades de

las articulaciones, que es útil como una herramienta de selección para un agente para tratar enfermedades de las articulaciones, un polinucleótido novedoso que codifica la agrecanasa y un sistema de selección conveniente para obtener una sustancia útil como un agente para tratar enfermedades de las articulaciones.

Con el propósito de solucionar los problemas anteriormente mencionados, los presentes inventores han realizado estudios intensivos y, como resultado, obtuvieron un gen que codifica una agrecanasa [es decir, MDTS8 (metaloproteasa y desintegrina con 8 repeticiones de trombospondina de tipo 1)] causante de enfermedades de las articulaciones, y se expresó la proteína agrecanasa. Los inventores mostraron que la proteína muestra una actividad agrecanasa, que la expresión de la proteína está inducida por la diferenciación a células del cartílago y que la localización cromosómica de MDTS8 está en el locus que se identifica como un locus susceptible de OA (una de las enfermedades de las articulaciones) y, por tanto, se confirmó que el polipéptido de la presente invención es una agrecanasa causante de enfermedades de las articulaciones y útil como una herramienta de selección para un agente para tratar enfermedades de las articulaciones. Además, los inventores establecieron un procedimiento para detectar si un compuesto que va a probarse inhibe o no una actividad agrecanasa causante de enfermedades de las articulaciones usando la proteína, y un procedimiento para seleccionar un agente para tratar enfermedades de las articulaciones usando el procedimiento de detección.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a:

[1] un polipéptido que muestra una actividad agrecanasa y que comprende (1) una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 o (2) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 10 aminoácidos se delecionan, se sustituyen y/o se insertan en una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2;

[2] el polipéptido del punto [1], que comprende una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra una actividad agrecanasa;

[3] un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% o más de homología con una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra una actividad agrecanasa;

[4] un polipéptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2;

[5] un polinucleótido que codifica el polipéptido de los puntos [1] a [4];

[6] un vector de expresión que comprende el polinucleótido del punto [5];

[7] una célula transfectada con el vector de expresión del punto [6];

[8] un procedimiento para detectar si un compuesto que va a probarse inhibe o no una actividad agrecanasa de un polipéptido de los puntos [1] a [4], que comprende las etapas de:

poner en contacto (1) dicho polipéptido, (2) un polipéptido de sustrato que puede digerirse con agrecanasa, y (3) el compuesto que va a probarse; y

analizar una digestión del polipéptido de sustrato;

[9] un procedimiento para seleccionar una sustancia que inhibe una actividad agrecanasa de un polipéptido de los puntos [1] a [4], que comprende las etapas de:

detectar mediante el procedimiento del punto [10]; y

seleccionar una sustancia que inhibe una actividad agrecanasa;

[10] procedimiento para seleccionar una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones mediante el procedimiento del punto [9]; y

[11] un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une al polipéptido de los puntos [1] a [4].

El término “agrecano” como se usa en este documento significa un proteoglicano que está localizado en una matriz extracelular del cartílago articular y está constituida por una proteína central que comprende dos dominios esféricos (G1 y G2) en el extremo de N, regiones de unión de glicosaminoglicano y un dominio esférico (G3) en el extremo de C, y sulfato de condroitina y queratán sulfato de glicosaminoglicano que modifican la proteína central.

El término “actividad agrecanasa” como se usa en este documento significa una actividad de digerir selectivamente agrecano humano presente en cartílago articular entre el residuo 373 de ácido glutámico y el residuo 374 de alanina (denominado en lo sucesivo “entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴”).

El término “agrecanasa” como se usa en este documento significa una metaloproteasa que muestra la actividad agrecanasa. La agrecanasa tiene generalmente una secuencia consenso de unión a cinc [es decir, His-Glu-Xaa-Xaa-His (Xaa significa un aminoácido arbitrario.); la secuencia de ID SEC N°: 24].

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se explicará en detalle en lo sucesivo.

5 [1] *El polipéptido de la presente invención*

El polipéptido de la presente invención incluye

(1) un polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2;

10 (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra la actividad agrecanasa;

15 (3) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 10 aminoácidos se delecionan, se sustituyen y/o se insertan en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra la actividad agrecanasa (denominada en lo sucesivo una variación funcionalmente equivalente); y

20 (4) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra la actividad agrecanasa (denominado en lo sucesivo un polipéptido homólogo).

Entre los polipéptidos (1) a (4) como polipéptido de la presente invención se prefiere un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la que se induce una expresión mediante diferenciación a células de cartílago.

25 (1) *El polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2*

Como polipéptido de la presente invención, el más preferido es el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2. El polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 muestra la actividad agrecanasa y es una agrecanasa humana novedosa que está constituida por 1221 residuos de aminoácidos. Como se muestra en el ejemplo 5, la expresión del polipéptido está inducida por la diferenciación a células del cartílago. Además, como se muestra en el ejemplo 6, el gel del mismo está localizado en un cromosoma que está relacionado con osteoartritis (OA) y, por tanto, se considera que el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 es una agrecanasa causante de enfermedades de las articulaciones.

35 (2) *El polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y que muestra la actividad agrecanasa*

El “polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y que muestra la actividad agre-canasa” como el polipéptido de la presente invención incluye, por ejemplo, el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y un polipéptido en el que una secuencia del marcador apropiado o similar se añade al extremo de N y/o el extremo de C del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 (es decir, un polipéptido de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos en el que una secuencia del marcador apropiado o similar se añade al extremo de N y/o al extremo de C de la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2).

45 Como secuencia del marcador puede usarse una secuencia para llevar a cabo rápidamente la confirmación de expresión de polipéptido, confirmación de la localización intracelular del mismo, purificación del mismo o similares. Como secuencia puede mencionarse, por ejemplo, una marca FLAG, una marca de hexa-histidina (es decir, una marca His), una marca de hemaglutinina o un epítipo myc.

50 No está particularmente limitado un procedimiento para confirmar si un polipéptido que va a probarse muestra o no la “actividad agrecanasa” como se usa en este documento (denominada algunas veces en lo sucesivo un “procedimiento para confirmar la actividad agrecanasa”). Puede confirmarse, por ejemplo, poniendo en contacto un polipéptido que va a probarse (tal como células, un sobrenadante de cultivo de tejido, o un extracto de tejido que contiene el polipéptido de prueba, o una preparación purificada o parcialmente purificada del polipéptido de prueba) con un sustrato de agrecanasa (tal como agrecano humano) en un tampón apropiado [tal como Tris-HCl 50 mmol/l (pH 7,4)], y entonces analizar si el sustrato se digiere o no en el sitio de escisión (por ejemplo, entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ en agrecano humano), preferentemente mediante un procedimiento descrito en el ejemplo 4.

60 El sustrato de agrecanasa no está particularmente limitado, mientras que sea un polipéptido que puede digerirse con agrecanasa (denominado en lo sucesivo un polipéptido de sustrato), pero puede mencionarse, por ejemplo, agrecano derivado de ser humano u otros animales, un fragmento del agrecano (un fragmento que puede digerirse con agrecanasa) o un polipéptido de fusión del agrecano o el fragmento del mismo y una secuencia del marcador apropiada (tal como una marca FLAG, una marca His, una marca de hemaglutinina o un epítipo myc, preferentemente una marca FLAG o una marca His) (un polipéptido de fusión que puede digerirse con agrecanasa). Más particularmente pueden usarse, por ejemplo, los agrecanos purificados de tejido cartilaginoso de ser humano u otros animales, agrecanos recombinantes (tales como agrecano recombinante obtenido mediante la adición de una marca FLAG al extremo de N y una marca His al extremo de C de agrecano o un fragmento del mismo, respectivamente), agrecanos comercialmente disponibles (SEIKAGAKU CORPORATION), o polipéptidos parciales de estos agrecanos.

Como un procedimiento para analizar si el polipéptido de sustrato se digiere o no por la actividad agrecanasa puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento para analizar un fragmento de polipéptido generado mediante digestión del polipéptido de sustrato con el polipéptido de prueba (tal como un procedimiento para detectar la presencia del fragmento de polipéptido, o un procedimiento para medir una cantidad del fragmento de polipéptido generado), o un procedimiento para analizar el polipéptido de sustrato reducido por la digestión (tal como un procedimiento para detectar la presencia del polipéptido de sustrato, o un procedimiento para medir una cantidad del polipéptido de sustrato reducido).

Por ejemplo, en el caso de usar agrecano humano como polipéptido de sustrato no se limita particularmente un procedimiento para analizar un fragmento de polipéptidos generado mediante digestión de agrecano entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴, pero puede usarse, por ejemplo, un procedimiento para determinar una secuencia de extremo en N o una secuencia de extremo en C del fragmento digerido mediante un procedimiento convencional, o más convenientemente, procedimientos inmunológicos tales como ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) o un procedimiento de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-neoepítipo (Hughes C. E. y col., Biochem. J., 305, 799-804, 1995) que reconoce específicamente una secuencia Asn³⁶⁹-Ile³⁷⁰-Thr³⁷¹-Gly³⁷²-Glu³⁷³ (la secuencia de ID SEC N°: 25) en el extremo de C o una secuencia Ala³⁷⁴-Arg³⁷⁵-Gly³⁷⁶-Ser³⁷⁷-Val³⁷⁸ (la secuencia de ID SEC N°: 26) en el extremo de N generada mediante digestión de agrecano entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴. Los procedimientos inmunológicos tales como ELISA o un procedimiento de inmunotransferencia pueden llevarse a cabo según, por ejemplo, Migita, S., Konda, S., Honjo, T., Hamaoka, T., "Men-eki Jikken Sousa Hou (Methods in Immunological Experiments) I, II", Nanko-do, 1995.

Además, en el caso de usar agrecano humano como polipéptido de sustrato, el procedimiento para analizar agrecano humano reducido mediante digestión de agrecano entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ no está particularmente limitado, pero puede usarse, por ejemplo, un procedimiento de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-agrecano humano.

Además, en el caso de usar el agrecano recombinante obtenido mediante la adición de una marca FLAG al extremo de N y una marca His al extremo de C de agrecano o un fragmento del mismo, respectivamente, puede usarse ELISA o un procedimiento de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-marca FLAG y/o un anticuerpo anti-marca His como procedimiento para analizar el agrecano recombinante reducido mediante digestión de agrecano entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴.

(3) La variación funcionalmente equivalente

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención no está particularmente limitada, mientras que sea un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que preferentemente se delecionan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10, más preferentemente de 1 a 7, lo más preferido de 1 a 5 aminoácidos en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y que muestra la actividad agrecanasa (preferentemente que comprende además una secuencia de aminoácidos de la que una expresión está inducida por la diferenciación a células de cartílago). Además, un origen de la variación funcionalmente equivalente no está limitado a un ser humano.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención incluye, por ejemplo, variaciones humanas del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos de un ser humano (tal como un ratón, una rata, un hámster o un perro), y otros polipéptidos obtenidos modificando artificialmente estos polipéptidos nativos (es decir, variaciones humanas o variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos de un ser humano) o el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 mediante técnicas de ingeniería genética. El término "variación" como se usa en este documento significa una diferencia individual entre los mismos polipéptidos en las mismas especies o una diferencia entre polipéptidos homólogos en varias especies.

Las variaciones humanas del polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 o las variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos de un ser humano pueden obtenerse por aquellos expertos en la materia según la información de una secuencia de bases (por ejemplo, la secuencia de bases de ID SEC N°: 1) de un polinucleótido que codifica el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2. A este respecto, las técnicas de ingeniería genética pueden realizarse generalmente según procedimientos conocidos (por ejemplo, Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989).

Por ejemplo, una sonda apropiada o cebadores apropiados se diseñan según la información de una secuencia de bases de un polinucleótido que codifica el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2. Un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R. K. y col., Science, 239, 487-491, 1988) o un procedimiento de hibridación se lleva a cabo usando una muestra (por ejemplo, ARN total o una fracción de ARNm, una biblioteca de ADNc o una biblioteca de fagos) preparada a partir de un organismo (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano, un ratón, una rata, un hámster o un perro) de interés y los cebadores o la sonda para obtener un polinucleótido que codifica el polipéptido. Un polipéptido deseado puede obtenerse expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado y confirmando que el polipéptido expresado muestra la actividad agrecanasa, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4.

