



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 882**

(51) Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02728619 .4**

(96) Fecha de presentación : **29.03.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1415154**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

(54) Título: **Control de crecimiento y reparación de tejidos gastrointestinales por gastroquinas.**

(30) Prioridad: **29.03.2001 US 821726**

(73) Titular/es: **The University of Chicago**  
**5801 South Ellis Street**  
**Chicago, Illinois 60637, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2010**

(72) Inventor/es: **Toback, Gary, F.;**  
**Martin, Terrence E. y**  
**Walsh-Reitz, Margaret**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2010**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 882 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Control de crecimiento y reparación de tejidos gastrointestinales por gastroquinas.

5 Se caracteriza un nuevo grupo de Proteínas de la Mucosa del Antro Gástrico que son gastroquinas. Un miembro del grupo de gastroquinas se denomina AMP-18, se secuencian moléculas de ADN genómico y ADNc de AMP-18 para el ser humano y el ratón, y se predicen las secuencias proteicas a partir de las secuencias de nucleótidos. La molécula de ADNc para AMP-18 de cerdo se secuencia y se confirma por secuenciación parcial de la proteína natural. La proteína AMP-18 y péptidos activos derivados de su secuencia son factores de crecimiento celular. Sorprendentemente, péptidos capaces de inhibir los efectos de la proteína completa, también derivan de la secuencia proteica de AMP-18. El control 10 del crecimiento de tejidos gastrointestinales de mamífero y su reparación está facilitado por el uso de la proteína o péptidos, haciendo de la proteína y los péptidos derivados candidatos para terapias.

Búsquedas de factores que afecten al tracto gastrointestinal (GI) de mamíferos están motivadas por la necesidad de 15 agentes de diagnóstico y terapéuticos. Una proteína puede quedar como parte de la capa de mucina, proporcionando protección mecánica (por ejemplo, lubricante o estabilizador de gel) y química (por ejemplo, contra el ácido estomacal, quizás ayudando a mantener el gradiente de pH del moco y/o la barrera hidrófoba) a los tejidos subyacentes. Se ha sugerido que la familia de péptidos trébol tiene tales tareas citoprotectoras generales (véase Sands y Podolsky, 1996). Como alternativa, una actividad tipo citoquina podría ayudar a restaurar los epitelios dañados. Una sugerencia de 20 que los péptidos trébol pueden actuar conjuntamente con otros factores para mantener y reparar el epitelio, subraya adicionalmente la complejidad de las interacciones que tienen lugar en el tracto gastrointestinal (Podolsky, 1997). El mantenimiento de la integridad del epitelio GI es esencial para el bienestar continuado de un mamífero, y el cierre de heridas después de una lesión sucede normalmente muy rápidamente (Lacy, 1988), seguido de la proliferación y 25 diferenciación poco después para restablecer la integridad epitelial (Nursat y col., 1992). Por tanto, la protección y la restitución son dos características críticas de un tracto gastrointestinal sano, y pueden ser importantes en el entorno extracelular relativamente riguroso del estómago.

Búsquedas de proteínas GI han encontrado algo de éxito. Se describieron secuencias de ADN complementario (ADNc) a ARN mensajeros (ARNm) aislados de células estomacales humanas y porcinas en la University of Chicago 30 Ph.D. tesis "Characterization of a novel messenger RNA and immunochemical detection of its protein from porcine gastric mucosa", diciembre de 1987, por uno de los presentes inventores trabajando con los otros inventores. Sin embargo, había varios errores de secuenciación del ADNc que condujeron a cambios aminoacídicos significativos a partir de la proteína AMP-18 descrita en este documento. La propia proteína se aisló y se purificó solamente como 35 un aspecto de la presente invención, y se realizaron análisis funcionales para determinar su utilidad. Se buscaban las secuencias de ácido nucleico.

El documento EP-A1 0 972 830 describe un procedimiento para detectar una célula cancerosa caracterizado porque se detecta un producto de expresión de un gen capaz de cambiar el nivel de expresión del mismo debido a la 40 canceración.

La invención se refiere a composiciones y usos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un producto génico denominado Proteína de la Mucosa del Antro 18 ("AMP-18") es una gastroquina. La proteína se descubrió en células de la mucosa del antro estomacal por análisis de clones de ADNc obtenidos de seres humanos, 45 cerdos, y ratones. La proteína es un miembro de un grupo de factores de crecimiento celular o citoquinas, más específicamente gastroquinas. Las secuencias de ADNc de AMP-18 predicen una proteína de 185 aminoácidos de longitud tanto para el cerdo como para el hombre. Las secuencias de nucleótidos también predicen una secuencia señal N-terminal de 20 aminoácidos para proteínas secretadas. La escisión del péptido N-terminal del precursor (preAMP-18) se confirmó para la proteína de cerdo; esta escisión produce una proteína secretada de 165 aminoácidos de longitud y 50 aproximadamente 18.000 Dalton (18 kD) de tamaño. También se obtuvieron y secuenciaron las secuencias de ADN genómico humanas y de ratón. Se aisló un ADN genómico humano en 4 fragmentos solapantes de tamaños de 1,6 kb, 3 kb, 3,3 kb y 1,1 kb respectivamente. La secuencia de ADN genómica de ratón se aisló en un único clon BAC.

La gastroquina denominada proteína AMP-18 se expresa a elevados niveles en células del antro gástrico. La proteína es apenas detectable en el resto del estómago o duodeno, y no se encontró, o se encontró en bajos niveles, en otros tejidos corporales ensayados. El AMP-18 se sintetiza en las células de la mucosa de la superficie luminal, y se secreta junto con gránulos de mucina.

Estudios en seres humanos confirman la localización y expresión del péptido AMP-18 en mucosa gástrica humana.

Composiciones de AMP-18 aislada de tejido del antro de ratón y cerdo estimulan el crecimiento de células epiteliales de estómago, intestinales, y renales confluyentes en cultivo; también se ha demostrado que células humanas, de mono, perro y rata responden. Este efecto mitogénico (estimulación del crecimiento) se inhibe por antisueros específicos (anticuerpos) contra AMP-18, que apoya la conclusión de que AMP-18, o sus productos, por ejemplo péptidos derivados de la proteína por aislamiento de segmentos de la proteína o por síntesis, es un factor de crecimiento. De hecho, ciertos péptidos sintéticos cuyas secuencias de aminoácidos representan una región central de la proteína AMP-18 también tienen una actividad de factor de crecimiento. Los péptidos también aceleran la reparación de heridas en 60 ensayos de cultivo tisular, lo que indica un efecto estimulador sobre la migración celular, el proceso que media la

restitución de lesiones de la mucosa estomacal. Por tanto, la proteína y sus péptidos activos son motógenos. Inesperadamente, péptidos derivados de sub-dominios de la molécula precursora pueden inhibir el efecto mitogénico de péptidos sintéticos bioactivos y de la proteína natural intacta presente en extractos estomacales.

5 Hay 3 actividades de las proteínas y péptidos gastroquina de la presente invención. Las proteínas son motógenos porque estimulan la migración de las células. Son mitógenos porque estimulan la división celular. Funcionan como agentes citoprotectores porque mantienen la integridad del epitelio (como se muestra por la protección conferida sobre capas celulares epiteliales eléctricamente resistentes en cultivo tisular tratado con agentes dañinos tales como oxidantes o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos AINE).

10 La síntesis de AMP-18 está confinada a las células epiteliales del revestimiento mucoso luminal del antro gástrico de seres humanos y otros mamíferos. En el interior de las células la proteína se co-localiza con mucinas en gránulos de secreción, y parece secretarse en el moco que cubre la membrana plasmática apical. La AMP-18 humana recombinante en *E. coli* ejerce su efecto mitogénico a una concentración un orden de magnitud inferior que los péptidos promotores 15 del crecimiento derivados del centro de la proteína madura. El péptido 77-97, el péptido mitogénico más potente, es específico de secuencia de aminoácidos. Parece que los péptidos AMP son específicos de tipo celular ya que no estimulan el crecimiento de fibroblastos o células HeLa. Parece que la mitogénesis por péptidos AMP específicos está mediada por un receptor de superficie celular porque ciertos péptidos que no son mitógenos activos pueden inhibir de forma competitiva, de una manera dependiente de la concentración, los efectos estimuladores del crecimiento 20 del péptido 58-99 y extractos celulares del antro. La AMP-18 y sus péptidos derivados muestran diversos efectos sobre las células epiteliales estomacales e intestinales lo que sugiere que podrían desempeñar una tarea crítica en la reparación después de una lesión de la mucosa gástrica. Estos incluyen citoprotección, mitogénesis, restitución, y maduración de la función de barrera después de una lesión mediada por un oxidante y/o indometacina. Los posibles 25 mecanismos por los que AMP-18 o sus derivados peptídicos median sus efectos pleiotrópicos incluyen estimulación de la actividad tirosina quinasa de proteínas, la prolongación de la expresión de la proteína de choque por calor después de estrés celular, y la acumulación potenciada de la proteína asociada a uniones fuertes ZO-1 y ocludina. Ciertos de estos efectos fisiológicos pueden suceder a concentraciones que son relativamente bajas para rhAMP-18 (<50 nM) en comparación con las concentraciones de otros mediadores peptídicos gástricos tales como péptidos trébol o  $\alpha$ -defensina, criptidina 3 (>100  $\mu$ M). Aparentemente la AMP-18 inmunorreactiva se libera por células del antro de ratón 30 después de alimentación forzada con indometacina, y por células del antro canino en cultivo primario expuesto a forskolina, lo que sugiere que la proteína está sujeta a regulación. Estos resultados suponen que la AMP-18 podría desempeñar una tarea en procesos fisiológicos y patológicos tales como curación de heridas en el epitelio de la mucosa gástrica *in vivo*.

35 Se describe un grupo de proteínas estimuladoras del crecimiento celular homólogas aisladas denominadas gastroquinas, que se producen por las células epiteliales gástricas e incluyen las secuencias de aminoácidos consenso VKE (K/Q)KXXKGPGG(P/A)PPK en las que XX puede ser LQ o estar ausente. Una proteína aislada del grupo tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Fig. 7. La proteína presente en epitelios gástricos de cerdo en una forma procesada que carece de los 20 aminoácidos que constituyen una secuencia de péptido señal, tiene 165 aminoácidos y un peso molecular estimado de aproximadamente 18 kD medido por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los péptidos señal se escinden después de su paso a través del retículo endoplasmático (RE). La proteína es capaz de 40 secretarse. La secuencia de aminoácidos mostrada en la Fig. 3 se dedujo a partir de una secuencia de ADNc humana. Se muestra una realización de la proteína con una secuencia de aminoácidos como en la Fig. 6, una secuencia predicha a partir de ARN y ADN de ratón.

45 Un péptido estimulador del crecimiento (bioactivo) puede obtenerse de una proteína del grupo de gastroquinas. Se prefieren péptidos bioactivos en lugar de proteínas para su uso porque son más pequeños, por consiguiente el coste para sintetizarlos es más bajo que para la proteína completa.

50 Además, puede producirse un péptido modificado por el siguiente procedimiento:

(a) eliminar los sitios de proteasa principales en una secuencia de aminoácidos de un péptido no modificado por sustitución o delección de aminoácidos; y/o

55 (b) introducir en el aminoácido modificado análogos aminoacídicos en el péptido no modificado.

Un aspecto es un péptido estimulador del crecimiento sintético, que tiene una secuencia de aminoácidos de las 60 posiciones 78 a 119 como se muestra en la Fig. 3.

Otro péptido tiene una secuencia de aminoácidos de la posición 97 a la posición 117 como se muestra en la Fig. 3.

Otro péptido tiene una secuencia de aminoácidos de la posición 97 a la posición 121 como se muestra en la Fig. 3.

65 Otro péptido tiene una secuencia de aminoácidos de la posición 104 a la posición 117 como se muestra en la Fig. 3.

# ES 2 332 882 T3

Una realización de un péptido bioactivo aislado tiene una de las siguientes secuencias: KKLQGKGPGGGPPPK LDALVKEKKLQQKGPGGPPPK o LDALVKEKKLQQKGPGGPPPKGLMY. Una realización de un inhibidor de una proteína del grupo de gastroquinas tiene la secuencia de aminoácidos KKTCIVHKMKK o KKEVMPSIQSL DALVKEKK (véase también la Tabla 1).

5 Se describe una composición farmacéutica que incluye al menos un péptido estimulador del crecimiento.

Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con el crecimiento excesivo de los epitelios gástricos, incluye un inhibidor de una proteína del grupo de gastroquinas o de un péptido estimulador del crecimiento derivado de las proteínas gastroquinas.

10 Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades del colon y el intestino delgado incluye al menos un péptido estimulador del crecimiento de la presente invención. Ejemplos de dichas enfermedades incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

15 20 Se produjeron anticuerpos contra el producto proteico AMP-18 codificado por el ADNc humano expresado en bacterias en conejos; estos anticuerpos reaccionaban con antígenos del antro de 18 kD de todas las especies de mamíferos ensayadas (ser humano, cerdo, cabra, oveja, rata y ratón), proporcionando un procedimiento útil para detectar gastroquinas. Un anticuerpo contra una proteína del grupo reconoce un epítope dentro de un péptido de la proteína que incluye una secuencia de aminoácidos de la posición 78 a la posición 119 como en la Fig. 3.

25 Se describe una molécula de ADN genómico aislada con la secuencia de nucleótidos de un ser humano como se muestra en la Fig. 1 y una molécula de ADNc aislada que codifica una proteína humana, con la secuencia de nucleótidos como se muestra en la Fig. 2.

30 Se describe una molécula de ADN aislada que tiene la secuencia genómica encontrada en ADN derivado de un ratón, como se muestra en la Fig. 4.

35 El ADN genómico tiene valor porque incluye elementos reguladores para la expresión gástrica de genes, por consiguiente, los elementos reguladores pueden aislarse y usarse para expresar otras secuencias génicas diferentes a gastroquinas en tejido gástrico.

40 Un ratón con una delección dirigida en una secuencia de nucleótidos en el genoma de ratón que, cuando se expresa sin la delección, codifica una proteína del grupo de gastroquinas.

45 Se describe un procedimiento para preparar una proteína gastroquina o un péptido derivado de una proteína gastroquina. El procedimiento incluye:

50 40 (a) obtener una molécula de ADNc aislada con una secuencia tal como la mostrada en la Fig. 2;

(b) colocar la molécula en un vector de expresión de ADN recombinante;

(c) transfectar una célula huésped con el vector de expresión de ADN recombinante;

55 45 (d) proporcionar condiciones ambientales que permitan que la célula huésped transfectada produzca una proteína codificada por la molécula de ADNc; y

(e) purificar la proteína a partir de la célula huésped.

50 Las células huésped en las que ha sido exitosa la expresión incluyen baculovirus, que permiten proporcionar grandes cantidades de gastroquinas para usos comerciales y de investigación. Por ejemplo, se produjo la proteína AMP-18 humana sin el péptido señal.

55 Una proteína humana recombinante AMP-18 expresada en *E. coli* tiene la secuencia de la Fig. 14, panel de la izquierda.

60 Se describe un procedimiento para estimular el crecimiento de células epiteliales en el tracto gastrointestinal de mamíferos. El procedimiento incluye las etapas de:

65 60 (a) poner en contacto las células epiteliales con una composición que comprende una proteína gastroquina o un péptido derivado de una proteína del grupo; y

(b) proporcionar condiciones ambientales para estimular el crecimiento de las células epiteliales.

# ES 2 332 882 T3

Un procedimiento para inhibir la actividad estimuladora del crecimiento celular de una proteína del grupo incluye las etapas de:

- 5           (a) poner en contacto la proteína con un inhibidor; y  
             (b) proporcionar condiciones ambientales adecuadas para la actividad estimuladora del crecimiento celular de la proteína.

10          El inhibidor puede ser un anticuerpo dirigido hacia al menos un epítope de la proteína, por ejemplo un epítope con una secuencia de aminoácidos de la posición 78 a la posición 119 de la secuencia de aminoácidos deducida de la Fig. 3 o un péptido inhibidor tal como los de la Tabla 1.

15          Un procedimiento para ensayar los efectos de diferentes niveles de expresión de una proteína sobre epitelios del tracto gastrointestinal de mamíferos, incluye las etapas de:

- 20           (a) obtener un ratón con una proteína gastroquina inactiva o ausente;  
             (b) determinar los efectos de la ausencia de la proteína en el ratón;  
             (c) administrar niveles crecientes de la proteína al ratón; y  
             (d) correlacionar los cambios en los epitelios del tracto gastrointestinal con los niveles de la proteína en los epitelios.  
25

30          Se contemplan kits que usarán anticuerpos contra gastroquinas para medir sus niveles por inmunología cuantitativa. Los niveles pueden correlacionarse con patologías y efectos de tratamiento.

35          Un procedimiento para estimular la migración de células epiteliales al tracto gastrointestinal de mamíferos, incluye las etapas de:

- 40           (a) poner en contacto las células epiteliales con una composición que comprende un péptido derivado de la proteína; y  
             (b) proporcionar condiciones ambientales que permitan la migración de las células epiteliales.  
45

40          Un procedimiento para la citoprotección de células epiteliales dañadas en el tracto gastrointestinal de mamíferos, incluye las siguientes etapas:

- 45           (a) poner en contacto las células epiteliales dañadas con una composición que incluye una proteína del grupo de gastroquinas o un péptido derivado de la proteína; y  
             (b) proporcionar condiciones ambientales que permitan la reparación de las células epiteliales.

50          Las células dañadas pueden formar una úlcera.

## Breve descripción de los dibujos

55          La Fig. 1 es una secuencia de nucleótidos genómica humana de una pre-gastroquina; las características de secuencia se determinaron a partir de ADNc y PCR del ADN genómico humano amph-ge8.seq Longitud: 7995 promotor predicho: 1405; exón 1: 1436-1490; exón 2: 4292-4345; exón 3: 4434-4571; exón 4: 5668-5778; exón 5: 6709-6856; exón 6: 7525-7770; sitio poliA: 7751.

60          La Fig. 2 es una secuencia de ADNc humano; el clon de ADN se obtuvo por clonación de expresión diferencial de bibliotecas de ADNc gástrico humano.

65          La Fig. 3 es una secuencia proteica de preAMP-18 humana predicha a partir de un clon de ADNc basado en Powell (1987) y revisado por los presentes inventores; N-21 es el extremo N-terminal esperado de la proteína madura.

65          La Fig. 4 es una secuencia de preAMP-18 de ratón determinada a partir de RT-PCR de ARNm y PCR de clones BAC de secuencias de ADN genómico de ratón:

# ES 2 332 882 T3

promotor predicho: 1874 sitio de inicio de la transcripción experimental: 1906 sitio de inicio de la traducción: 1945 CDS 1: 1906-1956; CDS 2: 3532-3582; CDS 3: 3673-3813; CDS 4: 4595-4705; CDS 5: 5608-5749; CDS 6: 6445-6542; sitio poliA: 6636.

5 La Fig. 5 es una secuencia de ADNc de ratón para preAMP-18.

La Fig. 6 es una secuencia de aminoácidos de preAMP-18 de ratón; se realizó RT-PCR sobre ARN aislado del antro del estómago de ratón: Y-21 es el extremo N-terminal predicho de la proteína madura; los espacios indicados por .. significan que no hay nucleótidos ahí para alinearse con otras secuencias en la Fig. 11.

10 La Fig. 7 es un ADNc que expresa AMP-18 porcina.

15 La Fig. 8 es una secuencia proteica de pre-gastroquina de cerdo (pre-AMP-18) predicha a partir de un clon de ADNc basada en Powell (1987) D-21 es el extremo N-terminal de la proteína madura - confirmado por secuenciación de la proteína aislada de estómago de cerdo.

La Fig. 9 es una comparación entre las secuencias de aminoácidos de pre-gastroquina humana frente a la de cerdo.

20 La Fig. 10 muestra una comparación de alineamiento generada por ordenador de secuencias proteicas predichas de ser humano, cerdo y ratón determinadas a partir de la secuenciación de clones de ADNc para AMP-18 humana y de cerdo, y por reacción en cadena de la polimerasa de ARN y ADN de ratón usando cebadores oligonucleotídicos específicos de preAMP-18; en cada caso los primeros 20 aminoácidos constituyen el péptido señal, escindido después del paso a través de la membrana del retículo endoplasmático.

25 La Fig. 11 muestra el efecto de extracto de la mucosa del antro gástrico porcino, el péptido 77-97 de AMP humana, de la proteína madura (igual que el péptido 97-117 de la proteína precursora humana: Tabla 1) y EGF sobre el crecimiento de células epiteliales gástricas; se cultivaron células AGS en DMEM que contenía suero bovino fetal (5%) en placas de 60 mm; se añadieron diferentes cantidades de extracto de antro de cerdo, péptido 77-97 purificado por HPLC, y/o EGF; cuatro días después las células se dispersaron y se contaron con un hemocitómetro; el extracto del antro y los péptidos estimularon cada uno el crecimiento celular de una manera dependiente de la concentración; el gráfico de barras muestra que a dosis de saturación, el péptido 77-97 (8 µg/ml) o EGF (50 ng/ml) era mitogénico; juntos eran aditivos lo que sugiere que los dos mitógenos actúan usando diferentes receptores y/o vías de señalización; anticuerpos anti-AMP inhibían el extracto del antro pero no inhibían el péptido 77-97.