Además, el polipéptido artificialmente modificado mediante técnicas de ingeniería genética puede obtenerse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. Un gen que codifica el polipéptido se obtiene mediante un procedi-

miento convencional tal como mutagénesis dirigida al sitio (Mark, D. F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984). Un polipéptido deseado puede obtenerse expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado y confirmando que el polipéptido expresado muestra la actividad agrecanasa, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención incluye un polipéptido de fusión que muestra la actividad agrecanasa y que tiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se delecionan, sustituyen y/o insertan en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y una secuencia del marcador apropiada o similar se añade al extremo de N y/o el extremo de C de la misma.

Además, como la variación funcionalmente equivalente de la presente invención, un polipéptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a 7, lo más preferido de 1 a 5 aminoácidos se delecionan, sustituyen y/o insertan en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y se prefiere que presente la actividad agrecanasa, y lo más preferido un polipéptido que comprende además una secuencia de aminoácidos de la que está inducida una expresión por la diferenciación a células del cartílago.

(4) *El polipéptido homólogo*

El polipéptido homólogo de la presente invención no está particularmente limitado, mientras que sea un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y que muestra la actividad agrecanasa. El polipéptido homólogo de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene preferentemente el 95% o más de homología, más preferentemente el 98% o más de homología, lo más preferido el 99% o más de homología, con respecto a la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2. Como polipéptido homólogo de la presente invención se prefiere un polipéptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% o más de homología (preferentemente el 95% o más de homología, más preferentemente el 98% o más de homología, lo más preferido el 99% o más de homología) y que muestra la actividad agrecanasa.

Además, el polipéptido homólogo de la presente invención más preferido es un polipéptido que muestra la actividad agrecanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos de la que una expresión está inducida por la diferenciación a células de cartílago.

El término “homología” como se usa en este documento significa un valor obtenido por una búsqueda de BLAST [herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales; Altschul, S. F. y col., J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)]. La homología en la secuencia de aminoácidos puede calcularse por un algoritmo de búsqueda de BLAST. Más particularmente, puede calcularse usando un programa bl2seq (Tatiana A. Tatusova y Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) en un paquete de BLAST (edición de sgi32bit, versión 2.0.12; obtenido de NCBI) según un parámetro por defecto. Como parámetro de alineamiento por emparejamiento se usa un programa “blastp”. Además, se usan “0” como un valor de coste de inserción en hueco, “0” como un valor de coste de alargamiento del hueco, “SEG” como un filtro para una secuencia de búsqueda y “BLOSUM62” como una matriz, respectivamente.

[2] *El polinucleótido de la presente invención*

El polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado, mientras que codifique el polipéptido de la presente invención. Como polinucleótido de la presente invención puede mencionarse, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de bases de ID SEC N°: 1. Tal polinucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 1 es el más preferido. A este respecto, el término “polinucleótido” como se usa en este documento incluye tanto ADN como ARN.

No está particularmente limitado un procedimiento para producir el polinucleótido de la presente invención, pero puede mencionarse, por ejemplo, (1) un procedimiento que usa PCR, (2) un procedimiento que usa técnicas de ingeniería genética convencionales (es decir, un procedimiento para seleccionar un transformante que comprende un ADNc deseado de cepas transformada con una biblioteca de ADNc), o (3) un procedimiento de síntesis química. Estos procedimientos se explicarán en este orden en lo sucesivo.

En el procedimiento que usa PCR del punto (1), el polinucleótido de la presente invención puede producirse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

Se extrae ARNm de células o tejido humano que puede producir el polipéptido de la presente invención. Se sintetiza un par de cebadores, entre los cuales se localiza ARNm de longitud completa correspondiente al polipéptido de la presente invención o una región parcial del ARNm, basándose en la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica el polinucleótido de la presente invención. El ADNc de longitud completa que codifica el polipéptido de la presente invención o una parte del ADNc puede obtenerse realizando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-TI) usando el ARNm extraído como plantilla.

Más particularmente, el ARN total que contiene ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención se extrae mediante un procedimiento conocido de células o tejido que puede producir el polipéptido de la presente inven-

ción. Como procedimiento de extracción puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento de tiocinato de guanidina-fenol caliente, un procedimiento de tiocinato de guanidina-clorhidrato de guanidina o un procedimiento de tiocinato de guanidina-cloruro de cesio. Se usa preferentemente el procedimiento de tiocinato de guanidina-cloruro de cesio. Las células o tejido que pueden producir el polipéptido de la presente invención pueden identificarse, por ejemplo, mediante un procedimiento de transferencia de Northern usando un polinucleótido o una parte del mismo que codifica el polipéptido de la presente invención o un procedimiento de inmunotransferencia usando un anticuerpo específico para el polipéptido de la presente invención.

A continuación se purifica el ARNm extraído. La purificación del ARNm puede hacerse según un procedimiento convencional. Por ejemplo, el ARNm puede purificarse mediante adsorción y elución usando una columna de oligo (dT)-celulosa. El ARNm puede fraccionarse adicionalmente, por ejemplo, mediante una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, si es necesario. Alternativamente puede usarse ARNm extraído y purificado comercialmente disponible sin llevar a cabo la extracción del ARNm.

A continuación, la primera cadena de ADNc se sintetiza llevando a cabo una reacción de transcriptasa inversa del ARNm purificado en presencia de un cebador aleatorio, un cebador oligo dT y/o un cebador a medida. Esta síntesis puede llevarse a cabo según un procedimiento convencional. La primera cadena resultante de ADNc se somete a PCR usando dos cebadores entre los cuales se localiza una longitud completa o una región parcial del polinucleótido de interés, amplificándose así el ADNc de interés. El ADN resultante se fracciona, por ejemplo, mediante una electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de ADN de interés puede obtenerse llevando a cabo una digestión del ADN con enzimas de restricción y posterior ligado, si es necesario.

En el procedimiento usando técnicas de ingeniería genética convencionales del punto (2), el polinucleótido de la presente invención puede producirse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar, el ADNc de cadenas sencillas se sintetiza usando transcriptasa inversa de ARNm preparado mediante el procedimiento de PCR anteriormente mencionado como una plantilla, y entonces el ADNc de cadenas dobles se sintetiza a partir del ADNc de cadenas sencillas. Como este procedimiento puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento de nucleasa S1 (Efstratiadis, A. y col., Cell, 7, 279-288, 1976), un procedimiento de Land (Land, H. y col., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981), un procedimiento de O. Joon Yoo (Yoo, O. J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983) y un procedimiento de Okayama-Berg (Okayama, H. y Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982).

A continuación se prepara un plásmido recombinante que comprende el ADNc de cadenas dobles y se introduce dentro de una cepa de *Escherichia coli*, tal como DH 5 α , HB101 o JM109, transformándose así la cepa. Un transformante se selecciona usando un fármaco de resistencia contra, por ejemplo, tetraciclina, ampicilina o kanamicina como marcador. Si la célula huésped es *E. coli*, la transformación de la célula huésped puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el procedimiento de Hanahan (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983); concretamente, un procedimiento en que el ADN recombinante se añade a células competentes preparadas en presencia de CaCl₂, MgCl₂ o RbCl. Además, como un vector distinto de un plásmido puede usarse un vector de fago tal como un sistema lambda.

Como procedimiento para seleccionar un transformante que contiene el ADNc de interés de los transformantes resultantes pueden usarse diversos procedimientos tales como (i) un procedimiento para seleccionar un transformante usando una sonda de oligonucleótidos sintéticos, (ii) un procedimiento para seleccionar un transformante usando una sonda producida por PCR, (iii) un procedimiento para seleccionar un transformante usando un anticuerpo contra el polipéptido de la presente invención, o (iv) un procedimiento para seleccionar un transformante usando un sistema de traducción por hibridación selectiva.

En el procedimiento del punto (i) para seleccionar un transformante usando una sonda de oligonucleótidos sintéticos, el transformante que contiene el ADNc de interés puede seleccionarse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

Se sintetiza un oligonucleótido que se corresponde con la totalidad o una parte del polipéptido de la presente invención (en este caso puede ser o una secuencia de nucleótidos considerando el uso de codones o una pluralidad de secuencias de nucleótidos como combinación de posibles secuencias de nucleótidos y, en este último caso, sus números pueden reducirse incluyendo inosina) y, usando este oligonucleótido como una sonda (marcada con ³²P o ³³P), se hibrida con un filtro de nitrocelulosa o un filtro de poliamida sobre el que se desnaturalizan y se fijan los ADN de los transformantes, para seleccionar y seleccionar cepas positivas resultantes.

En el procedimiento del punto (ii) para seleccionar un transformante usando una sonda producida por PCR, el transformante que contiene el ADNc de interés puede seleccionarse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

Se sintetizan oligonucleótidos de un cebador sentido y un cebador antisentido correspondiente a una parte del polipéptido de la presente invención, y un fragmento de ADN que codifica la totalidad o una parte del polipéptido de interés se amplifica llevando a cabo PCR usando estos cebadores en combinación. Como ADN plantilla usada en este procedimiento puede usarse ADNc sintetizado mediante una reacción de transcripción inversa de ARNm de células que pueden producir el polipéptido de la presente invención, o ADN genómico. El fragmento de ADN resultante se

marca con ^{32}P o ^{33}P , y un transformante que contiene el ADNc de interés se selecciona llevando a cabo una hibridación de colonias o una hibridación en placa usando este fragmento como sonda.

En el procedimiento del punto (iii) para seleccionar un transformante usando un anticuerpo contra el polipéptido de la presente invención, el transformante que contiene el ADNc de interés puede seleccionarse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar, el ADNc se integra en un vector de expresión y los polipéptidos se producen en un sobrenadante de cultivo, dentro de las células, o sobre la superficie celular de los transformantes. Un transformante que contiene el ADNc de interés se selecciona detectando una cepa que produce el polipéptido deseado usando un anticuerpo contra el polipéptido de la presente invención y un segundo anticuerpo contra el primer anticuerpo.

En el procedimiento del punto (iv) para seleccionar un transformante usando un sistema de traducción por hibridación selectiva, el transformante que contiene el ADNc de interés puede seleccionarse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar, el ADNc obtenido de cada transformante se somete a inmunotransferencia en, por ejemplo, un filtro de nitrocelulosa y se hibrida con ARNm preparado de células que pueden producir el polipéptido de la presente invención, y entonces el ARNm unido al ADNc se disocia y se recupera. El ARNm recuperado se traduce en un polipéptido en un sistema de traducción apropiado de polipéptidos, por ejemplo, inyección en *Xenopus oocytes* o un sistema sin células tal como un lisado de reticulocitos de conejo o un germen de trigo. Un transformante que contiene el ADNc de interés se selecciona detectándolo con el uso de un anticuerpo contra el polipéptido de la presente invención.

Un procedimiento para recoger el polinucleótido de la presente invención del transformante de interés resultante puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido (por ejemplo, Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989). Por ejemplo, puede llevarse a cabo separando una fracción correspondiente al ADN de plásmido de células y cortando la región de ADNc del ADN de plásmido.

En el procedimiento de síntesis química del punto (3), el polinucleótido de la presente invención puede producirse, por ejemplo, uniendo fragmentos de ADN producidos por un procedimiento de síntesis química. Cada ADN puede sintetizarse usando un sintetizador de ADN [por ejemplo, sintetizador de ADN Oligo 1000M (Beckman) o sintetizador de ADN/ARN 394 (Applied Biosystems)].