35 La Fig. 12 muestra la estructura de los genes de preAMP-18 humana y de ratón; la cantidad de pares de bases en los intrones se muestran encima de las barras; los exones se indican E1-E6 y los intrones I1-I5; hay diferencias minoritarias en la longitud de los intrones.

40 La Fig. 13 muestra el *Panel de la izquierda*. Secuencia de aminoácidos de AMP-18 humana recombinante expresada en *E. coli*. Obsérvese la marca His6 dentro de un dominio de 12 aminoácidos en el extremo N-terminal que ha remplazado el péptido señal hidrófobo putativo. *Panel de la derecha*. Efecto de rhAMP-18 y el péptido 77-97 de AMP sobre el crecimiento de cultivos confluyentes de células IEC-18. Aunque la estimulación máxima del crecimiento es similar, la concentración mitad de la máxima ( $K_{1/2}$ ) para rhAMP-18 (~30 nM) es aproximadamente un orden de magnitud inferior que para el péptido (~300 nM).

45 La Fig. 14 muestra *Panel de la izquierda*. Alineamiento de las fases de lectura abierta (ORF) derivadas de los clones de ADNc para AMP-18 para las proteínas precursoras de antro humano y de cerdo. La similitud era del 78,50% y la identidad era del 75,27%. Se realizó análisis informático usando los programas GAP y PEPTIDESTRUCTRE del Wisconsin Package (GCG). *Panel de la derecha*. Modelo de la estructura secundaria predicha para la ORF de preAMP humana. Llama la atención el dominio N-terminal rico en asparagina, las cortas regiones ricas en triptófano (W) y de glicina-prolina (GP), y las posiciones conservadas de los cuatro restos de cisteína (C). Se indican posibles hélices anfipáticas.

55 La Fig. 15 muestra el efecto de extracto celular de antro porcino, péptido 77-97, y EGF sobre el crecimiento de células epiteliales intestinales. Se cultivaron células IEC-6 en placas de 60 mm. El extracto celular del antro (*panel de la izquierda*) y el péptido 77-97 (*panel central*) estimulaban cada uno el crecimiento de una manera dependiente de la concentración. El péptido 77-97 (1 µg/ml) parecía más potente que EGF (50 ng/ml) (*panel de la derecha*). Los valores son medias ± ET para 3 cultivos.

60 La Fig. 16 muestra el efecto del péptido 77-99 de AMP y EGF sobre el crecimiento y la restitución de heridas por células epiteliales de antro humano. Para medir el crecimiento (*panel de la izquierda*), se sembraron células HAE en placas de 60 mm. Se añadieron péptido 77-97 (8 µg/ml), o EGF (50 ng/ml), o ambos al medio y se contó la cantidad de células 4 días después. El péptido 77-97 y EGF estimulaban cada uno la proliferación, y parecían ser aditivos. Los valores son medias ± ET para 3 cultivos. Para medir la migración (*panel de la derecha*), se cultivaron células en placas de 60 mm para preparar una monocapa confluyente. El medio se aspiró y se remplazó con medio fresco que contenía suero de ternera (CS) al 0,01%. La monocapa se hirió mecánicamente raspando con una cuchilla. Se retiraron las células desprendidas aspirando el medio, y se aclararon las células restantes dos veces con medio fresco que contenía CS al 0,01%. Se añadió medio fresco (5 ml) que contenía CS (0,01%) e insulina (100 U/l) a los cultivos heridos.

## ES 2 332 882 T3

Se añadieron péptido 77-97 (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), EGF (50 ng/ml), o ambos a cultivos duplicados. Se evaluó la migración a 24, 48 y 72 h después de la herida midiendo la distancia (en mm) que habían migrado las células desde el borde de la herida usando una retícula de lente de microscopio (10 mm de longitud; marcas de 0,1 mm). Se midieron las células migratorias en 12 sitios elegidos aleatoriamente a lo largo de una extensión de 0,25 mm del borde de la herida a un aumento de 40 veces. Se midió la migración en 2 sitios diferentes para cada una de 2 heridas diferentes hechas en cada cultivo. Los valores son la distancia media que las células se movieron en el área despojada desde el borde de 4 heridas diferentes en 2 cultivos  $\pm$  ET. Las células expuestas al péptido 77-97 migraban más desde el borde de la herida que las expuestas a vehículo a las 72 h. EGF también estimulaba el movimiento celular, y los dos agentes actuando juntos potenciaban marcadamente la migración.

La Fig. 17 muestra el efecto del péptido 67-85 de AMP sobre el crecimiento de células epiteliales intestinales estimuladas por péptido 58-99. Se prepararon cultivos confluentes de células IEC-18. Un día después, se aspiró el medio y se remplazó con 5 ml de DMEM que contenía CS (0,5%) e insulina, sin (control) o con péptido 58-99 mitogénico (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se incubaron placas hermanas que recibieron 1 ml de medio y diferentes cantidades de péptido 67-85 a 1 h a 38°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>, y después se añadió un ml adicional de medio a cada placa. Se añadió péptido 58-99 a 2 de las 4 placas hermanas a cada concentración de péptido 67-85, y se contó la cantidad de células. En ausencia de péptido 67-85, la cantidad de células aumentó en un 290%, mientras que las células expuestas a péptido 58-99 aumentaron en cantidad en un 407%, y las células tratadas con EGF (50 ng/ml) aumentaron en un 402% (no mostrado) durante los siguientes 3 días. La estimulación del crecimiento celular por el péptido 58-99 mitogénico se suprimió completamente por preincubación de las células con 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de péptido 67-85. Cuando se añadía solo, el péptido 67-85 (0,25 a 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no era un mitógeno. Los valores para la cantidad de células por cultivo se muestran con relación a la multiplicación de las células expuestas al vehículo durante el mismo periodo.

La Fig. 18 muestra el efecto de antisuero de conejo contra AMP-18 sobre el efecto mitogénico de rhAMP-18 sobre células IEC-18 confluentes. Cuando se preincubaba rhAMP-18 (50 nanomolar) durante 30 min. con antisuero (dilución 1:100 +Ab), la estimulación del crecimiento se reducía en ~95%; el suero preinmune no tenía efecto sobre el crecimiento celular. La concentración la mitad de la máxima ( $K_{1/2}$ ) para la estimulación del crecimiento de esta rhAMP-18 recién purificada es aproximadamente 5 nanomolar.

La Fig. 19 muestra el efecto de péptido 77-97 de AMP sobre la restitución de heridas en células epiteliales de antro humano (HAE) e intestinales de rata (IEC-18). Se hirieron mecánicamente cultivos en monocapa confluente raspando con una cuchilla, y se midió la distancia que las células migraban desde el borde de la herida usando una retícula de lente de microscopio. Las células migraban más en presencia de péptido AMP en cada momento puntual estudiado ( $P<0,005$ ).

La Fig. 20 muestra el efecto de péptido 77-97 de AMP sobre la maduración de la RTE. Se cultivaron cultivos en monocapa de células MDCK sobre filtros de policarbonato permeables (tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ ) (Transwell) en DMEM que contenía FBS (2%) sin (control) o con péptido 77-97 (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 8 días. Se midió la RTE medido 24 h después de sembrar las células, y a tiempos específicos después usando un medido epitelial de voltios-ohmios (EVOM, Millipore). Después de cada medición, se cambió el medio que contenía FBS sin o con péptido (0,48, y 144 h), y se añadió péptido 77-97 adicional (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a las 30 y 72 h. A las 72 h, la RTE en cultivos que recibieron péptido 77-97 era dos veces tan elevada como en cultivos de control. Los valores son medias para 3 cultivos; la varianza es <10% de la media. La RTE se midió a partir de 3 áreas diferentes sobre el filtro.

La Fig. 21 muestra el efecto de péptido 77-97 de AMP sobre la RTE en monocapas lesionadas con el oxidante monocloramina o indometacina. *Panel A:* Cuando se alcanzó una RTE estable ( $330 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) en monocapas de células MDCK se cambió el medio a DMEM que contenía FBS (0,2%), y péptido 77-97 (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o EGF (50 ng/ml). Después de 18 h, se añadió péptido 77-97 o EGF a los pocillos especificados. Una hora después la monocloramina (0,1 mM), como los otros agentes, se añadieron a los compartimentos apical y basal del Transwell. Los cultivos lesionados con monocloramina tratados con vehículo o EGF sostenían una pérdida de ~35-40% de la RTE 90 min. después de la exposición a oxidante, mientras que la RTE de células lesionadas con oxidante tratadas con péptido 77-97 era similar a los cultivos de control no expuestos al oxidante. *Paneles B, C:* Se cultivaron monocapas de subclones caco2/bbe (C2) sobre filtros de policarbonato revestidos de colágeno hasta que se alcanzó una RTE estable ( $225 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). El medio gastado se remplazó con medio fresco que contenía FBS (0,1%) solo o con péptido 77-97 (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después de 18 h, se añadió monocloramina (0,3 mM, B) o indometacina (0,1 mM, C) a ambos compartimentos del Transwell. A tiempo 0, los cultivos recibieron vehículo (control), vehículo más oxidante o indometacina, o péptido 77-97 y oxidante o indometacina. La RTE de cultivos lesionados tratados con vehículo disminuyó en ~35% a 90 min., mientras que los cultivos tratados con péptido disminuyeron en ~10%. El péptido no alteraba la RTE de células no lesionadas (no mostradas).

La Fig. 22 muestra el efecto de péptido 77-97 de AMP sobre la RTE después de lesión por DSS. Se cultivaron monocapas de células C2 en DMEM que contenía FBS (5%) y transferrina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sobre filtros de policarbonato revestidos de colágeno hasta que se alcanzaba una RTE estable ( $225 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). A tiempo 0, las células se expusieron a ausencia de DSS (control), o DSS (4%) en el compartimento superior del Transwell. Se añadió péptido 77-97 de AMP (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a los compartimentos superior e inferior del Transwell 1 dfa antes de la adición de DSS a tiempo 0. La RTE de cultivos lesionados con DSS tratados con vehículo disminuyó en ~70% a 45 min., mientras que los cultivos tratados con péptido disminuyeron en ~10% a ese tiempo. El péptido no alteraba la RTE de células no lesionadas. Los valores son medias para  $\geq 6$  cultivos.

# ES 2 332 882 T3

La Fig. 23 muestra el efecto de péptido 77-97 de AMP sobre la ZO-1 y la ocludina después de lesión oxidante de células C2. Esta inmunotransferencia muestra que los niveles de proteína en la fracción insoluble eran ~dos veces mayores después de la exposición de las células a péptido AMP que al vehículo.

5 La Fig. 24 muestra el efecto de péptido AMP sobre células C2. Los cultivos se expusieron al péptido durante diferentes períodos de tiempo y se obtuvo la fracción insoluble. Las proteínas se separaron, se sondearon las inmunotransferencias con antisueros específicos, y se cuantificó la cantidad de cada proteína usando densitometría láser.

10 La Fig. 25 muestra el efecto de rhAMP-18 sobre la RTE de monocapas sometidas a lesión oxidante. Se prepararon monocapas de células C2 confluyentes sobre Transwells hasta que se estableció una RTE estable. Se remplazó el medio con medio fresco que contenía FBS (0,1%) solo (control), o con rhAMP-18 (100 nanomolar) o péptido 77-97 (3,7 micromolar). Después de 18 h, se añadió monocloramina (0,3 mM) a ambos compartimentos del Transwell, y los cultivos recibieron vehículo (control), vehículo más oxidante, rhAMP-18 y oxidante, o péptido 77-97 y oxidante, 15 después de lo cual se midió la RTE.

15 La Fig. 26 muestra el efecto de rhAMP-19 sobre los niveles de ZO-1 y ocludina en células C2. Cultivos en monocapa se trataron con rhAMP-19 (100 nanomolar) o el vehículo durante 8 h. Después de la lisis celular, se preparó una fracción insoluble (particulada) que representaba las membranas celulares y la proteína TJ asociada al citoesqueleto y 20 después se sometió a inmunotransferencia. La cantidad de ZO-1 y ocludina inmunorreactivas es aproximadamente dos veces mayor en células tratadas con rhAMP-18 (+) que en células tratadas con vehículo (1) como se estimó por densitometría láser de la misma inmunotransferencia. Se documentó una carga proteica igual en cada carril re-sondeando la transferencia con un anticuerpo contra la proteína de choque por calor 73 que se expresa de forma constitutiva por estas células.

25 La Fig. 27 muestra *Panel de la izquierda*. Se dio a ratones (n=10) DSS al 3%, y se ensayaron diariamente las deposiciones. Menos animales que se les dio péptido AMP (3 mg/kg de peso corporal/día, s.c.) que vehículo dan deposición positiva a hemocultivo. *Panel de la derecha*. Después de que los animales recibieran DSS durante 4 días, se cambiaron a agua (*día 0* en la gráfica). Los ratones a los que se dio péptido AMP diariamente perdieron menos peso que a los que se dio vehículo en el día 5 ( $P<0,04$ ). El peso de animales tratados con péptido en los días 4 y 5 parecía 30 aumentar; disminuyó en aquellos a los que se dio vehículo.

## Descripción detallada de la invención

### 1. General

35 Se detectó un productor génico, un miembro de un grupo de gastroquinas, en la mucosa del antro gástrico de mamíferos por una exploración diferencial de bibliotecas de ADNc obtenidas de diferentes regiones del estómago de cerdo. La secuencia de ADNc predecía una proteína de 185 aminoácidos que incluye una secuencia líder de péptido señal. También se aisló un Adnc de una biblioteca humana. La secuencia de aminoácidos predicha tenía una identidad 40 entre cerdo y ser humano del 76,3%. Las secuencias predecían un péptido señal de 20 aminoácidos característico para proteínas secretadas. La escisión del péptido señal N-terminal se confirmó para la proteína de cerdo. Se crearon anticuerpos contra el producto del ADNc humano expresado en bacterias en conejos; estos anticuerpos reaccionaban con antígenos del antro de 18-20 kD de todas las especies de mamíferos ensayadas (cerdo, cabra, oveja, rata y ratón). De acuerdo con los niveles de ARNm, la proteína AMP-18 se expresa a elevados niveles solamente en el antro gástrico; 45 es apenas detectable en el resto del estómago o el duodeno, y no se detectaba en una diversidad de otros tejidos ensayados. La AMP-18 se sintetiza en las células mocoosas de la superficie luminal; microscopía inmune-electrónica localiza AMP-18 en los gránulos de secreción de estas células. Preparaciones de AMP-18 parcialmente purificadas de tejido del antro de ratón y cerdo son mitogénicas para células epiteliales confluyentes de estómago y riñón en cultivo; este efecto se inhibe por los antisueros específicos, lo que implica que AMP-18, o sus productos, es un factor de 50 crecimiento.

La AMP-18 se secreta probablemente con el muco y funciona, quizás como derivados peptídicos, dentro del gel mucoso para mantener la integridad epitelial directamente, y posiblemente para actuar contra patógenos. En vista de la actividad de factor de crecimiento observada sobre líneas celulares epiteliales en cultivo, es probable que AMP-55 18 o su(s) derivado(s) peptídico(s) sirvan como un factor autocrino (y posible paracrino) para el epitelio gástrico. La función de AMP-18 puede no ser simplemente como un mitógeno, sino que además puede actuar como factor de diferenciación proporcionando las señales para el reabastecimiento de las células de la superficie luminal maduras. La proteína AMP-18 o sus derivados probablemente son importantes para el mantenimiento normal de la mucosa gástrica elevadamente dinámica, así como el desempeño de una tarea crítica en la restitución del epitelio del antro después de 60 un daño. Esta proteína no se ha caracterizado adicionalmente en ninguna publicación, sin embargo, se ha informado de secuencias de ácido nucleico relacionadas como EST y como un gen de longitud completa similar. Las limitaciones de los datos de EST no pueden producir información sobre las secuencias de inicio, los péptidos señal, o secuencias en la proteína responsables de la bioactividad, como se describe en la presente invención. Se ha informado de varios de estos EST para ADNc de estómago de mamífero, pero también se ha informado de EST relacionados para bibliotecas 65 de páncreas y también útero preñado. Aunque la expresión del ARN de AMP-18 en estos otros tejidos parece ser bajo (como se indica para el páncreas por análisis de PCR), estos resultados sugieren que este factor de crecimiento puede tener tareas en el desarrollo y fisiológicas más amplias que las supuestas por los elevados niveles específicos de expresión encontrados para el estómago.

# ES 2 332 882 T3

La proteína AMP-18 parece expresarse en la superficie de las capas celulares del tracto gastrointestinal (GI). Las células en expresión pueden estar liberando factor de crecimiento almacenado cuando sea necesario - en las criptas y hendiduras del tracto GI donde se necesita reparación celular debido a un daño superficial.

- 5 La AMP-18 puede actuar sobre la mucosa, las superficies apicales de las células epiteliales, colaborando con prostaglandinas y otros factores de crecimiento que funcionan mediante receptores de superficie celular basolaterales sobre el lado serosal. La proteína o sus derivados probablemente son importantes para el mantenimiento normal de la mucosa gástrica altamente dinámica, contra el estrés mecánico y la elevada acidez del estómago. La AMP-18 puede desempeñar una tarea crítica en la reparación del epitelio del estómago después de un daño por agentes tales como  
10 alcohol, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), o patógenos, en particular *Helicobacter pylori*, que infecta predominantemente el antro y es un agente causante de úlceras gástricas y posiblemente cánceres.

## 2. Bioactividad

- 15 Un péptido sintético (42 aminoácidos, un “oligómero de 42 unidades”) que representa una región central de la secuencia de aminoácidos de AMP-18 también tiene actividad de factor de crecimiento, que se inhibe por antisueros específicos; algunos péptidos más cortos relacionados también tienen actividad estimuladora, aunque otros pueden inhibir la actividad del oligómero de 42 unidades. Este resultado sugiere que existe un receptor epitelial saturable para AMP-18, y abre vías directas para analizar las regiones bioactivas de la proteína e identificar el (los) receptor(es) putativo(s). Como AMP-18 no se parece en estructura a ninguna citoquina o proteína citoprotectora conocida (tal como los péptidos trébol), el análisis de las interacciones de la proteína, y sus péptidos relacionados activos e inhibidores, con células ofrece la oportunidad de revelar nuevas interacciones moleculares implicadas en el control del crecimiento celular.  
20
- 25 Se estimuló el crecimiento de células BSC-1 por extracto del antro porcino fraccionado en gel; se cargó proteína del extracto porcino (250 µg) en cada uno de los 2 carriles y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (12,5%); los 5 cortes delgados (2-3 mm) para cada área entre  $M_r$  14 kDa y 21,5 kDa se cortaron de los carriles experimentales. Cada par de cortes se puso en un tubo de microfuga silanizado con 200 µl de PBS estéril, acetonitrilo al 3% y BSA al 1%, y se maceró; las proteínas se eluyeron del gel durante 18 h a 22°C con agitación vigorosa; las muestras después de microcentrifugaron y se añadió una muestra de un sobrenadante a un cultivo confluente de células BSC-1; se contó la cantidad de células 4 días después; se observó estimulación de crecimiento máximo en cultivos que habían recibido extractos eluidos de cortes de gel correspondientes a  $M_r$  de ~18 kDa; los antisueros contra AMP-18 humana recombinante añadidos al medio de cultivo inhibían completamente la estimulación del crecimiento por la fracción de 18 kDa (+Ab); los valores son medias de 2 cultivos; el ET es menor del 10% de la media.  
30
- 35 La actividad biológica (mitogénicas para células epiteliales en el tracto gastrointestinal) de la AMP-18 se localiza en la mitad C-terminal de la proteína. La(s) secuencia(s) epitópica(s) parece(n) estar inmediatamente N-terminal(es) a la secuencia mitogénica.
- 40 La actividad biológica que es un factor de crecimiento, se muestra por un péptido que comprende al menos 42 aminoácidos de las posiciones 78 a 119 de la secuencia proteica de longitud completa. Un anticuerpo contra esta región bloqueaba la actividad mitogénica. Aunque un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de 104 a 117 tenía actividad mitogénica, un anticuerpo contra esta región no bloqueaba (inhibía) la actividad. Un péptido con una secuencia de aminoácidos de las posiciones 97-117 tiene la misma actividad mitogénica que un péptido con la secuencia de 42 aminoácidos, pero es menos caro de producir como un péptido sintético.  
45

## 3. Inhibición de Bioactividad

- 50 El crecimiento de células epiteliales que se estimuló por extracto celular de antro murino y porcino se bloqueó por anticuerpo de conejo contra una proteína precursora de AMP-18 humana recombinante completa; se prepararon cultivos confluentes de células BSC-1; se preparó extracto celular de antro murino o porcino y se midió su concentración de proteínas; se añadieron extractos celulares solos y con diferentes diluciones del anticuerpo, o anticuerpo solo (dilución 1:100) al medio de cultivo, y 4 días después se contó la cantidad de células. Se inhibió de forma máxima la estimulación del crecimiento por gastroquinas del antro murino por el anticuerpo (93%) a una dilución de 1:400, mientras que la estimulación por el extracto proteico del antro porcino se inhibió totalmente a una dilución de 1:100. Los valores anotados eran medias para 3 cultivos; el error típico de la media (ET) era menor del 10% de la media.  
55

- 60 Los anticuerpos contra la proteína AMP-18 tienen usos de diagnóstico para determinar diferentes niveles de la proteína en el tracto gastrointestinal *in vivo*. Probablemente se desarrollan úlceras si están presentes niveles inferiores a los normales de proteína AMP-18. Los valores normales se determinan por tecnologías conocidas para los especialistas en la técnica, es decir, obteniendo muestras representativas de personas a ensayar (categorías de edad, sexo, estado clínico) y aplicando técnicas convencionales de cuantificación de proteínas. Los efectos de la aspirina e indometacina sobre los niveles de AMP-18 también son útiles para controlar los niveles nocivos de fármacos que incluyen los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE). Líneas celulares de cáncer estomacal no expresan las proteínas AMP-18 al menos por procedimientos de detección descritos en este documento.  
65

#### 4. ADN Genómico

Se han clonado secuencias de ADN genómico de AMP-18 para ser humano y ratón como un preludio al análisis de los elementos reguladores génicos, que supuestamente determinan las grandes diferencias en los niveles de expresión del gen en tejidos en los que el gen puede ser activo. Se han aislado secuencias flanqueantes cadena arriba y cadena abajo de ADN genómico de ratón preparatorio para eliminación génica. Las secuencias genómicas flanqueantes probablemente determinan los niveles muy diferentes de expresión del gen en el estómago y otros pocos tejidos en los que puede expresarse. Con la implicación de diferentes elementos reguladores, podrían expresarse genes de gastroquina con un factor de crecimiento en otros tejidos.