Además, el polinucleótido de la presente invención puede producirse mediante síntesis química de ácidos nucleicos según un procedimiento convencional tal como un procedimiento de fosfito-triéster (Hunkapiller, M. y col., Nature, 10, 105-111, 1984) basado en la información del polipéptido de la presente invención. A este respecto se conocen los codones para cada aminoácido y opcionalmente pueden seleccionarse y determinarse mediante el procedimiento convencional, por ejemplo, considerando un uso de codones de cada huésped que va a usarse (Crantham, R. y col., Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981). Además, una modificación parcial de codones de estas secuencias de bases puede llevarse a cabo según un procedimiento convencional, tal como mutagénesis dirigida a sitio que usa un cebador comprendido de un oligonucleótido sintético que codifica para una modificación deseada (Mark, D. F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984).

La determinación de las secuencias de ADN obtenidas mediante los procedimientos anteriormente mencionados puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un procedimiento de modificación química de Maxam-Gilbert (Maxam, A. M. y Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) o un procedimiento de extremo de cadena de didesoxinucleótido (Messing, J. y Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982).

[3] *El vector de expresión y la célula de la presente invención*

Se vuelve a integrar un polinucleótido aislado de la presente invención en un ADN de vector apropiado y mediante el vector de expresión resultante puede transfectarse una célula huésped eucariota o procariota. Además, es posible expresar el polinucleótido en una célula huésped deseada introduciendo un promotor apropiado y una secuencia relacionada con la expresión génica dentro del vector.

El vector de expresión de la presente invención no está particularmente limitado, mientras comprenda el polinucleótido de la presente invención. Como vector de expresión puede mencionarse, por ejemplo, un vector de expresión obtenido introduciendo el polinucleótido de la presente invención en un vector de expresión conocido seleccionado apropiadamente según una célula huésped que va a usarse.

La célula de la presente invención no está particularmente limitada, mientras que esté transfectada con el vector de expresión de la presente invención y comprenda el polinucleótido de la presente invención. La célula de la presente invención puede ser, por ejemplo, una célula en la que el polinucleótido se integra en un cromosoma de una célula huésped, o una célula que contiene el polinucleótido como un vector de expresión que comprende el polinucleótido. Además, la célula de la presente invención puede ser una célula que expresa el polipéptido de la presente invención, o una célula que no expresa el polipéptido de la presente invención. La célula de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, transfectando una célula huésped deseada con el vector de expresión de la presente invención.

En las células huésped eucariotas están incluidas, por ejemplo, células de vertebrados, insectos y levadura. Como célula vertebral puede mencionarse, por ejemplo, una célula COS de simio (Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981), una cepa defectuosa en dihidrofolato reductasa de una célula de ovario de hámster chino (CHO) (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980), una célula HEK293 derivada de riñón embrionario humano o una

célula 293-EBNA (Invitrogen) obtenida introduciendo un gen EBNA-1 de virus de Epstein-Barr en la célula HEK293. Como vector de expresión para una célula vertebral puede usarse generalmente un vector que contiene un promotor localizado aguas arriba del gen que va a expresarse, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de fin de la transcripción y similares. El vector puede contener adicionalmente un origen de replicación, si es necesario. Como vector de expresión puede mencionarse, por ejemplo, pSV2dhfr que contiene un promotor tem-

prano SV40 (Subramani, S. y col., Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981), pEF-BOS que contiene un promotor del factor de alargamiento humano (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990), o pCEP4 que contiene un promotor de citomegalovirus (Invitrogen).

Si se usa la célula 293-EBNA como célula huésped, como vector de expresión puede usarse, por ejemplo, pCEP4 (Invitrogen) que contiene un origen de replicación de virus de Epstein-Barr y que puede realizar una replicación autónoma en la célula 293-EBNA. Si se usa la célula COS como célula huésped, un vector que tiene un origen de replicación SV40 puede realizar un replicación autónoma en la célula COS y tiene un promotor de transcripción, una señal de fin de la transcripción y un sitio de corte y empalme de ARN que pueden usarse como vector de expresión. Como vector puede mencionarse, por ejemplo, pME18S (Maruyama, K. y Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990), pEF-BOS (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990) o pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987).

El vector de expresión puede incorporarse en células COS, por ejemplo, mediante un procedimiento de DEAE-dextrano (Luthman, H. y Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983), un procedimiento de co-precipitación de fosfato de calcio-ADN (Graham, F. L. y van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973), un procedimiento usando un reactivo de transfección comercialmente disponible (por ejemplo reactivo de transfección FUGENE^{MR} 6; Boeringer Mannheim) o un procedimiento de electroporación (Neumann, E. y col., EMBO J., 1, 841-845, 1982).

Si se usa la célula CHO como célula huésped, una célula transfectada que puede producir establemente el polipéptido de la presente invención puede obtenerse llevando a cabo la co-transfección de un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, junto con un vector que puede expresar un neo-gen que actúa como un marcador de resistencia G418, tal como pRSVneo (Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) o pSV2-neo (Southern, P. J. y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982), y seleccionando una colonia resistente a G418.

La célula de la presente invención puede cultivarse según el procedimiento convencional [por ejemplo, "Shin Seikagaku Jikken Koza 18, Saibou Baiyou Gijyutsu (Japanese Biochemical Society)", Tokyo Kagaku Dojin, 1990], y el polipéptido de la presente invención se produce fuera de las células. Como medio que va a usarse en el cultivo puede seleccionarse apropiadamente un medio comúnmente usado en una célula huésped deseada. En el caso de la célula COS puede usarse, por ejemplo, un medio tal como un medio RPMI-1640 o un medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementándolo con un componente de suero tal como suero bovino fetal (SBF), si es necesario. En el caso de la célula 293-EBNA puede usarse un medio tal como un medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un componente de suero tal como suero bovino fetal (SBF) y G418.

El polipéptido de la presente invención producido fuera de las células de la presente invención mediante cultivo de las células puede separarse y purificarse de las mismas mediante diversas técnicas de separación conocidas [por ejemplo, Okada, M. y Miyazaki K., "Kaitei, Tanpakushitsu Jikken Noto, Jyo.Ge (Revision, Notebook for Protein Experiments)", Yodo-sha 1999] haciendo uso de las propiedades físicas, propiedades químicas y similares del polipéptido. Más particularmente, el polipéptido de la presente invención puede purificarse tratando un líquido de cultivo que contiene el polipéptido de la presente invención con un tratamiento comúnmente usado, por ejemplo un tratamiento con un precipitante de proteínas, ultrafiltración, diversas técnicas de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), o diálisis, o combinación de las mismas.

Si el polipéptido de la presente invención se expresa como una proteína de fusión con una secuencia del marcador en marco, la identificación de la expresión del polipéptido de la presente invención, purificación del mismo o similares puede llevarse a cabo fácilmente. Como secuencia del marcador puede mencionarse, por ejemplo, una marca FLAG, una marca hexa-histidina, una marca de hemaglutinina o un epítipo myc. Además, insertando una secuencia específica de aminoácidos reconocida por una proteasa tal como enterocinasa, factor Xa o trombina entre la secuencia del marcador y el polipéptido de la presente invención, la secuencia del marcador puede eliminarse por la proteasa.

[4] El procedimiento de detección y el procedimiento de selección de la presente invención

Es posible detectar si un compuesto que va a probarse muestra o no la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención usando el polipéptido de la presente invención. Además, usando este procedimiento de detección de la presente invención es posible seleccionar una sustancia que inhiba la actividad agrecanasa del polipéptido de

la presente invención. El polipéptido de la presente invención es una proteína de la que una expresión está inducida por la diferenciación a células de cartílago como se describe en el ejemplo 5, y el gen del mismo está localizado en un cromosoma relacionado con osteoartritis (OA) como se describe en el ejemplo 6 y, por tanto, se considera que el polipéptido de la presente invención es una agrecanasa causante de enfermedades de las articulaciones. Por tanto, una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención es útil como sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones. Además, el polipéptido de la presente invención puede usarse *per se* como una herramienta para seleccionar una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones (particularmente un agente para tratar osteoartritis).

Los compuestos que van a probarse que pueden aplicarse al procedimiento de detección o procedimiento de selección de la presente invención no están particularmente limitados, pero pueden mencionarse, por ejemplo, diversos compuestos conocidos (incluidos péptidos) registrados en archivos químicos, compuestos obtenidos mediante técnicas de química combinatoria (Terrett, N. K. y col., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) o técnicas de síntesis convencionales, o péptidos aleatorios preparados mediante el empleo de un procedimiento de expresión en fagos (Felici, F. y col., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) o similares. Estos compuestos conocidos incluyen compuestos (incluidos péptidos) conocidos por mostrar una actividad que inhibe metaloproteasa, pero no se conocen por inhibir la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención. Además, pueden usarse los sobrenadantes de cultivos de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas u organismos marinos o extractos de tejido animal como los compuestos de prueba a seleccionar. Además, pueden usarse los compuestos (incluyendo péptidos) obtenidos mediante compuestos químicamente o biológicamente modificados (incluyendo péptidos) seleccionados mediante el procedimiento de selección de la presente invención.

El procedimiento de detección de la presente invención puede llevarse a cabo mediante un procedimiento similar al procedimiento anteriormente mencionado para confirmar la actividad agrecanasa, excepto que el polipéptido de la presente invención, el polipéptido de sustrato y el compuesto de prueba se ponen en contacto entre sí en lugar de poner en contacto el polipéptido de prueba con el polipéptido de sustrato. Concretamente, en el procedimiento de detección de la presente invención es posible detectar si el compuesto de prueba inhibe o no la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención poniendo en contacto el polipéptido de la presente invención, el polipéptido de sustrato y el polipéptido de prueba entre sí y analizando si el polipéptido de sustrato se digiere o no por la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención en presencia del compuesto de prueba (o analizando el grado de digestión). Si el polipéptido de sustrato no se digiere por la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o se reduce el grado de digestión, es posible confirmar que el compuesto de prueba inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención.

Como polipéptido de sustrato que puede usarse en el procedimiento de detección de la presente invención puede usarse el polipéptido de sustrato previamente descrito en el procedimiento para confirmar la actividad agrecanasa.

En el procedimiento de detección de la presente invención puede usarse como procedimiento para analizar si el polipéptido de sustrato se digiere o no por la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención los procedimientos previamente descritos en el procedimiento para confirmar la actividad agrecanasa. Como procedimientos pueden mencionarse, por ejemplo, un procedimiento para analizar un fragmento de polipéptido generado mediante digestión del polipéptido de sustrato por la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención (tal como un procedimiento para detectar la presencia del fragmento de polipéptido, o un procedimiento para medir una cantidad del fragmento de polipéptido generado), o un procedimiento para analizar el polipéptido de sustrato reducido por la digestión (tal como un procedimiento para detectar la presencia del polipéptido de sustrato, o un procedimiento para medir una cantidad del polipéptido de sustrato reducido).

En el procedimiento de selección de la presente invención es posible seleccionar una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones basándose en los resultados obtenidos mediante la detección de si el compuesto de prueba inhibe o no la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención usando el procedimiento de detección de la presente invención. Más particularmente, por ejemplo, si el polipéptido de la presente invención, el polipéptido de sustrato y el polipéptido de prueba se ponen en contacto entre sí, una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones puede seleccionarse basándose en la presencia o grado de digestión del polipéptido de sustrato en presencia del compuesto de prueba. Si el polipéptido de sustrato no es digerido por la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o se reduce el grado de digestión, es posible confirmar que el compuesto de prueba es una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones.

[5] *El procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones de la presente invención*

La memoria descriptiva describe una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones que comprende, como principio activo, una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención seleccionado mediante el procedimiento de selección de la presente invención.

La memoria descriptiva describe un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones que comprende las etapas de detectar, en una prueba de control de calidad de una

composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones, si la composición farmacéutica inhibe o no la actividad agreganasa del polipéptido de la presente invención mediante el procedimiento de detección de la presente invención, y preparar un medicamento.

- 5 Además, la memoria descriptiva describe un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones, que está constituido por la etapa de preparar un medicamento usando una sustancia obtenida mediante el procedimiento de selección de la presente invención que comprende la etapa de detección.

- 10 La preparación que contiene como principio activo una sustancia que inhibe la actividad agreganasa del polipéptido de la presente invención puede prepararse usando vehículos, cargas y/u otros aditivos generalmente usados en la preparación de medicamentos, según el principio activo.

- 15 Ejemplos de administración incluyen administración por vía oral mediante comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, gránulos finos, polvos, disoluciones orales y similares, y administración parenteral mediante inyecciones (por ejemplo, intravenosas, intramusculares o similares), supositorios, preparaciones transdérmicas, preparaciones de absorción transmucosa y similares. Particularmente, en el caso de péptidos que se digieren en el estómago se prefiere una administración parenteral tal como inyección intravenosa o similar, o técnicas de preparación en las que el polipéptido no se digiere, tal como una técnica de preparación descrita en el documento WO95/28963.

- 20 En la composición sólida para uso en la administración por vía oral pueden mezclarse una o más sustancias activas con al menos un diluyente inerte tal como lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa, almidón, polivinilpirrolidona o silicato de aluminio y magnesio. En el modo usual, la composición puede contener aditivos distintos del diluyente inerte tales como un lubricante, un agente de disgregación, un agente estabilizante o un agente solubilizante o de ayuda en la solubilización. Si es necesario, los comprimidos o píldoras pueden recubrirse con un recubrimiento o una película de azúcar de una sustancia gástrica o entérica.

- 30 La composición líquida para administración por vía oral puede incluir, por ejemplo, emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires, y puede contener un diluyente inerte generalmente usado tal como agua purificada o alcohol etílico. La composición puede contener aditivos distintos del diluyente inerte tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, edulcorantes, aromas o antisépticos.

- 35 Las inyecciones para administración parenteral pueden incluir disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas asépticas. Ejemplos de diluyentes para uso en las disoluciones y suspensiones acuosas incluyen agua destilada para uso de inyección y solución salina fisiológica. Ejemplos de diluyentes para uso en las disoluciones y suspensiones no acuosas incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal (por ejemplo aceite de oliva), alcoholes (por ejemplo etanol), polisorbato 80 y similares. Una composición tal puede contener además un agente humectante, un agente emulsionante, un dispersante, un agente estabilizante, un agente solubilizante o de ayuda en la solubilización, un antiséptico o similares. Estas composiciones pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de filtro de retención de bacterias, combinación de un germicida o irradiación. Alternativamente pueden usarse haciéndolas primero en composiciones sólidas estériles y disolviéndolas en agua estéril u otro disolvente estéril para uso de inyección antes de su uso.

- 40 La dosis se decide opcionalmente considerando la intensidad de cada principio activo seleccionado por el procedimiento de selección anteriormente seleccionado, o síntomas, edad, sexo o similares de cada paciente que va a administrarse.

- 50 Por ejemplo, en el caso de administración por vía oral, la dosificación usual para un adulto (60 kg de peso) es aproximadamente de 0,01 a 1000 mg, preferentemente de 0,01 a 100 mg por día. En el caso de administración parenteral, la dosificación usual es aproximadamente de 0,01 a 1000 mg, preferentemente de 0,01 a 100 mg por día en forma de una inyección.

[6] *El anticuerpo y el fragmento del mismo de la presente invención*

- 55 Puede obtenerse un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, que reacciona con el polipéptido de la presente invención administrando directamente el polipéptido de la presente invención o un fragmento del mismo a diversos animales. Alternativamente puede obtenerse mediante un procedimiento de vacunación de ADN (Raz, E. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; o Donnelly, J. J. y col., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) usando un plásmido dentro del que se inserta un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención.

- 60 El anticuerpo policlonal puede producirse de un suero o huevos de un animal tal como un conejo, una rata, una cabra o un pollo, en que el animal se inmuniza y se sensibiliza mediante el polipéptido de la presente invención o un fragmento del mismo emulsionado en un adyuvante apropiado (por ejemplo adyuvante completo de Freund) mediante administración intraperitoneal, subcutánea o intravenosa. El anticuerpo policlonal puede separarse y purificarse del suero o huevos resultantes según procedimientos convencionales para el aislamiento y purificación de polipéptidos. Ejemplos de los procedimientos de separación y purificación incluyen, por ejemplo, separación centrífuga, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o una técnica cromatográfica usando tal como DEAE-celulosa, hidroxipatito, proteína A agarosa y similares.

El anticuerpo monoclonal puede producirse fácilmente por aquellos expertos en la materia según, por ejemplo, un procedimiento de fusión de células de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975).

Un ratón se inmuniza varias veces por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa en un intervalo de unas pocas semanas mediante una inoculación repetida de emulsiones en las que el polipéptido de la presente invención o un fragmento del mismo se emulsiona en un adyuvante adecuado tal como adyuvante completo de Freund. Después de la inmunización final se eliminan las células del bazo y a continuación se fusionan con células de mieloma para preparar hibridomas.

Como célula de mieloma para obtener un hibridoma puede usarse una célula de mieloma que tiene un marcador tal como una deficiencia en hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa o timidina cinasa (por ejemplo, línea celular P3X63Ag8.U1 del mieloma de ratón). Como agente de fusión puede usarse polietilenglicol. Como medio para la preparación de hibridomas puede usarse, por ejemplo, un medio comúnmente usado tal como un medio esencial mínimo de Eagle, un medio esencial mínimo modificado por Dulbecco o un medio RPMI-1640 mediante la adición adecuada del 10 al 30% de un suero bovino fetal. Las cepas fusionadas pueden seleccionarse mediante un procedimiento de selección con HAT. Un sobrenadante del cultivo de los hibridomas se barre mediante un procedimiento muy conocido tal como un procedimiento de ELISA o un procedimiento inmunohistológico para seleccionar clones de hibridomas que secretan el anticuerpo de interés. La monoclonalidad del hibridoma seleccionado se garantiza repitiendo el subclonado mediante un procedimiento de dilución limitante. Los anticuerpos en una cantidad que pueden purificarse se producen cultivando los hibridomas resultantes en un medio durante 1 a 4 días, o en la cavidad peritoneal de un ratón de la cepa BALB/c previamente tratada con pristano durante de 10 a 20 días.

Los anticuerpos monoclonales resultantes en el sobrenadante del cultivo o la ascitis pueden separarse y purificarse mediante procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de polipéptidos. Ejemplos de los procedimientos de separación y purificación incluyen, por ejemplo, separación centrífuga, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o una técnica cromatográfica usando tal como DEAE-celulosa, hidroxipatito, proteína A agarosa y similares.

Además, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpos que contienen una parte de los mismos pueden producirse insertando la totalidad o una parte de un gen que codifica el anticuerpo monoclonal en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión resultante en células huésped apropiadas (tales como *E. coli*, levadura o células animales).

Los fragmentos de anticuerpos que comprenden una parte activa del anticuerpo tal como F(ab')₂, Fab, Fab' o Fv pueden obtenerse mediante un procedimiento convencional, por ejemplo, digiriendo los anticuerpos separados y purificados (incluyendo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales) con una proteasa tal como pepsina o papaína, y separando y purificando los fragmentos resultantes mediante procedimientos habituales de aislamiento y purificación de polipéptidos.

Además, un anticuerpo que reacciona con el polipéptido de la presente invención puede obtenerse en forma de Fv o Fab de cadena sencilla según un procedimiento de Clackson y col. o un procedimiento de Zebedee y col. (Clackson, T. y col., Nature, 352, 624-628, 1991; o Zebedee, S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992). Además, puede obtenerse un anticuerpo humanizado inmunizando un ratón transgénico en el que los genes de anticuerpos de ratón están sustituidos con genes de anticuerpos humanos (Lonberg, N. y col., Nature, 368, 856-859, 1994).

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante, pero ni mucho menos se limita a, los siguientes ejemplos. Los procedimientos se realizaron según los procedimientos conocidos (Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989), a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1

Preparación del vector de expresión que tiene FLAG añadida al extremo C- terminal

Se construye un vector de expresión pCEP4d, en el que la unidad de expresión del virus de Estein-Barr EBNA1 se eliminó, digiriendo el plásmido pCEP4 (fabricado por Invitrogen) con enzimas de restricción ClaI y NsiI, haciendo romo el extremo y autoligándola. El vector de expresión resultante pCEP4d se digirió con enzimas de restricción, NheI y BamHI, y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 7,7 kbp se extrajo de gel de agarosa, a continuación de esto el oligonucleótido de cadenas dobles preparado mediante hibridación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 7 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 8 se insertó para construir el vector de expresión pCEP4d-FLAG. La secuencia de bases del vector de expresión resultante se analizó para confirmar que la secuencia deseada estaba incluida allí dentro.

Se llevó a cabo una PCR usando el vector de expresión pCEP4d-FLAG como plantilla, el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 9 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 10 como cebadores y la polimerasa de ADN PyroBest (PyroBest™, fabricada por Takara-shuzo). En la PCR se realizó primero una reacción desnaturalizante térmica a 94°C durante 2 minutos. A continuación se repitió 15 veces una reacción en ciclos compuesta de tratamientos a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30

segundos y a 72°C durante 30 segundos. A partir de entonces se llevó a cabo una reacción de extensión a 72°C durante 7 minutos.

Un fragmento de ADN resultante de aproximadamente 0,4 kbp se digirió con una enzima de restricción, SpeI, y se insertó dentro del vector de expresión pCEP4d-FLAG (aproximadamente 7,7 kbp), que había sido digerido con XbaI, para obtener un vector de expresión pCEP4dE2-FLAG. En el vector de expresión resultante pCEP4dE2-FLAG, la secuencia de reconocimiento XbaI, la secuencia de reconocimiento NheI, la secuencia de reconocimiento NotI y la secuencia de reconocimiento BamHI y la marca FLAG se dispusieron desde el promotor hasta aguas abajo del mismo.

Ejemplo 2

Clonado del gen ORF de longitud completa del gen MDTs8 de nueva agrecanasa

Se llevó a cabo una PCR usando la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 3 (que tiene una secuencia de reconocimiento XbaI y una secuencia Kozak añadida al extremo 5') y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 4 (que tiene una secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 5') como cebadores, una biblioteca de ADNc de placenta humana (ADNc Marathon-Ready^{MR}; fabricado por Clontech) como plantilla y polimerasa de ADN (TaKaRa LA Taq^{MR}; fabricado por Takara-shuzo) como polimerasa de ADN. En la PCR se realizó primero una reacción desnaturante térmica a 94°C durante 2 minutos. A continuación se repitió 45 veces un ciclo compuesto de tratamientos a 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 3 minutos. A partir de entonces se llevó a cabo una reacción de extensión a 68°C durante 7 minutos.

Un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN con aproximadamente 2,3 kbp (que tiene la secuencia de reconocimiento XbaI y la secuencia Kozak añadida al extremo 5', y la secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 3'), se subclonó en un plásmido PCR2.1 (fabricado por Invitrogen) para obtener un clon pMDTS8Cys.

El plásmido pMDTS8Cys resultante se digirió con enzimas de restricción, XbaI y NotI, y un fragmento de ADN resultante de aproximadamente 2,3 kbp se insertó en el sitio XbaI y Not I del plásmido pCEP4dE2-FLAG construido en el ejemplo 1 para obtener un plásmido pCEPdE2-MDTS8Cys-FLAG.

El plásmido pCEPdE2-MDTS8Cys-FLAG resultante se digirió con enzimas de restricción, KpnI y NotI, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 8,3 kbp (denominado en lo sucesivo fragmento A de ADN). Además, el plásmido pCEPdE2-MDTS8Cys-FLAG resultante se digirió con enzimas de restricción, KpnI y SpeI, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kbp (denominado en lo sucesivo fragmento B de ADN).

Se repitieron los procedimientos descritos como antes, excepto que la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 5 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 6 (que tiene una secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 5') se usó como cebadores, en lugar de la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 3 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 4. Un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kbp (que tiene la secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 3'), se subclonó en el plásmido PCR2.1 (fabricado por Invitrogen) para obtener un clon pMDTS8-3H. El clon pMDTS8-3H resultante se digirió con enzimas de restricción, SpeI y NotI, para obtener un fragmento de ADN con aproximadamente 1,5 kbp (denominado en lo sucesivo fragmento C de ADN).