#### 5. Usos de Gastroquinas de la Presente Invención

Como la proteína AMP-18 y ciertos péptidos derivados de la misma pueden estimular el crecimiento y la reparación de heridas por células epiteliales estomacales e intestinales (así como renales) estas moléculas gastroquina son candidatas para agentes terapéuticos para acelerar la recuperación del tracto GI lesionado después de intervenciones farmacológicas, radioterapia, o cirugía. Además, los anticuerpos desarrollados contra gastroquinas pueden usarse en kits para medir los niveles de proteína o péptido AMP-18 en tejido sanguíneo en diversos estados patológicos. Estas nuevas moléculas tienen gran potencial terapéutico en el tratamiento de úlceras gástricas, y la enfermedad inflamatoria del intestino, mientras que nuevos agentes que inhiben su función podrían mostrarse útiles en el tratamiento de cánceres del tracto GI.

El estómago no es una localización favorable para muchas bacterias, y aquellas que pueden sobrevivir a la acidez no se establecen por sí mismas allí (Rotimi y col., 1990). Es de interés, por lo tanto, que la región del antro es el sitio favorecido para la unión, penetración y efectos citolíticos de *Helicobacter pylori*, un agente que infecta una proporción mayoritaria de la población humana (>60% en el intervalo de setenta a ochenta años) y se ha asociado con gastritis, úlceras gástricas y duodenales (Goodwin y col., 1986; Blaser, 1987) y adenocarcinomas gástricos (Nomura y col., 1991; Parsonnet y col., 1991). Por tanto, como factor de crecimiento de células epiteliales, AMP-18 puede actuar mejorando el daño causado por infiltración citolisis bacteriana. Dada la conjunción de la expresión específica en el antro de AMP-18 y el sitio preferido de unión de *H. pylori*, es posible que las bacterias usen AMP-18 como factor trópico. *H. pylori* se une a células del antro que tienen gránulos de mucina que contienen mucosa (Falk y col., 1993; Baczako y col., 1995). Estos gránulos pueden contener AMP-18. Se han encontrado péptidos anti-microbianos en el estómago del anfibio *Xenopus laevis* (Moore y col., 1991). Algunos dominios de la estructura de AMP-18 se parecen a los de las magaininas, y posiblemente AMP-18 interacciona con bacterias entéricas.

#### 6. Aislamiento de AMP-18 de Cerdo

Se usaron antisueros contra la proteína AMP-18 humana para ayudar a la purificación de la proteína de extractos de mucosa del antro de cerdo. Los procedimientos de inmunofijación aplicados a extractos tisulares totales no se han mostrado muy eficaces, pero usando inmunotransferencias para controlar el fraccionamiento celular, centrifugación en gradiente y electroforesis en gel se purificaron cantidades suficientes del polipéptido de 18 kDa de cerdo para confirmar por secuenciación que el extremo N-terminal nativo es el predicho por escisión de 20 aminoácidos desde el extremo N-terminal de la ORF precisamente en el sitio de alanina-aspartato anticipado para la retirada del péptido señal. A pesar de la abundancia de restos de asparagina en la proteína madura, ninguno se ajusta a la característica de glicosilación del contexto consenso. Regiones bastante extensas de la proteína pueden tener propensión a formar hélices anfipáticas. Las últimas pueden representar unidades dentro de la proteína que producen péptidos bioactivos después del procesamiento. Usando dicroísmo circular se induce fácilmente el péptido sintético que representa los aminoácidos 126-143 en la secuencia de preAMP humana (Fig. 3) para que se vuelva helicoide en concentraciones moderadas de condiciones de trifluoroetanol usadas para evaluar la propensión de hélices para algunos péptidos bioactivos, incluyendo péptidos anti-microbianos del tipo magainina (véase, por ejemplo, Park y col., 1997).

#### 7. Preparación de AMP-18 humana recombinante activa en *E. coli*

Se diseñó un ADNc que codifica AMP-18 humana en el que se remplazó una secuencia de péptido señal hidrófoba de 20 aminoácidos con un péptido de 12 aminoácidos N-terminal que incluía una extensión de 6 restos de histidina (Fig. 13, panel de la izquierda). Se predijo que la expresión de esta secuencia de ADNc modificada producirá un producto proteico de 177 aminoácidos ( $M_r$  19,653) que podría purificarse fácilmente usando resina de Ni-NTA para unirse a la marca His6. La secuencia de ADNc que carece de la región que codifica el péptido señal N-terminal (véase la Fig. 14) se amplificó por PCR usando oligonucleótidos que proporcionaba enlaces adecuados para insertar el producto en el sitio *Bam*H1 de una vector de expresión QE30 (QIAGEN); se confirmó la secuencia del vector recombinante. La AMP-18 humana recombinante (rh) modificada con la marca His6 se expresó posteriormente en células de *E. coli*. Para recolectarla, se lisaron las bacterias y alícuotas de las fracciones soluble e insoluble se sometieron a SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia usando el antisero de conejo específico contra el precursor rhAMP-18. Se detectó muy poco de la proteína expresada en la fracción soluble del lisado.

Se empleó urea (6 M) para liberar las proteínas de la fracción insoluble, solubilizar la rhAMP-18 que contiene la marca His6, y hacerla disponible para su unión a la resina cargada con  $Ni^{2+}$  de la que se eluyó posteriormente con un gradiente de imidazol (0 a 200 mM). La cantidad de rhAMP-18 eluida se midió usando el ensayo de BCA, y se confirmó la aparición de una única banda en el tamaño predicho de 19-20 kD por SDS-PAGE seguido de inmunotrans-

ferencia. Para determinar si la rhAMP-18 eluida se renaturalizaba para asumir una estructura que fuera mitogénica, se añadieron alícuotas del eluato (después de la eliminación de urea e imidazol por diálisis) a cultivos de células IEC-18 y se contó la cantidad de células 4 días después. La Fig. 13 (panel de la derecha) indica que la proteína recombinante estimula la proliferación celular al mismo grado máximo que lo hace el péptido 77-97 de AMP mitogénico (o extractos 5 tisulares del antro solubles de cerdo mostrados en la Fig. 11), pero que lo hace a la concentración la mitad de la máxima un orden de magnitud inferior que para el péptido 77-97. El péptido 77-97 de AMP se refiere a la proteína madura; igual que el péptido 97-117 de la proteína precursora humana: Tabla 1. Estas observaciones indican que está disponible 10 la AMP-18 humana recombinante biológicamente activa que puede utilizarse en diversas situaciones clínicas. La potencia mitogénica de rhAMP-18 está en el intervalo nanomolar que se esperaría para un factor de crecimiento de células gástricas nativo que participe en el mantenimiento y reparación del estómago *in vivo*.

#### 8. *Estimulación del crecimiento y restitución de células epiteliales estomacales e intestinales por AMP-18 y péptidos derivados*

15 Para caracterizar la capacidad de células gástricas e intestinales de responder a AMP-18, se estudiaron células de adenocarcinoma gástrico AGS, cultivos primarios de la mucosa del antro gástrico humano HAE transformados con el antígeno T grande de SV40, células epiteliales del intestino delgado diploides de rata de las líneas IEC-6 (Fig. 15) y IEC-18, células de carcinoma gástrico NCI N-87, y células de adenocarcinoma gastroesofágico SK-GT5; fibroblastos 20 WI-38 humanos y células HeLa sirvieron como líneas celulares de control no GI. La mitogénesis se ensayó realizando recuentos celulares 3 a 4 días después de exponer las células al agente de interés, tratando con tripsina el cultivo para preparar células sencillas, y confirmando esto mientras se cuentan en un hemocitómetro.

25 Los extractos del antro que contienen AMP-18, péptido 77-97, o EGF estimulaban cada uno el crecimiento de células AGS, y como se esperaba, el antisero de conejo contra la proteína precursora de AMP-18 humana recombinante inhibía la actividad del extracto del antro pero no del péptido 77-97 que carece del epítope (Fig. 11). La estimulación del crecimiento por el péptido 77-97 era aditiva con la de EGF. El crecimiento de células AGS no se estimula por el péptido 77-97 mezclado o por el péptido 67-85, y el péptido 67-85 inhibe completamente la estimulación del crecimiento por el péptido 58-99. Se usaron células HAE para ensayar si AMP-18 puede ejercer un efecto sobre células epiteliales que existen en el entorno local de su síntesis. Estas células, proporcionadas por el Dr. Duane Smoot, Howard University College of Medicine, no están completamente inmortalizadas y por lo tanto tienen un número de pases limitado. La estimulación del crecimiento de células HAE por el péptido 77-97 era aparentemente aditivo con la de EGF (Fig. 16, panel de la izquierda). El péptido AMP no solamente estimula el crecimiento sino que también actuaba como un mitógeno, provocando una migración más rápida (restitución) de células en heridas por raspado hechas en cultivos confluyentes. Esta potenciación de la restitución de heridas también mostró elevada aditividad con EGF (Fig. 16 panel de la derecha). Si hay sinergia o no, la aditividad observada apoya que AMP-18 puede desempeñar una tarea importante en el mantenimiento de un epitelio mucoso estomacal intacto, y en la facilitación de su reparación después de una lesión. El crecimiento de células IEC-6 diploides de rata también se estimuló por extracto 30 del antro, péptido 77-97, y EGF, aunque el péptido parecía un mitógeno más potente que EGF (Fig. 15). Se detectó una estimulación del crecimiento casi máxima a una concentración de péptido AMP de 0,5 µg/ml (0,23 µM) (Fig. 15, panel central), un valor mucho más bajo que la concentración necesaria para péptidos trébol (1 µg/ml) (~150 µM) o la α-defensina, criptidina 3 (660 µm/ml) (~140 µM) para ejercer sus efectos en cultivo. El efecto mitogénico máximo de rhAMP-18 sobre células IEC-18 se ha observado a 5 nanomolar (Fig. 18). El efecto mitogénico del péptido 40 77-97 se corroboró midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en el ADN de células IEC-6 que se estimuló en un 68% ( $P<0,001$ ) de  $16.668 \pm 616$  a  $28.036 \pm 882$  por el péptido. La estimulación de heridas fue comparable a EGF, y aparentemente aditiva con ella. El péptido 77-97 mezclado NO estimulaba el crecimiento de células IEC-18 o células 45 BSC-1 a concentraciones de hasta 8 µg/ml. El crecimiento de células NCI N-87 gástricas y células SK-GT5 gástricas también se estimuló por el péptido 77-97, el extracto del antro, o EGF de una manera dependiente de la concentración. Antisuero contra AMP-18 bloqueaba el efecto mitogénico del extracto del antro, o EGF de una manera dependiente de la concentración. Antisuero contra AMP-18 bloqueaba el efecto mitogénico del extracto del antro sobre estas dos 50 líneas de células epiteliales gástricas, pero no los efectos proliferativos del péptido 77-97 o EGF. Suero preinmune no tuvo efecto sobre el crecimiento. Estos resultados sugieren que AMP-18 y sus derivados peptídicos podrían funcionar *in vivo* estimulando el crecimiento y la restitución durante la reparación después de una lesión. El crecimiento de células fibroblásticas (WI-38) o epidermoides (HeLa) humanas a concentraciones de hasta 5 µg/ml, lo que sugiere que su efecto mitogénico es relativamente específico de células epiteliales. El péptido 77-97 de AMP no estimula el crecimiento.