El fragmento A de ADN anterior, el fragmento B de ADN anterior y el fragmento C de ADN anterior se ligaron para preparar un plásmido pCEPdE2-MDTS8Full-FLAG. El plásmido pCEPdE2-MDTS8Full-FLAG resultante contiene un gen que está constituido por las bases de 1 a 3663 en la secuencia de bases de ID SEC N°: 1, es decir, la secuencia de bases del gen MDTs8 de nueva agrecanasa. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de 1 a 1221 en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y una secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 23 añadida al extremo de C de la misma puede expresarse de una célula animal como huésped.

Ejemplo 3

Expresión de la proteína de longitud completa de MDTs8 (MDTS8Full)

Se usó un reactivo de transfección comercialmente disponible (reactivo de transfección FUGENE^{MR} 6; fabricado por Boehringer Mannheim), según un protocolo adjunto al mismo, para introducir el plásmido pCEPdE2-MDTS8Full-FLAG preparado en el ejemplo 2, o el plásmido pCEP4dE2-FLAG como control, en una célula HEK293-EBNA fabricada por Invitrogen.

Se confirmó la existencia de la proteína deseada en un sobrenadante de un cultivo obtenido de 1 día a 2 días después de la introducción del plásmido mediante un inmunoensayo usando un anticuerpo (anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG de ratón; fabricado por Sigma) contra la marca FLAG añadida al extremo de C. Más particularmente, el sobrenadante del cultivo se sometió a electroforesis en un gel de SDS/acrilamida al 10% - 20%; fabricado por Daiichi Pure Chemicals, y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un aparato de transferencia. A la membrana de PVDF resultante se añadió un agente de bloqueo (Block-ace fabricado por Dainippon Pharmaceutical) para realizar un bloqueo. A continuación, los productos sobre la membrana se hicieron reaccionar su-

cesivamente con el anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG de ratón y un anticuerpo policlonal IgG anti-ratón de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (fabricado por Zymed o TAGO). Alternativamente, después del bloqueo, los productos sobre la membrana se hicieron reaccionar sucesivamente con anticuerpo M2 biotinilado (fabricado por Sigma) y una estreptoavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (fabricada por Amersham Pharmacia Bio-
 5 tech). Después de la reacción se confirmó una expresión de la proteína deseada mediante un sistema de detección de inmunoensayo comercialmente disponible (sistema de detección de inmunoensayo ECL; fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

Un peso molecular aparente de la proteína detectada sobre el gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida (SDS-
 10 PAGE) fue de aproximadamente 120 a 140 kDa.

Ejemplo 4

Confirmación de la actividad agrecanasa de la proteína de longitud completa de MDTs8

(1) Preparación de agrecano recombinante G1G2

Se llevó a cabo una PCR usando la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 11 preparado basándose en la secuencia de genes de un agrecano humano conocido (Doege K. y col.,
 20 Biochem. Soc. Trans., 18, 200-202, 1990) y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 12 como cebadores, una biblioteca de ADNc de placenta humana (ADNc Marathon-Ready^{MR}; fabricado por Clontech) como plantilla y una polimerasa de ADN PyroBest^{MR} (fabricada por Takara-shuzo) como la polimerasa de ADN. En la PCR se realizó primero una reacción desnaturalizante térmica a 94°C durante 1 minuto. A continuación se repitió 40 veces un ciclo compuesto de tratamientos a 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos. A partir
 25 de entonces se llevó a cabo una reacción de extensión a 68°C durante 7 minutos.

Un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN, se digirió con una enzima de restricción, BamHI, y un fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio BamHI del plásmido pCEP-SigFla para preparar un plásmido de expresión pCEPrAgg para expresar una proteína (denominada en lo sucesivo un recombinante G1G2) que contiene un
 30 dominio globular 1 - dominio globular 2 de agrecano humano y una marca FLAG añadida al extremo de N del dominio globular 1 - el dominio globular 2 y la marca His añadida al extremo de C del dominio globular 1 - el dominio globular 2. El plásmido pCEPSigFla fue un vector de expresión preparado mediante inserción de un oligonucleótido de cadenas dobles que se había preparado hibridando el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 13 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 14 en el sitio HindIII y XhoI
 35 del plásmido pCEP4d preparado en el ejemplo 1. El plásmido pCEP-SigFla contuvo una secuencia de señal secretora (Guan X-M. y col., J. Biol. Chem., 267, 21995-21998, 1992) que provenía de hemaglutinina de un virus de gripe, una secuencia de la marca FLAG y una secuencia de reconocimiento BamHI, en el orden anterior, desde el promotor hasta aguas abajo del mismo.

Se introdujo un plásmido de expresión pCEP-rAgg resultante en la célula HEK293-EBNA y el transformante se cultivó durante de 3 a 7 días para expresar la proteína deseada, es decir, el agrecano recombinante G1G2. La proteína
 40 deseada se purificó del sobrenadante del cultivo mediante una cromatografía de afinidad haciendo uso de la marca FLAG unida al extremo de N. Más particularmente, el sobrenadante del cultivo se aplicó a M2-agalosa (fabricado por Sigma) empaquetado en una columna, se lavó con 20 mmol/l de tris-HCl (pH 7,4)/150 mmol/l de cloruro sódico (denominado en lo sucesivo TBS), se eluyó con 0,1 mol/l de clorhidrato de glicina (pH 3,0) para fraccionarlo e
 45 inmediatamente se neutralizó con 1 mmol/l de tris-HCl (pH 8,0).

(2) Detección de la actividad agrecanasa

Como se describen en el ejemplo 3, el plásmido pCEPdE2-MDTS8Full-FLAG preparado en el ejemplo 2 del plásmido pCEPdE2-FLAG preparado en el ejemplo 1 como control se introdujo en una célula HEK293-EBNA (fabricada por Invitrogen). A continuación, 16 horas después de la introducción del plásmido, un medio se sustituyó con un medio
 50 sin suero. El cultivo continuó durante 34 horas y a partir de entonces se recuperó un sobrenadante del cultivo.

El sobrenadante del cultivo resultante se mezcló con el recombinante G1G2 preparado en el ejemplo 4 (1) y se hizo reaccionar a 37°C durante la noche. A partir de entonces, como se describe en el ejemplo 3, se llevaron a cabo una SDS-PAGE, una transferencia a una membrana de PVDF y un bloqueo. Entonces, los productos sobre la membrana de PVDF se hicieron reaccionar sucesivamente con el anticuerpo monoclonal BC-3 de ratón (Hughes C.E. y col.,
 55 Biochemical J., 305, 799-804, 1995) que podía reconocer un neo-epítipo de agrecanasa y un anticuerpo policlonal IgG anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa (fabricado por TAGO). A continuación se usó para la detección un sistema de detección de inmunoensayo (sistema de detección de inmunoensayo ECL; fabricado por Amersham Pharmacia).

Se reveló que, cuando el sobrenadante del cultivo de la célula HEK293-EBNA transfectada con el plásmido pCEPdE2-FLAG (control) se hizo reaccionar con el recombinante G1G2, no se detectó producto de degradación reactivo
 65 con el anticuerpo neo-epítipo anti-agrecanasa, mientras que tales productos de degradación se detectaron cuando el sobrenadante del cultivo de la célula HEK293-EBNA transfectada con el plásmido pCEPdE2-MDTS8Full-FLAG se hizo reaccionar con el recombinante G1G2.

El presente ejemplo muestra que MDTs8 tiene una actividad agrecanasa.

Ejemplo 5

5 Inducción de la expresión de ARNm de MDTs8, acompañado por diferenciación a células del cartílago

(1) Inducción de la diferenciación de células madre mesenquimales a célula del cartílago

Se sabe que una célula madre mesenquimal humana se diferencia de una célula del cartílago cuando se cultiva con gránulo esfeoride con una estimulación de TGF- β 3 o similar (Pittenger M. F. y col., Science, 284, 143-147, 1999).

Las células madre mesenquimales humanas normales (fabricadas por Bio Whittaker) se cultivaron en un kit de medio de proliferación de células madre mesenquimales humanas (fabricado por Bio Whittaker) para obtener 5×10^5 células. A continuación se lavaron $2,5 \times 10^5$ células con un medio de inducción de condrogénesis incompleto [DMEM-alto contenido de glucosa (fabricado por LIFE TECHNOLOGIES), 1 mmol/l de piruvato de sodio (fabricado por LIFE TECHNOLOGIES), 0,35 mmol/l de prolina (fabricado por LIFE TECHNOLOGIES), 0,1 μ mol/l de dexametasona (fabricado por Sigma), 0,17 mmol/l de 2-fosfato del ácido ascórbico (fabricado por Sigma) y complemento de cultivo ITS+1 (fabricado por Sigma)], y se suspendió en 500 μ L de un medio de inducción de condrogénesis incompleto [un medio de inducción de diferenciación de cartílago incompleto que contiene 0,01 μ g/ml de TGF- β 3 (fabricado por Sigma)]. A continuación se transfirió la suspensión a un tubo de polipropileno y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos para obtener un sedimento de células. El sedimento de células resultante se colocó en un aparato de cultivo de células como estaba y se cultivó. El cultivo continuó durante 2 semanas, mientras que el medio se cambió a un medio de inducción de diferenciación de cartílago completo cada 3 ó 4 días, de manera que las células se diferenciaron a células de cartílago.

(2) Confirmación de la diferenciación a células de cartílago

Se preparó un ARN total de cada una de las células madre mesenquimales humanas no diferenciadas y las células inducidas a diferenciación mediante un reactivo de purificación de ARN comercialmente disponible (ISOGEN; fabricado por Nippon Gene). El ARN total resultante se hizo reaccionar con DNasa (fabricada por Nippon Gene) a 37°C durante 15 minutos. El ARN total resultante tratado con DNasa (0,5 μ g) se convirtió en ADNc mediante un sistema de cadenas sencillas Superscript (para PCR-TI; fabricado por LIFE TECHNOLOGIES).

La diferenciación de las células madre mesenquimales humanas a células de cartílago mediante el tratamiento de inducción de diferenciación como se describe en el ejemplo 5(1) se confirmó mediante un notable aumento de una expresión de ARNm de colágeno de tipo II y colágeno de tipo IX específicamente expresado en células de cartílago, que sigue adelante con la inducción de diferenciación. Más particularmente se usó una PCR cuantitativa usando un detector de secuencias (detector de secuencias Prism7700; fabricado por Applied Biosystems) para medir una cantidad existente y hacer una comparación. Para el colágeno de tipo II, la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 15 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 16 se usó como un conjunto de cebadores, y para colágeno de tipo IX se usó como conjunto de cebadores la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 17 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 18. Se usó un agente de PCR comercialmente disponible (reactivo núcleo para PCR SYBR Green PCR; fabricado por Applied Biosystems) para realizar la PCR. En la PCR se realizó una reacción desnaturante inicial a 95°C durante 10 minutos. A continuación se repitió 45 veces una reacción en ciclos compuesta de tratamientos a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos.

Además, se llevó a cabo una PCR usando ADN de genoma humano como plantilla y el cebador asignado anteriormente en las mismas condiciones para obtener una curva patrón para calcular una cantidad de ARNm expresado. Se llevó a cabo una PCR usando el ADNc como antes y el ADN de genoma humano como plantillas y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 21 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 22 como cebador fijado en las mismas condiciones para calcular una cantidad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (g3pdh) expresada como patrón interno. Las cantidades de ARNm existentes de colágeno de tipo II y colágeno de tipo IX se corrigieron basándose en los valores predeterminados de G3PDH.

(3) Expresión del gen de MDTs8 en células del cartílago

El oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 19 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 20 se diseñaron basándose en la secuencia de bases de ID SEC N°: 1 como un conjunto de cebadores para medir una cantidad de ARNm del gen MDTs8 de la nueva agrecanasa. Se llevó a cabo una PCR usando el anterior conjunto de cebadores, ADNc (correspondiente a 5 ng de ARN total) preparado en el ejemplo 5 (2) como plantilla y una polimerasa de ADN (TaKaRa LA Taq^{MR}; fabricada por Takara-shuzo). En la PCR se realizó primero una reacción desnaturante térmica a 94°C durante 2 minutos. A continuación se repitió 40 veces un ciclo compuesto de tratamientos a 98°C durante 10 segundos, a 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto.