#### 9. *Inhibición competitiva del crecimiento de células IEC-18 por péptidos derivados de AMP*

60 Para obtener información adicional acerca de la interacción entre péptidos AMP y su(s) sitio(s) de unión sobre la superficie celular, se estudiaron células IEC-18 de rata no transformadas. Aumentando progresivamente la concentración del péptido 67-85 no mitogénico se bloquea la estimulación del crecimiento por el péptido 58-99 si este oligómero de 42 unidades mitogénico ejerce su efecto por un mecanismo mediado por receptor. El péptido 58-99 estimulaba un aumento en la cantidad de células del 407% en comparación con el 290% por el vehículo en un ensayo de 3 días. Según 65 se elevaba la concentración de péptido 67-85 progresivamente hasta ~0,1 µg/ml, casi se suprimía el efecto estimulador del crecimiento del péptido 58-99 (Fig. 17). Este resultado sugiere que los dos péptidos compiten por el mismo sitio de "receptor" superficial.

# ES 2 332 882 T3

## 10. Antisuero contra AMP-18 neutraliza el efecto mitogénico de rhAMP-18

Estudios en curso revelan que antisuero de conejo contra el precursor de AMP-18 reconoce rhAMP-18 en inmunotransferencias. El antisuero también bloquea el efecto mitogénico de extractos de tejido antral porcino (Fig. 11) y el péptido 58-99 de AMP, e inmunolocaliza AMP-18 en células de tejido antral gástrico humano y murino. La Fig. 18 muestra que el antisuero neutraliza el efecto mitogénico de rhAMP-18 en cultivos confluentes de células IEC-18, extendiendo de este modo su utilidad para estudiar la proteína recombinante así como la nativa.

Usando células epiteliales GI, los resultados sugieren que el efecto citoprotector de rhAMP-18 puede estar mediado por su capacidad de facilitar la acumulación de proteínas de uniones fuertes (TJ), y que es un potente mitógeno. Los resultados también insinúan que el péptido 77-97 de AMP es un sustituto apropiado para rhAMP-18, aunque el péptido requiere una concentración relativamente más elevada para ejercer sus efectos fisiológicos (Fig. 13).

Para mejorar la producción de rhAMP-18, se usa un cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA, se añade lisozima para digerir los desechos celulares de *E. coli*, y se eluye la proteína recombinante de las perlas de Ni<sup>2+</sup> con imidazol 1 M.

## 11. Péptido AMP estimula la restitución de células epiteliales gástricas e intestinales después de una herida por raspado

Los datos presentados en la Fig. 19 se obtuvieron después de 24 a 48 h de exposición a péptido AMP, tiempos anteriores puede detectarse un efecto mitogénico por un aumento en la cantidad de células. Los resultados indican que el péptido AMP estimula la restitución en células derivadas de adenocarcinoma gástrico humano heridas por raspado de la línea HAE, y en células intestinales de rata no transformadas de la línea IEC-18. Por tanto, el péptido AMP estimula rápidamente la restitución de células epiteliales gástricas e intestinales en cultivo, y supuestamente podría acelerar el recubrimiento de la mucosa gástrica lesionada *in vivo*.

## 12. Péptido AMP induce la actividad tirosina quinasa lo que sugiere que sus efectos funcionales están mediados por un receptor de superficie celular

Para obtener evidencias de que los efectos fisiológicos de AMP-18 son específicos y están mediados por receptor, se ensayó el péptido AMP para ver si induce la fosforilación de tirosina en células epiteliales GI.

Se trataron células IEC-18 con péptido 77-97 de AMP a una concentración que previamente había mostrado estar en exceso de la requerida para una estimulación máxima del crecimiento durante diferentes períodos de tiempo de hasta 60 min. Las células después se lisaron, se extrajo la proteína y se separó en geles de SDS-poliacrilamida, se transfirió, y se sondó la transferencia con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10. La transferencia mostró que la exposición de células a péptido AMP (8 µg/ml) provoca la fosforilación de tirosina de varias proteínas después de dos minutos, incluyendo las que tienen masas moleculares de 42 y 55 kDa, lo que sugiere una tarea para ERK1 y ERK2 activados en la señalización de AMP-18. Hubo una disminución en el grado de fosforilación de tirosina de varias de las proteínas después de 5 min., y persistencia de otras durante hasta 60 min.

El péptido AMP y supuestamente AMP-18 pueden señalizar sus efectos mitogénicos, motogénicos, y citoprotectores mediante un receptor de superficie celular, y posiblemente estimulan la fosforilación de tirosina de proteínas celulares específicas.

## 13. El péptido 77-97 de AMP potencia el desarrollo de la función de barrera de células epiteliales y es citoprotector

El mantenimiento de la función de barrera es esencial para prevenir la entrada de antígenos extraños y bacterias desde la luz gástrica, y para otras funciones tales como el transporte vectorial de electrolitos, agua y nutrientes. Actuando en solitario o junto con otros agentes, AMP-18 puede mediar el rápido retorno de la función de barrera después de una lesión de la mucosa. Para determinar si el péptido 77-97 de AMP podría facilitar el desarrollo de la función de barrera, y pudiera servir también como agente citoprotector para prevenir la pérdida de función cuando metabolitos de oxígeno reactivo, indometacina, o sulfato sódico de dextrano (DSS), aumentan la permeabilidad de la mucosa y comprometen la integridad celular necesitaba mantener las uniones fuertes epiteliales. Se usaron líneas celulares que se sabe que desarrollan valores relativamente elevados para la RTE como marcador de uniones fuertes epiteliales. Inicialmente, el péptido 77-97 modula la maduración de la RTE en cultivos en monocapa de células MDCK no transformadas bien caracterizadas. La Fig. 20 muestra que la exposición al péptido aumenta la RTE en la monocapa en 24 h, y a un grado mayor después de ello. Esta observación sugiere que AMP-18 o el péptido AMP podría acelerar la recuperación del epitelio GI después de una lesión, y potenciar el desarrollo de la función de barrera.

Para determinar si el péptido AMP protege la función de barrera en un modelo de cultivo tisular de lesión oxidante de la mucosa, monocapas celulares se sometieron a lesión por metabolitos de oxígeno reactivo usando monoclaramina. Los resultados de la Fig. 21 (panel A) indican que después de 60 min. de exposición a monoclaramina, las células MDCK tratadas con vehículo o EGF muestran una pérdida sustancial de la RTE, mientras que la RTE de cultivos tratados con péptido 77-97 es similar a monocapas no lesionadas. Estos resultados son de interés considerable porque sugieren que el péptido AMP pero no EGF es citoprotector bajo esta serie de condiciones, mientras que se había descubierto previamente que estas dos moléculas eran equivalentes y mitógenos aditivos para células

## ES 2 332 882 T3

epiteliales gástricas e intestinales. El efecto citoprotector del péptido 77-97 también era evidente en células Caco2/bbe (C2) derivadas de una línea de adenocarcinoma colónico humano en el entorno de lesión oxidante (Fig. 22, panel B) o mediada por indometacina (panel C).

### 5 14. Efecto citoprotector del péptido AMP después de lesión por DSS

Para evaluar la capacidad potencial del péptido AMP para ejercer un efecto citoprotector en colitis *in vivo*, se añadió una solución de sulfato sódico de dextrano (DSS) al medio de cultivo de monocapas de células C2 usadas como modelo de epitelio colónico. La lesión mediada por DSS de la función de barrera se cuantificó midiendo la RTE 10 en estos cultivos en monocapa. La Fig. 22 indica que el DSS (4%) reducía la RTE hasta ~30% del valor de control después de 45 min., y que el péptido AMP era citoprotector. Esta observación proporciona un fuerte fundamento fisiológico para evaluar el péptido AMP como agente terapéutico en el modelo murino de colitis mediada por DSS.

15 Para determinar si el péptido AMP podría acelerar la recuperación de la RTE después de una lesión de las células colónicas inducida por DSS, una característica funcional muy codiciada de un agente diseñado para tratar la IBD, se expusieron monocapas de células C2 a DSS (5%) durante 10 min. lo que redujo la RTE hasta el  $33 \pm 6\%$  del valor de control. Se retiró el DSS aspirando el medio y remplazándolo con medio fresco. Se añadió péptido 77-97 de AMP (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o vehículo al medio de cultivo, y se midió la RTE 18 h después. En presencia del vehículo, la RTE aumentó del 33% al  $66 \pm 7\%$  del valor de control, mientras que las células expuestas al péptido AMP alcanzaron un valor del 20  $112 \pm 4\%$  del control. Los resultados saludables en un modelo de cultivo tisular de colitis mediada por DSS sugieren que el péptido AMP puede acelerar la recuperación de la función de barrera en el epitelio colónico lesionado *in vivo*.

### 25 15. El efecto citoprotector del péptido AMP en células epiteliales colónicas puede estar mediado por acumulación aumentada de proteínas de uniones fuertes

La Fig. 21B muestra que el péptido 77-97 de AMP atenúa la caída en la resistencia transepitelial eléctrica (RTE) en 30 células Caco2/bbe (C2) después de lesión oxidante. Para descubrir cómo el péptido ejerce su efecto citoprotector, monocapas celulares C2 se trataron con péptido AMP, y se indujo una lesión oxidante con monocloramina 18 horas después. Se comprobaron los cambios en los niveles de proteínas de uniones fuertes (TJ) específicas. Las células se lisaron, 35 y se estudiaron las proteínas de la fracción insoluble/particulada por inmunotransferencia. La Fig. 23 muestra que hay más ZO-1 y ocludina inmunorreactivas en células tratadas con péptido AMP que en células tratadas con vehículo a tiempo 0, y durante 60 minutos después de la lesión inducida por oxidante, lo que sugiere que la mayor abundancia de estas proteínas TJ atenúa de este modo la pérdida de la RTE en la monocapa y conserva su función de barrera. Estas 40 observaciones insinúan que el péptido AMP potenciaba la acumulación de proteínas TJ durante las 18 horas antes de que las células se sometieran a lesión oxidante. Se estudiaron células no lesionadas y mostraron que el péptido AMP (o rhAMP-18) aumentaba rápidamente la cantidad de ZO-1 y ocludina inmunorreactiva en comparación con células no tratadas (Fig. 24). Estos cambios parecen relativamente específicos para ZO-1 y ocludina ya que no se observaron para otras proteínas TJ diversas (ZO-2, claudina-1, claudina-2, claudina-5), o la proteína de choque por calor (HSC) 73.

### 45 16. Efecto citoprotector de rhAMP-18

Se preparó una cantidad suficiente de rhAMP-18 purificada para ensayar si rhAMP-18 era citoprotectora en comparación con el péptido 77-87 de AMP que atenuaba la caída en la resistencia transepitelial eléctrica (RTE) en células Caco2/bbe (C2) después de lesión oxidante mediada por monocloramina (Fig. 21B). La Fig. 25 muestra que la exposición a monocloramina reduce la RTE en ~35% a 45 min., mientras que células pre-tratadas con rhAMP-18 o péptido 50 77-97 mostraban una disminución solamente de ~10% en la RTE. La Fig. 26 indica que el tratamiento de células C2 con rhAMP-18 durante 8 h aumenta la cantidad de ZO-1 y ocludina inmunorreactivas en comparación con células tratadas con vehículo. Estos resultados sugieren que AMP-18 podría mediar su efecto citoprotector potenciado la acumulación de proteínas TJ específicas y de este modo conservar la función de barrera a lo largo del tracto GI después de una lesión de la mucosa.

### 55 17. La administración de péptido AMP retarda la aparición de sangre en las deposiciones y reduce la pérdida de peso en ratones con colitis inducida por DSS

Para evaluar la eficacia terapéutica del péptido AMP, se indujo colitis por DSS en ratones macho C57/BL6 dando a los animales (de 12-15 g cada uno) DSS al 3% ( $M_r$  36-44 kDa) en el agua berible. Se hallaron evidencias de colitis (sangre en las deposiciones) tan pronto como el día 1 (Fig. 27, panel de la izquierda), y en todos los animales en el día 4. El péptido AMP, administrado diariamente por inyección subcutánea (s.c.), retardaba la aparición de deposiciones positivas a hemocultivo, y también reducía el grado de pérdida de peso (Fig. 27, panel de la derecha). Estos hallazgos 60 positivos apoyan al péptido AMP como un agente terapéutico útil en colitis y otras enfermedades que lesionan la superficie mucosa del tracto GI.

La síntesis de AMP-18 está confinada a las células epiteliales del revestimiento de la mucosa luminal del antro gástrico de seres humanos y otros mamíferos. Dentro de las células la proteína se co-localiza con las mucinas en 65 gránulos de secreción, y parece secretarse en el moco superpuesto en la membrana plasmática apical. La AMP-18 humana recombinante preparada en *E. coli* ejerce su efecto mitogénico a una concentración un orden de magnitud inferior que péptidos promotores del crecimiento derivados del centro de la proteína madura. El péptido 77-97, el péptido mitogénico más potente, es específico de secuencia de aminoácidos, y parece ser específico del tipo celular

ya que no estimula el crecimiento de fibroblastos o células HeLa. La mitogénesis por péptidos AMP específicos parece estar mediada por un receptor de superficie celular porque ciertos péptidos que no son mitógenos activos pueden inhibir de forma competitiva, de una manera dependiente de la concentración, los efectos estimuladores del crecimiento del péptido 58-99 y extractos celulares del antro. La AMP-18 y sus péptidos derivados muestran diversos

5 efectos sobre células epiteliales estomacales e intestinales lo que sugiere que podrían desempeñar una tarea crítica en la reparación después de una lesión de la mucosa gástrica. Estos incluyen citoprotección, mitogénesis, restitución, y maduración de la función de barrera después de una lesión mediada por oxidante, DSS, y/o indometacina. Los posibles mecanismos por los que AMP-18 o sus derivados peptídicos median sus efectos pleiotrópicos incluyen la estimulación 10 de la actividad tirosina quinasa de proteínas, la prolongación de la expresión de la proteína de choque por calor después de estrés celular, y/o la acumulación potenciada de las proteínas asociadas a uniones fuertes ZO-1 y ocludina. Ciertos 15 de estos efectos fisiológicos pueden suceder a concentraciones que son relativamente bajas para rhAMP-18 (<50 nM) en comparación con las concentraciones de otros mediadores peptídicos gástricos tales como péptidos trébol o la  $\alpha$ -defensina, criptidina 3 (>100  $\mu$ M). La AMP-18 inmunorreactiva se libera aparentemente por células del antro de ratón después de alimentación forzada con indometacina, y por células del antro canino en cultivo primario expuesto a 20 forskolina, lo que sugiere que la proteína está sometida a regulación. La AMP-18 probablemente desempeña una tarea en procesos fisiológicos y patológicos tales como la curación de heridas en el epitelio de la mucosa gástrica *in vivo*. La capacidad del péptido AMP de retardar la aparición de deposiciones sanguinolentas en el modelo de ratón de colitis por DSS, y de reducir el grado de pérdida de peso sugiere eficacia terapéutica en diversas enfermedades que lesionan la mucosa del tracto GI (enfermedad inflamatoria del intestino, úlcera gástrica, y similares).

## 20 Materiales y procedimientos

### 1. Aislamiento de Clones de ADNc Específicos del Antro

25 Se aislaron clones de ADNc para el péptido gastrointestinal (GI) gastrina, que regula la secreción de ácido gástrico así como el crecimiento de células mucosas y pancreáticas (Yoo y col., 1982). A partir de estas exploraciones se encontraron otros ARNm diversos expresados de forma relativamente específica en el antro del estómago. La fase de lectura abierta (ORF) en uno de estos ARN estaba altamente conservada entre el cerdo y el hombre, y predecía una 30 nueva proteína conservada de función no inmediatamente evidente. Usando anticuerpos específicos, se demostró que están presentes especies proteicas similares en la mucosa del antro del estómago de todos los mamíferos ensayados. Existe especificidad tisular de la expresión de estas secuencias y están aparentemente presentes de forma ubicua en la 35 mucosa del antro de especies de mamíferos.

### 2. Expresión de ARN

40 El aislamiento de los clones de ADNc se predijo en una expresión preferencial en la mucosa del antro del estómago y esto se ha confirmado inicialmente por hibridación de transferencia Northern de ARN de diversos tejidos sondeados con las secuencias de ADNc y posteriormente por análisis de proteínas. Las transferencias de Northern mostraron la especificidad de la expresión del ARNm dentro del tracto gastrointestinal del cerdo. La expresión más elevada de ARNm estaba en la mucosa del antro, cantidades variables en la mucosa del cuerpo adyacente y niveles indetectables en el fondo, esófago y duodeno. El tejido no mucoso del antro y el cuerpo contenían poco ARN que reaccionaba con la sonda de ADNc.

### 45 3. Anticuerpos contra la Proteína Expresada

45 La fase de lectura abierta (ORF) de los clones de ADNc humanos y de cerdo predicen proteínas de peso molecular (PM) relativamente bajo muy similar, que no tienen homólogos cercanos a proteínas conocidas en las bases de datos informatizadas y por lo tanto dan poca indicación de la posible función. Como procedimiento para estudiar el 50 papel biológico de las presuntivas proteínas, se expresaron las secuencias de ADNc completas en *E. coli*, usando un vector que también codificaba una marca His6 N-terminal. Desafortunadamente, expresados en bacterias los productos polipeptídicos son insolubles y no son fácilmente susceptibles a estudios bioquímicos. Sin embargo, el producto bacteriano del ADNc humano se separó en geles de dodecil sulfato sódico (SDS) usado como inmunógeno en conejos para producir antisueros. Los sueros se exploraron contra extractos proteicos de tejido antral de varias especies de mamíferos. Este procedimiento ha producido exitosamente varios antisueros de bajo fondo, de elevado título capaces 55 de reconocer tanto el inmunógeno como proteínas de aproximadamente 18 kDa expresadas en el antro de los mamíferos ensayados. La proteína expresada en bacterias migra más lentamente porque contiene la secuencia del péptido señal así como una marca His6. Los sueros preinmunes no mostraron reactividad significativa a 18 kDa. La reactividad cruzada de los antisueros creados contra la proteína expresada a partir del clon de ADNc humano con proteínas de PM muy similar en extractos de antro de una diversidad de mamíferos (cerdo, cabra, oveja, rata y ratón; la última migra consecuentemente ligeramente más rápidamente en geles de SDS) apoya el nivel de conservación de la secuencia de aminoácidos predicha por comparación de las ORF de los ADNc humano y de cerdo (véase la Fig. 10). En posteriores experimentos, se produjo AMP-18 humana con un péptido señal en bacterias.

60 Los sueros preinmunes dan reacciones insignificativas en transferencias de Western de todos los extractos tisulares, mientras que los dos sueros inmunes (a dilución hasta 1:50000) dan ambos bandas mayoritarias de 18-20 kDa solamente, y solamente en extractos del antro del estómago, y a un grado menor en los extractos del cuerpo adyacente. Los sueros se crearon contra proteína expresada en bacterias de modo que no hay posibilidad de otros inmunógenos exógenos de origen animal.

# ES 2 332 882 T3

Como se determina por inmunotransferencias, la especificidad de expresión al antro es incluso mayor que la que sugerirían las transferencias de Northern, y la fuerza de la señal de los extractos del antro implica una abundancia relativamente elevada de la proteína, aunque no se hicieron estimaciones cuantitativas. No se detectó antígeno significativo en tejidos no estomacales ensayados.