Se llevó a cabo una PCR para monitorizar la expresión del gen G3PDH usando la combinación del oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 21 y el oligonucleótido que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 22 como conjunto de cebadores, ADNc (correspondiente a 5 ng de ARN total) preparado en el ejemplo 5 (2) como plantilla y una polimerasa de ADN (TaKaRa LA Taq^{MR}; fabricada por Takara-shuzo). En la PCR se realizó primero una reacción desnaturante térmica a 94°C durante 2 minutos. A continuación se repitió 30 veces un ciclo compuesto de tratamientos a 98°C durante 10 segundos, a 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto.

Se reveló que no se observó un cambio sustancial de la expresión del gen G3PDH acompañada por la diferenciación a células de cartílago, mientras que el ARNm del gen MDTs8 de la nueva agrecanasa de la presente invención no se detectó en las células madre mesenquimales humanas antes de la diferenciación, pero se detectó como una banda de aproximadamente 0,33 kbp en las células del cartílago. Esto muestra que el ARNm del gen MDTs8 de la nueva agrecanasa de la presente invención se expresa en células del cartílago.

15 Ejemplo 6

Mapeo de cromosomas del gen MDTs8 de la nueva agrecanasa

Se realizó una búsqueda BLAST en GenBank para la secuencia de genes del ORF de longitud completa del gen de la nueva agrecanasa que está constituido por la secuencia de bases de ID SEC N°: 1 de la presente invención como secuencia de consulta. Se encontró que BAC clona AC026498, AC025284, AC010548 y AC009139 contienen secuencias parciales de MDTs8, y una parte de al menos 24 exones está presente en cada uno de los clones.

Entonces, mediante la base de datos pública (Human Genome Reconstruction Project; <http://hgrep.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/HTGtool/view.cgi?layer=top>) establecida por el Instituto de Ciencias médicas, Universidad de Tokio y RIKEN y publicada en la web se confirmó que los cuatro clones como antes están localizados en el cromosoma 16q. Además, también se confirmó que los cuatro clones como antes contienen marcadores genéticos WI-22533, stSG3069, SGC32952 y stSG62732 que están localizados en el cromosoma 16q.

Posteriormente se realizó mapeo de cromosomas más detallado usando los marcadores WI-22533, stSG3069, SGC32952 y stSG62732 localizados en el cromosoma 16q. Más particularmente, los marcadores de los cuatro genes anteriores se investigaron en otra base de datos pública (The Genome Database; <http://www.gdb.org/>). Se encontró que cada uno de los cuatro marcadores estaba localizado en 16q22.3-23.1 del mapa físico de cromosomas y, por tanto, el MDTs8 está localizado en 16q22.3-23.1.

Por tanto, se hace patente que la posición cromosómica de MDTs8 pertenece a una región especificada como un locus con susceptibilidad por OA, es decir, una enfermedad de las articulaciones.

40 Aplicabilidad industrial

El polipéptido de la presente invención es una nueva agrecanasa causante de enfermedades de las articulaciones (particularmente OA) y, por tanto, una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención es útil como una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones.

Según el polipéptido de la presente invención puede proporcionarse un sistema de selección conveniente para un agente para tratar enfermedades de las articulaciones. Concretamente, mediante el procedimiento de detección de la presente invención usando el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones mediante selección de una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención.

Además, puede producirse una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones mediante preparación de un medicamento usando una sustancia seleccionada mediante el procedimiento de selección, como un principio activo, y un vehículo, una carga y/u otros aditivos.

El procedimiento de detección del presente procedimiento puede usarse no sólo para seleccionar una sustancia para tratar enfermedades de las articulaciones, sino también para una prueba de control de calidad de una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones. Concretamente puede producirse una composición farmacéutica para tratar enfermedades de las articulaciones para detectar si un compuesto que va a probarse muestra o no la actividad agrecanasa del polipéptido de la presente invención, mediante el procedimiento de detección de la presente invención, y entonces preparar un medicamento usando la sustancia resultante que inhibe la actividad agrecanasa.

Además, el polinucleótido, el vector de expresión, las células y el anticuerpo de la presente invención son útiles para producir el polipéptido de la presente invención

Texto libre en la lista de secuencias

Las características de la “secuencia artificial” se describen en el identificador numérico <223> en la lista de secuencias. Más particularmente, cada una de las secuencias de bases de ID SEC N°: 3-6 y 9-12 es una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada. Cada una de las secuencias de bases de ID SEC N°: 7, 8, 13, y 14 es una secuencia de ligadores artificialmente sintetizada. La secuencia de bases de ID SEC N°: 23 es una secuencia artificialmente sintetizada que contiene una secuencia de reconocimiento NotI de la enzima de restricción y una secuencia de marca FLAG.

Como antes, la presente invención se explica con referencia a realizaciones particulares, pero las modificaciones y mejoras obvias para aquellos expertos en la materia están incluidas en el alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que muestra una actividad agrecanasa y que comprende (1) la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 o (2) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 10 aminoácidos se delecionan, se sustituyen y/o se insertan en la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2.
- 10 2. El polipéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y que muestra una actividad agrecanasa.
- 10 3. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2 y que muestra una actividad agrecanasa.
- 15 4. Un polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2.
- 15 5. Un polinucleótido que codifica el polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5.
- 20 7. Una célula transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 6.
- 25 8. Un procedimiento para detectar si un compuesto que va a probarse inhibe o no una actividad agrecanasa de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- 25 poner en contacto (1) dicho polipéptido, (2) un polipéptido de sustrato que puede digerirse con agrecanasa, y (3) el compuesto que va a probarse y analizar la digestión del polipéptido de sustrato.
- 30 9. Un procedimiento para seleccionar una sustancia que inhibe una actividad agrecanasa de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- 30 detectar mediante el procedimiento según la reivindicación 8 y seleccionar una sustancia que inhibe una actividad agrecanasa.
- 35 10. Un procedimiento para seleccionar una sustancia según la reivindicación 9, en el que la sustancia es para tratar enfermedades de las articulaciones.
- 35 11. Un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une al polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4.

ES 2 288 909 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Nueva agrecanasa

<130> Y0130PCT-661

<150> JP 2000-384300

<151> 2000-12-18

<160> 26

<210> 1

<211> 3666

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..... (3666)

<400> 1

atg gag tgc gcc ctc ctg ctc gcg tgt gcc ttc ccg gct gcg ggt tgc 48
Met Glu Cys Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ala Phe Pro Ala Ala Gly Ser
1 5 10 15

ggc ccg ccg agg ggc ctg gcg gga ctg ggg cgc gtg gcc aag gcg ctc 96
Gly Pro Pro Arg Gly Leu Ala Gly Leu Gly Arg Val Ala Lys Ala Leu
20 25 30

cag ctg tgc tgc ctc tgc tgt gcg tgc gtc gcc gcg gcc tta gcc agt 144
Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys Ala Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser
35 40 45

gac agc agc agc ggc gcc agc gga tta aat gat gat tac gtc ttt gtc 192
Asp Ser Ser Ser Gly Ala Ser Gly Leu Asn Asp Asp Tyr Val Phe Val
50 55 60

aag cca gta gaa gta gac tca gcc ggg tca tat att tca cac gac att 240
Thr Pro Val Glu Val Asp Ser Ala Gly Ser Tyr Ile Ser His Asp Ile
65 70 75 80

ttg cac aac ggc agg aaa aag oga tgc gcg cag aat gcc aga agc tcc 288
Leu His Asn Gly Arg Lys Lys Arg Ser Ala Gln Asn Ala Arg Ser Ser
85 90 95

ES 2 288 909 T3

5	ctg cac tac oga ttt tca gca ttt gga cag gaa ctg cao tta gaa ott Leu His Tyr Arg Phe Ser Ala Phe Gly Gln Glu Leu His Leu Glu Leu 100 105 110	336
10	aag oco tgc gcg att ttg agc agt cac ttt att gtc cag gta ctt gga Lys Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ser His Phe Ile Val Gln Val Leu Gly 115 120 125	384
15	aaa gat ggt gct tca gag act cag aaa ccc gag gtg cag caa tgc ttc Lys Asp Gly Ala Ser Glu Thr Gln Lys Pro Glu Val Gln Gln Cys Phe 130 135 140	432
20	tat cag gga ttt atc aga aat gac agc tcc tcc tct gtc gct gtg tct Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Val Ala Val Ser 145 150 155 160	480
25	acg tgt got ggc ttg tca ggt tta ata agg aca cga aaa aat gaa ttc Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Arg Thr Arg Lys Asn Glu Phe 165 170 175	528
30	ctc ato tgc cca tta cct cag ctt ctg gcc cag gaa cac aac tac ago Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln Leu Leu Ala Gln Glu His Asn Tyr Ser 180 185 190	576
35	tcc cct gcg ggt cac cat cct cac gta ctg tac aaa agg aca gca gag Ser Pro Ala Gly His His Pro His Val Leu Tyr Lys Arg Thr Ala Glu 195 200 205	624
40	gag aag atc cag cgg tao cgt ggc tac ccc ggc tot ggc ogg aat tat Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Asn Tyr 210 215 220	672
45	cct ggt tac tcc cca agt cac att ccc cat gca tct cag agt cga gag Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His Ile Pro His Ala Ser Gln Ser Arg Glu 225 230 235 240	720
50	aca gag tat cao cat cga agg ttg caa aag cag cat ttt tgt gga cga Thr Glu Tyr His His Arg Arg Leu Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg 245 250 255	768
55	ogc aag aaa tat gct ccc aag cct ccc aca gag gac aco tat cta agg Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys Pro Pro Thr Glu Asp Thr Tyr Leu Arg 260 265 270	816
60	ttt gat gaa tat ggg agc tct ggg cga ccc aga aga tca gct gga aaa	864

ES 2 288 909 T3

	Phe	Asp	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Ser	Ala	Gly	Lys	
			275					280					285				
5	tca	caa	aag	ggc	ctc	aat	gtg	gaa	acc	ctc	gtg	gtg	gca	gac	aag	aaa	912
	Ser	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Val	Ala	Asp	Lys	Lys	
		290				295					300						
10	atg	gtg	gaa	aag	cat	ggc	aag	gga	aat	gtc	acc	aca	tac	att	ctc	aca	960
	Met	Val	Glu	Lys	His	Gly	Lys	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Tyr	Ile	Leu	Thr	
	305					310				315					320		
15	gta	atg	aac	atg	gtt	tct	ggc	cta	ttt	aaa	gat	ggg	act	att	gga	agt	1008
	Val	Met	Asn	Met	Val	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Gly	Thr	Ile	Gly	Ser	
				325					330						335		
20	gac	ata	aac	gtg	gtt	gtg	gtg	agc	cta	att	ctt	ctg	gaa	caa	gaa	cct	1056
	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Val	Val	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	
				340				345					350				
25	gga	gga	tta	ttg	atc	aac	cat	cat	gca	gac	cag	tct	ctg	aat	agt	ttt	1104
	Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	His	His	Ala	Asp	Gln	Ser	Leu	Asn	Ser	Phe	
			355				360					365					
30	tgt	caa	tgg	cag	tct	gcc	ctc	att	gga	aag	aat	ggc	aag	aga	cat	gat	1152
	Cys	Gln	Trp	Gln	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Lys	Arg	His	Asp	
		370				375					380						
35	cat	gcc	atc	tta	cta	aca	gga	ttt	gat	att	tgt	tct	tgg	aag	aat	gaa	1200
	His	Ala	Ile	Leu	Leu	Thr	Gly	Phe	Asp	Ile	Cys	Ser	Trp	Lys	Asn	Glu	
	385					390					395				400		
40	cca	tgt	gac	act	cta	ggg	ttt	gcc	ccc	atc	agt	gga	atg	tgc	tct	aag	1248
	Pro	Cys	Asp	Thr	Leu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Met	Cys	Ser	Lys	
					405					410				415			
45	tac	cga	agt	tgt	acc	atc	aat	gag	gac	aca	gga	ctt	ggc	ctt	gcc	ttc	1296
	Tyr	Arg	Ser	Cys	Thr	Ile	Asn	Glu	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	
				420					425				430				
50	acc	atc	got	cat	gag	tca	ggg	cac	aac	ttt	ggg	atg	att	cac	gac	gga	1344
	Thr	Ile	Ala	His	Glu	Ser	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Met	Ile	His	Asp	Gly	
			435				440					445					
55	gaa	ggg	aat	ccc	tgc	aga	aag	got	gaa	ggc	aat	atc	atg	tct	ccc	aca	1392
	Glu	Gly	Asn	Pro	Cys	Arg	Lys	Ala	Glu	Gly	Asn	Ile	Met	Ser	Pro	Thr	
		450					455					460					
60																	
65																	

ES 2 288 909 T3

5	ctg acc gga aac aat gga gtg ttt tca tgg tct tcc tgc agc cgc cag Leu Thr Gly Asn Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln 465 470 475 480	1440
10	tat cto aag aaa ttc ctc agc aca cct cag gcg ggg tgt cta gtg gat Tyr Leu Lys Lys Phe Leu Ser Thr Pro Gln Ala Gly Cys Leu Val Asp 485 490 495	1488
15	gag ccc aag caa gca gga cag tat aaa tat ccg gac aaa cta cca gga Glu Pro Lys Gln Ala Gly Gln Tyr Lys Tyr Pro Asp Lys Leu Pro Gly 500 505 510	1536
20	cag att tat gat gct gac aca cag tgt aaa tgg caa ttt gga gca aaa Gln Ile Tyr Asp Ala Asp Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Ala Lys 515 520 525	1584
25	gcc aag tta tgo agc ctt ggt ttt gtg aag gat att tgc aaa tca ctt Ala Lys Leu Cys Ser Leu Gly Phe Val Lys Asp Ile Cys Lys Ser Leu 530 535 540	1632
30	tgg tgc cac cga gta ggc cac agg tgt gag acc aag ttt atg ccc gca Trp Cys His Arg Val Gly His Arg Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala 545 550 555 560	1680
35	gca gaa ggg acc gtt tgt ggc ttg agt atg tgg tgt cgg caa ggc cag Ala Glu Gly Thr Val Cys Gly Leu Ser Met Trp Cys Arg Gln Gly Gln 565 570 575	1728
40	tgc gta aag ttt ggg gag ctc ggg ccc cgg ccc atc cac ggc cag tgg Cys Val Lys Phe Gly Glu Leu Gly Pro Arg Pro Ile His Gly Gln Trp 580 585 590	1776
45	tcc gcc tgg tgc aag tgg tca gaa tgt tcc cgg aca tgt ggt gga gga Ser Ala Trp Ser Lys Trp Ser Glu Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly 595 600 605	1824
50	gtc aag ttc cag gag aga cac tgc aat aac ccc aag cct cag tat ggt Val Lys Phe Gln Glu Arg His Cys Asn Asn Pro Lys Pro Gln Tyr Gly 610 615 620	1872
55	ggc tta tto tgt cca ggt tot agc cgt att tat cag ctg tgc aat att Gly Leu Phe Cys Pro Gly Ser Ser Arg Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Ile 625 630 635 640	1920
60	aac cct tgc aat gaa aat agc ttg gat ttt cgg got caa cag tgt gca	1968

65

ES 2 288 909 T3

	Asn Pro Cys Asn Glu Asn Ser Leu Asp Phe Arg Ala Gln Gln Cys Ala	
	645 650 655	
5		
	gaa tat aac agc aaa cot ttc cgt gga tgg ttc tac cag tgg aaa ccc	2016
	Glu Tyr Asn Ser Lys Pro Phe Arg Gly Trp Phe Tyr Gln Trp Lys Pro	
	660 665 670	
10		
	tat aca aaa gtg gaa gag gaa gat cga tgc aaa ctg tac tgc aag got	2064
	Tyr Thr Lys Val Glu Glu Glu Asp Arg Cys Lys Leu Tyr Cys Lys Ala	
	675 680 685	
15		
	gag aac ttt gaa ttt ttt ttt gca atg tcc ggc aaa gtg aaa gat gga	2112
	Glu Asn Phe Glu Phe Phe Phe Ala Met Ser Gly Lys Val Lys Asp Gly	
	690 695 700	
20		
	act ccc tgc tcc cca aac aaa aat gat gtt tgt att gac ggg gtt tgt	2160
	Thr Pro Cys Ser Pro Asn Lys Asn Asp Val Cys Ile Asp Gly Val Cys	
	705 710 715 720	
25		
	gaa cta gtg gga tgt gat cat gaa cta ggc tct aaa gca gtt tca gat	2208
	Glu Leu Val Gly Cys Asp His Glu Leu Gly Ser Lys Ala Val Ser Asp	
	725 730 735	
30		
	gct tgt ggc gtt tgc aaa ggt gat aat tca act tgc aag ttt tat aaa	2256
	Ala Cys Gly Val Cys Lys Gly Asp Asn Ser Thr Cys Lys Phe Tyr Lys	
	740 745 750	
35		
	ggc ctg tac ctc aac cag cat aaa gca aat gaa tat tat ccg gtg gtc	2304
	Gly Leu Tyr Leu Asn Gln His Lys Ala Asn Glu Tyr Tyr Pro Val Val	
	755 760 765	
40		
	atc att oca gct ggc gcc cga agc atc gaa atc oag gag ctg cag gtt	2352
	Ile Ile Pro Ala Gly Ala Arg Ser Ile Glu Ile Gln Glu Leu Gln Val	
	770 775 780	
45		
	tcc tcc agt tac ctc gca gtt cga agc ctc agt caa aag tat tac ctc	2400
	Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Val Arg Ser Leu Ser Gln Lys Tyr Tyr Leu	
	785 790 795 800	
50		
	acc ggg ggc tgg agc atc gac tgg cct ggg gag ttc ccc ttc gct ggg	2448
	Thr Gly Gly Trp Ser Ile Asp Trp Pro Gly Glu Phe Pro Phe Ala Gly	
	805 810 815	
55		
	acc aag ttt gaa tac cag ogc tct ttc aac ogc ccg gaa cgt ctg tac	2496
	Thr Thr Phe Glu Tyr Gln Arg Ser Phe Asn Arg Pro Glu Arg Leu Tyr	
	820 825 830	
60		
65		

ES 2 288 909 T3

5	gog cca ggg ccc aca aat gag acg ctg gtc ttt gaa att ctg atg caa Ala Pro Gly Pro Thr Asn Glu Thr Leu Val Phe Glu Ile Leu Met Gln 835 840 845	2544
10	ggc aaa aat cca ggg ata gct tgg aag tat gca ctt ccc aag gtc atg Gly Lys Asn Pro Gly Ile Ala Trp Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Val Met 850 855 860	2592
15	aat gga act cca cca gcc aca aaa aga cct gcc tat acc tgg agt atc Asn Gly Thr Pro Pro Ala Thr Lys Arg Pro Ala Tyr Thr Trp Ser Ile 865 870 875 880	2640
20	gtg cag tca gag tgc tcc gtc tcc tgt ggt gga ggt tac ata aat gta Val Gln Ser Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Tyr Ile Asn Val 885 890 895	2688
25	aag gcc att tgc ttg cga gat caa aat act caa gtc aat tcc tca ttc Lys Ala Ile Cys Leu Arg Asp Gln Asn Thr Gln Val Asn Ser Ser Phe 900 905 910	2736
30	tgc agt gca aaa acc aag cca gta act gag ccc aaa atc tgc aac gct Cys Ser Ala Lys Thr Lys Pro Val Thr Glu Pro Lys Ile Cys Asn Ala 915 920 925	2784
35	ttc tcc tgc ccg gct tac tgg atg cca ggt gaa tgg agt aca tgc agc Phe Ser Cys Pro Ala Tyr Trp Met Pro Gly Glu Trp Ser Thr Cys Ser 930 935 940	2832
40	aag gcc tgt gct gga ggc cag cag agc cga aag atc cag tgt gtg caa Lys Ala Cys Ala Gly Gly Gln Gln Ser Arg Lys Ile Gln Cys Val Gln 945 950 955 960	2880
45	aag aag ccc ttc caa aag gag gaa gca gtg ttg cat tct ctc tgt cca Lys Lys Pro Phe Gln Lys Glu Glu Ala Val Leu His Ser Leu Cys Pro 965 970 975	2928
50	gtg agc aca ccc act cag gtc caa gcc tgc aac agc cat gcc tgc cct Val Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Pro 980 985 990	2976
55	cca caa tgg agc ctt gga ccc tgg tct cag tgt tcc aag acc tgt gga Pro Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser Gln Cys Ser Lys Thr Cys Gly 995 1000 1005	3024
60	cga ggg gtg agg aag cgt gaa ctc ctc tgc aag ggc tct gcc gca gaa	3072

65

ES 2 288 909 T3

	Arg Gly Val	Arg Lys	Arg Glu	Leu Leu	Cys Lys	Gly Ser	Ala Ala	Glu	
	1010		1015			1020			
5	acc ctc ccc	gag agc	cag tgt	acc agt	ctc ccc	aga cct	gag ctg	cag	3120
	Thr Leu Pro	Glu Ser	Gln Cys	Thr Ser	Leu Pro	Arg Pro	Glu Leu	Gln	
	1025		1030		1035		1040		
10	gag ggc	tgt gtg	ctt gga	oga tgc	ccc aag	aac agc	cgg ota	cag tgg	3168
	Glu Gly Cys	Val Leu	Gly Arg	Cys Pro	Lys Asn	Ser Arg	Leu Gln	Trp	
		1045		1050		1055			
15	gtc got	tct tgc	tgg agc	gag tgt	tct gca	acc tgt	ggc ttg	ggc gtg	3216
	Val Ala Ser	Ser Ser	Trp Ser	Glu Cys	Ser Ala	Thr Cys	Gly Leu	Gly Val	
		1060		1065		1070			
20	agg aag	agg gag	atg aag	tgc agc	gag aag	ggc ttc	cag gga	aag ctg	3264
	Arg Lys Arg	Glu Met	Lys Cys	Ser Glu	Lys Gly	Phe Gln	Gly Lys	Leu	
	1075		1080		1085				
25	ata act	ttc cca	gag cga	aga tgc	cgt aat	att aag	aaa cca	aat ctg	3312
	Ile Thr Phe	Pro Glu	Arg Arg	Cys Arg	Asn Ile	Lys Lys	Pro Asn	Leu	
	1090		1095		1100				
30	gac ttg	gaa gag	acc tgc	aac cga	cgg gct	tgc cca	gcc cat	cca gtg	3360
	Asp Leu Glu	Glu Thr	Cys Asn	Arg Arg	Ala Cys	Pro Ala	His Pro	Val	
	1105		1110		1115		1120		
35	tac aac	atg gta	gct gga	tgg tat	tca ttg	ccg tgg	cag cag	tgc aca	3408
	Tyr Asn Met	Val Ala	Gly Trp	Tyr Ser	Leu Pro	Trp Gln	Gln Cys	Thr	
		1125		1130		1135			
40	gtc acc	tgt ggg	gga ggg	gtc cag	acc cgg	tca gtc	cac tgt	gtt cag	3456
	Val Thr Cys	Gly Gly	Gly Val	Gln Thr	Arg Ser	Val His	Cys Val	Gln	
		1140		1145		1150			
45	caa ggc	cgg cct	tcc tca	agt tgt	ctg ctc	cat cag	aaa cct	ccg gtg	3504
	Gln Gly Arg	Pro Ser	Ser Ser	Cys Leu	Leu His	Gln Lys	Pro Pro	Val	
	1155		1160		1165				
50	cta cga	gcc tgt	aat aca	aac ttc	tgt oca	gct cct	gaa aag	aga gag	3552
	Leu Arg Ala	Cys Asn	Thr Asn	Phe Cys	Pro Ala	Pro Glu	Lys Arg	Glu	
	1170		1175		1180				
55	gat coa	tcc tgc	gta gat	ttc ttc	aac tgg	tgt cac	cta gtt	cct cag	3600
	Asp Pro Ser	Cys Val	Asp Phe	Phe Asn	Trp Cys	His Leu	Val Pro	Gln	
	1185		1190		1195		1200		
60									
65									

ES 2 288 909 T3

cat ggt gtc tgc aac cac aag ttt tac gga aaa caa tgc tgc aag tca 3648
His Gly Val Cys Asn His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys Lys Ser
1205 1210 1215

tgc aca agg aag atc tga 3666
Cys Thr Arg Lys Ile
1220

<210> 2

<211> 1221

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

ES 2 288 909 T3

	Thr	Glu	Tyr	His	His	Arg	Arg	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Phe	Cys	Gly	Arg
					245					250					255	
5	Arg	Lys	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Pro	Pro	Thr	Glu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Arg
				260					265					270		
	Phe	Asp	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Ser	Ala	Gly	Lys
		275						280					285			
10	Ser	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Val	Ala	Asp	Lys	Lys
		290					295					300				
	Met	Val	Glu	Lys	His	Gly	Lys	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Tyr	Ile	Leu	Thr
	305					310					315				320	
15	Val	Met	Asn	Met	Val	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Gly	Thr	Ile	Gly	Ser
				325					330						335	
	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Val	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	
			340					345					350			
20	Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	His	His	Ala	Asp	Gln	Ser	Leu	Asn	Ser	Phe
			355				360						365			
	Cys	Gln	Trp	Gln	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Lys	Arg	His	Asp
		370					375					380				
25	His	Ala	Ile	Leu	Leu	Thr	Gly	Phe	Asp	Ile	Cys	Ser	Trp	Lys	Asn	Glu
	385					390					395				400	
	Pro	Cys	Asp	Thr	Leu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Met	Cys	Ser	Lys
				405					410					415		
30	Tyr	Arg	Ser	Cys	Thr	Ile	Asn	Glu	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe
			420					425					430			
	Thr	Ile	Ala	His	Glu	Ser	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Met	Ile	His	Asp	Gly
35			435				440					445				
	Glu	Gly	Asn	Pro	Cys	Arg	Lys	Ala	Glu	Gly	Asn	Ile	Met	Ser	Pro	Thr
		450					455					460				
40	Leu	Thr	Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Phe	Ser	Trp	Ser	Ser	Cys	Ser	Arg	Gln
	465					470					475				480	
	Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Cys	Leu	Val	Asp
				485					490					495		
45	Glu	Pro	Lys	Gln	Ala	Gly	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Lys	Leu	Pro	Gly
			500						505				510			
	Gln	Ile	Tyr	Asp	Ala	Asp	Thr	Gln	Cys	Lys	Trp	Gln	Phe	Gly	Ala	Lys
		515					520					525				
50	Ala	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Gly	Phe	Val	Lys	Asp	Ile	Cys	Lys	Ser	Leu
		530					535				540					
	Trp	Cys	His	Arg	Val	Gly	His	Arg	Cys	Glu	Thr	Lys	Phe	Met	Pro	Ala
	545					550					555				560	
55	Ala	Glu	Gly	Thr	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Met	Trp	Cys	Arg	Gln	Gly	Gln
				565					570					575		
	Cys	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	Leu	Gly	Pro	Arg	Pro	Ile	His	Gly	Gln	Trp
			580					585				590				
60	Ser	Ala	Trp	Ser	Lys	Trp	Ser	Glu	Cys	Ser	Arg	Thr	Cys	Gly	Gly	Gly
			595					600					605			

ES 2 288 909 T3

	Val	Lys	Phe	Gln	Glu	Arg	His	Cys	Asn	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Gly
	610						615					620				
5	Gly	Leu	Phe	Cys	Pro	Gly	Ser	Ser	Arg	Ile	Tyr	Gln	Leu	Cys	Asn	Ile
	625					630					635					640
	Asn	Pro	Cys	Asn	Glu	Asn	Ser	Leu	Asp	Phe	Arg	Ala	Gln	Gln	Cys	Ala
				645					650						655	
10	Glu	Tyr	Asn	Ser	Lys	Pro	Phe	Arg	Gly	Trp	Phe	Tyr	Gln	Trp	Lys	Pro
			660						665					670		
	Tyr	Thr	Lys	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Arg	Cys	Lys	Leu	Tyr	Cys	Lys	Ala
		675						680					685			
15	Glu	Asn	Phe	Glu	Phe	Phe	Phe	Ala	Met	Ser	Gly	Lys	Val	Lys	Asp	Gly
	690					695					700					
	Thr	Pro	Cys	Ser	Pro	Asn	Lys	Asn	Asp	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Val	Cys
	705					710					715					720
20	Glu	Leu	Val	Gly	Cys	Asp	His	Glu	Leu	Gly	Ser	Lys	Ala	Val	Ser	Asp
				725						730						735
	Ala	Cys	Gly	Val	Cys	Lys	Gly	Asp	Asn	Ser	Thr	Cys	Lys	Phe	Tyr	Lys
			740					745						750		
25	Gly	Leu	Tyr	Leu	Asn	Gln	His	Lys	Ala	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Val	Val
		755					760					765				
	Ile	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Arg	Ser	Ile	Glu	Ile	Gln	Glu	Leu	Gln	Val
	770					775					780					
30	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Leu
	785					790					795					800
	Thr	Gly	Gly	Trp	Ser	Ile	Asp	Trp	Pro	Gly	Glu	Phe	Pro	Phe	Ala	Gly
				805						810					815	
35	Thr	Thr	Phe	Glu	Tyr	Gln	Arg	Ser	Phe	Asn	Arg	Pro	Glu	Arg	Leu	Tyr
			820						825					830		
	Ala	Pro	Gly	Pro	Thr	Asn	Glu	Thr	Leu	Val	Phe	Glu	Ile	Leu	Met	Gln
		835					840					845				
40	Gly	Lys	Asn	Pro	Gly	Ile	Ala	Trp	Lys	Tyr	Ala	Leu	Pro	Lys	Val	Met
	850					855					860					
	Asn	Gly	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr	Lys	Arg	Pro	Ala	Tyr	Thr	Trp	Ser	Ile
	865					870					875					880
	Val	Gln	Ser	Glu	Cys	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ile	Asn	Val
				885						890					895	
50	Lys	Ala	Ile	Cys	Leu	Arg	Asp	Gln	Asn	Thr	Gln	Val	Asn	Ser	Ser	Phe
		900							905				910			
	Cys	Ser	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Pro	Lys	Ile	Cys	Asn	Ala
		915					920						925			
55	Phe	Ser	Cys	Pro	Ala	Tyr	Trp	Met	Pro	Gly	Glu	Trp	Ser	Thr	Cys	Ser
	930						935					940				
	Lys	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Ile	Gln	Cys	Val	Gln
	945					950					955					960
60	Lys	Lys	Pro	Phe	Gln	Lys	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	His	Ser	Leu	Cys	Pro
				965						970						975

ES 2 288 909 T3

Val Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Pro
 980 985 990
 Pro Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser Gln Cys Ser Lys Thr Cys Gly
 995 1000 1005
 Arg Gly Val Arg Lys Arg Glu Leu Leu Cys Lys Gly Ser Ala Ala Glu
 1010 1015 1020
 Thr Leu Pro Glu Ser Gln Cys Thr Ser Leu Pro Arg Pro Glu Leu Gln
 1025 1030 1035 1040
 Glu Gly Cys Val Leu Gly Arg Cys Pro Lys Asn Ser Arg Leu Gln Trp
 1045 1050 1055
 Val Ala Ser Ser Trp Ser Glu Cys Ser Ala Thr Cys Gly Leu Gly Val
 1060 1065 1070
 Arg Lys Arg Glu Met Lys Cys Ser Glu Lys Gly Phe Gln Gly Lys Leu
 1075 1080 1085
 Ile Thr Phe Pro Glu Arg Arg Cys Arg Asn Ile Lys Lys Pro Asn Leu
 1090 1095 1100
 Asp Leu Glu Glu Thr Cys Asn Arg Arg Ala Cys Pro Ala His Pro Val
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Asn Met Val Ala Gly Trp Tyr Ser Leu Pro Trp Gln Gln Cys Thr
 1125 1130 1135
 Val Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val His Cys Val Gln
 1140 1145 1150
 Gln Gly Arg Pro Ser Ser Ser Cys Leu Leu His Gln Lys Pro Pro Val
 1155 1160 1165
 Leu Arg Ala Cys Asn Thr Asn Phe Cys Pro Ala Pro Glu Lys Arg Glu
 1170 1175 1180
 Asp Pro Ser Cys Val Asp Phe Phe Asn Trp Cys His Leu Val Pro Gln
 1185 1190 1195 1200
 His Gly Val Cys Asn His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys Lys Ser
 1205 1210 1215
 Cys Thr Arg Lys Ile
 1220

45 <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada
 55 <400> 3

getctagacc atggagtgcg ccctcctgct cgcgtgtgcc

40

60 <210> 4
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada

ES 2 288 909 T3

	<400> 4	
	agagcggccg cgccttata aaacttgcaa gttgaattat c	41
5	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
15	<400> 5	
	acgggggttg tgaactagt ggatgtga	28
20	<210> 6	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
30	<400> 6	
	agagcggccg cgatcttcct tgtgcatgac ttgcagcatt g	41
35	<210> 7	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de ligadores artificialmente sintetizada	
45	<400> 7	
	ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa	50
50	<210> 8	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de ligadores artificialmente sintetizada	
	<400> 8	
60	gatcttatca ttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg	50
	<210> 9	
	<211> 34	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 288 909 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
5	<400> 9	
	ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc	34
10	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
	<400> 10	
20	ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc	29
	<210> 11	
25	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
	<400> 11	
35	taggatcctt gtagaaactt cagacatga caactcg	37
	<210> 12	
40	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebadores artificialmente sintetizada	
	<400> 12	
50	atggatcctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcattgtg ccgggacag	59
	<210> 13	
	<211> 97	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de ligadores artificialmente sintetizada	
	<400> 13	
65	agettgcoac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat cttctgcctg gtattcgccg 60 actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97	

ES 2 288 909 T3

	<210> 14	
	<211> 97	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de ligadores artificialmente sintetizada	
10	<400> 14	
	tcgagactag tggatccct tgatcctc gtcttctag tggcgaata ccaggcagaa 60	
15	gatgtagctc agggcgatga tctcttcat ggtggca 97	
	<210> 15	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15	
25	tttcccaggt caagatggtc	20
	<210> 16	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 16	
	cttcagcacc tgtctacca	20
40	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
	gtgttgctgg tgaaaagggt	20
50	<210> 18	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18	
60	gggatccac tggcctaata	20
	<210> 19	
65	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 288 909 T3

	<400> 19	
	cagtggaatg tgctctaagt accgaagttg	30
5	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
15	acactgtgtg tcagcatcat aaatctgtcc	30
	<210> 21	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
25	caacgaattt ggctacagca ac	22
	<210> 22	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 22	
	ctacatggca actgtgagga gg	22
40	<210> 23	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia artificialmente sintetizada que contiene una secuencia de reconocimiento Not I de la enzima de restricción y secuencia de marca FLAG	
50	<400> 23	
	Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
	1 5 10	
55	<210> 24	
	<210> 24	
	<211> 5	
60	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> característica miscelánea	
	<222> (3).. (4)	
	<223> Xaa significa un aminoácido arbitrario.	

ES 2 288 909 T3

<400> 24

His Glu Xaa Xaa His
1 5

5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

15 Asn Ile Thr Gly Glu
1 5

<210> 26

20 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 26

Ala Arg Gly Ser Val
1 5

30

35

40

45

50

55

60

65