- 5 La inmunohistoquímica mostró tinción insignificativa de tejido antral por ambos sueros preinmunes, mientras que ambos sueros inmunes tiñeron las células de la mucosa superficial muy fuertemente a diluciones considerables. Los sueros preinmunes no condujeron a inmunotinción con oro en el estudio de microscopía inmunoelectrónica. La actividad de factor de crecimiento de extractos del antro se inhibe por ambos sueros inmunes, pero no por ambos  
10 sueros preinmunes. Finalmente, los resultados con un péptido sintético, que tiene actividad de factor de crecimiento, se inhibe por los sueros inmunes pero no los preinmunes, y porta epítopes reconocidos por los sueros inmunes pero no los preinmunes, confirman adicionalmente la especificidad de estos reactivos.

## 4. Hibridación por Transferencia de Northern de ARN de Tejidos de la Mucosa Intestinal de Cerdo

- 15 Se sometió a electroforesis el ARN total, se transfirió a una membrana y se hibridó con una sonda de ADNc de AMP-18 de cerdo marcada. La fuente de la muestra de ARN para cada carril era: 1. Duodeno distal; 2. Duodeno proximal; 3. Antro; 4. Cuerpo adyacente; 5. Fondo; 6. Esófago. Se cargaron cantidades iguales de ARN. La señal del ARN del cuerpo adyacente del antro era variable. Los marcadores de tamaño (nucleótidos) se procesaron en el mismo  
20 gel para comparación.

## 5. Inmunotransferencias Usando Un Antisuero de Conejo Creado Contra la Proteína Expresada en Bacterias Dirigido Por el Clon de ADNc Específico de Antro Humano

- 25 Se disolvieron las proteínas tisulares completas en tampón SDS, se sometieron a electroforesis, y se transfirieron a membranas que se hicieron reaccionar con suero inmune (1:50000). Se detectaron moléculas de anticuerpo unidas usando anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa. El suero preinmune no daba tinción específica de transferencias paralelas a dilución 1:200. Carriles: 1, 6, 13, 17 contenían marcadores. 2 Células HeLa. 3 Células TLT de ratón. 4 Proteína humana expresada + células HELA. 7 Cuerpo de ratón. 8 Antro de ratón. 9 Duodeno de ratón. 10 Intestino  
30 de ratón. 11 Hígado de ratón. 12 Proteína humana expresada + células TLT. 14 Antro de ratón. 15 Cerebro de ratón. 16 Riñón de ratón. 18 Antro de cerdo. 19 Antro de ratón.

- 35 Las inmunotransferencias de geles de acrilamida de elevado porcentaje mostraron que los antisueros reconocían epítopes en el péptido sintético 78-119. La reacción del péptido 78-119 con los anticuerpos no era inesperada porque se predijo que esta región de la secuencia se exponía sobre la superficie de la proteína y era antigenica. Esto no solamente confirma adicionalmente la creencia de que AMP-18 o su precursor inmediato, es un factor de crecimiento, para células epiteliales, sino que también proporciona una base para el análisis de las regiones bioactivas (y antigenicas) de AMP-18, y una herramienta para la evaluación de la cantidad e identidad de receptores celulares. La síntesis química de péptidos también hace que esté disponible una fuente práctica y rápida de cantidades considerables de reactivos puros  
40 "de tipo silvestre" y "mutantes" para estudios celulares adicionales. El péptido sintético 78-119 aparentemente actúa por el mismo mecanismo que la proteína del antro, porque sus efectos máximos no son aditivos.

## 6. Secuencia y Estructura Predicha de la Fase de Lectura Abierta de Pre-AMP

- 45 Las secuencias de aminoácidos predichas para ser humano y cerdo son idénticas al 76%. Los péptidos señal predichos no están señalados; el extremo N-terminal de AMP de cerdo nativa ha demostrado ser aspartato (Fig. 10).

## 7. Estructura de la Proteína Nativa

- 50 Las ORF de los ADNc de ser humano y cerdo predecían polipéptidos de estructura general similar (Fig. 10). Los pesos moleculares predichos para las proteínas humana y de cerdo por lo demás sin modificar eran 18,3 y 18,0 respectivamente; estos valores están de acuerdo con la movilidad electroforética en SDS de las proteínas del antro que reaccionan con los antisueros de la presente invención.

- 55 Los antisueros se usaron para ayudar en la purificación de la proteína de los extractos de la mucosa del antro de cerdo. Los procedimientos de inmunoafinidad aplicados a extractos tisulares totales no se han mostrado muy eficaces, pero usando inmunotransferencias para controlar el fraccionamiento celular, centrifugación en gradiente y electroforesis en gel se purificaron cantidades suficientes del polipéptido de 18 kDa de cerdo para confirmar por secuenciación que el extremo N-terminal nativo es uno predicho por escisión de aproximadamente 20 aminoácidos desde el extremo  
60 N-terminal de la ORF precisamente en el sitio de alanina-aspartato anticipado para la eliminación del péptido señal. A pesar de la abundancia de restos de asparagina, ninguno encaja en el contexto consenso para la glicosilación. Regiones bastante extensas pueden tener tendencia a formar hélices anfipáticas. Esto último puede representar unidades dentro de la proteína o como péptidos después del procesamiento. Usando dicroísmo circular se induce fácilmente que el péptido sintético que representa los aminoácidos 126-143 en la secuencia de preAMP human (Fig. 3) llegue a ser helicoide en concentraciones moderadas de condiciones de trifluoroetanol usadas para evaluar la tendencia helicoide para algunos péptidos bioactivos, incluyendo péptidos anti-microbianos del tipo magainina (véase, por ejemplo, Park y col., 1997).

#### 8. Localización de AMP-18

Los antisueros contra AMP-18 han demostrado ser excelentes sondas histoquímicas, que reaccionan fuertemente con secciones de la región del antro de ratón pero no con el fondo, el duodeno o el intestino, confirmando los resultados de las inmunotransferencias.

- 5 Los sueros preinmune dan reacciones insignificantes incluso a una concentración mucho mayor. La proteína AMP-18 parece concentrarse en células epiteliales de la mucosa que revisten la luz del estómago, aunque señales menores en células más profundas en el tejido y a lo largo de las regiones de cripta superior sugieren que las células pueden comenzar a expresar la proteína según migran hacia la capa luminal. Un aumento mayor de las preparaciones histoquímicas indica solamente una tinción citoplasmática general a este nivel de resolución;
- 10 hay algunos parches de tinción intensa que pueden ser el equivalente al microscopio óptico de regiones de gránulos empaquetados de algunas células de la superficie luminal observadas al microscopio electrónico (ME). La localización de AMP-18 en la mucosa de antro es por lo tanto muy diferente de aquellas células que sintetizan gastrina que están profundas en la capa mucosa.

15 9. Localización por inmunomicroscopía electrónica de los antígenos de AMP-18 en las células de la mucosa del antro estomacal

20 Los trozos de tejido se fijaron en formaldehído al 4% y se procesaron para impregnarlos en Unycril. Se hicieron reaccionar secciones delgadas con antisueros de conejo anti-AMP-18 humana (1:200); los anticuerpos unidos se detectaron por Proteína-A conjugada a oro coloidal de 10 nm. Las secciones que reaccionaron se tiñeron con clorato de plomo antes de visualizarlas (20.000x). Las partículas de oro son visibles sobre los gránulos de secreción semi-translúcidos, que parecen mucho más translúcidos aquí que en el procedimiento convencional de glutaraldehído-osmio-epón (11.400x) a causa de los requisitos para la inmunorreactividad. Se observó un fondo insignificante en otras estructuras

25 citoplasmáticas.

30 La estructura general de la proteína implica una posible tarea secretora de modo que sería valiosa una localización intracelular precisa. Esto requiere procedimientos de ME inmunocitoquímica. Procedimientos de impregnación y tinción convencionales revelan que, como se ha informado previamente por muchos otros, la región del antro (por ejemplo, Johnson y McMinn, 1970) contiene células epiteliales de la mucosa que son muy ricas en gránulos secretores. Los datos preliminares de inmuno-ME muestran que los sueros inmunes usados a dilución 1:200-1:800 reaccionan específicamente con los gránulos de secreción. Los últimos parecen algo hinchados y menos opacos a los electrones que en condiciones de fijación convencionales y las diferencias en la densidad son más difíciles de discernir, pero globalmente la estructura celular está bastante bien conservados para tejido estomacal fijado e impregnado en las condiciones menos rigurosas requeridas para conservar la inmunorreactividad. A dilución 1:100, los sueros preinmunes mostraban fondos insignificantes sin preferencia por los gránulos de secreción.

#### 10. Actividad de Factor de Crecimiento en Cultivos de Células Epiteliales

40 Una función de AMP-18 es que es un factor de crecimiento al menos parcialmente responsable del mantenimiento de un epitelio de la mucosa funcional en el antro pilórico y posiblemente en otras partes del estómago. Inicialmente, no estaban inmediatamente disponibles líneas de células epiteliales del estómago, pero se usaron sistemas de células epiteliales renales (Kartha y col., 1992; Aithal y col., 1994; Lieske y col., 1994). Se usó un extracto celular de la mucosa del antro fraccionado para estos experimentos. Usando inmunotransferencia como sonda para seguir el fraccionamiento, sobre la lisis de las células de la mucosa raspadas de antro de cerdo o ratón, se recuperó el antígeno AMP-18 en la fracción 35S en gradientes de densidad de sacarosa. Dichas fracciones sobrenadantes de alta velocidad sirvieron como material de partida para estudios sobre el crecimiento celular. Inesperadamente, estos extractos estimulaban un aumento del 50% en células epiteliales renales confluyentes de mono (células BSC-1), pero no tenían efecto sobre células HeLa o fibroblastos WI-38. La estimulación de células BSC-1 era al menos tan eficaz como la observada con diversos mitógenos polipeptídicos, incluyendo EGF, IGF-I, aFGF, bFGF y vasopresina, ensayados a sus concentraciones óptimas. Se observó una estimulación del crecimiento comparable por los extractos del antro cuando se evaluaba la síntesis de ADN midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en material insoluble en ácido. La actividad biológica de los extractos del antro sobrevivió al calor durante 5 minutos a 65°C, y a diálisis usando una membrana con punto de corte M<sub>r</sub> de 10 kDa, que eliminaría la mayoría de los oligopeptídos; este tratamiento elimina el 60-70% del material polipeptídico, pero deja la AMP-18 ensayada por inmunotransferencias. De forma más importante, la estimulación mitogénica de células BSC-1 por el extracto del antro de ratón o de cerdo se inhibía cuando se añadía cualquiera de los dos diferentes antisueros contra la preAMP-18 humana recombinante (expresada en bacterias) al medio de cultivo. Los sueros preinmunes (1:100 a 1:800) no tenían efecto sobre el crecimiento celular, ni alteraban el efecto mitogénico de los extractos del antro. Estas observaciones sugieren que la AMP-18 de células de la mucosa gástrica funciona como un potente mitógeno para células epiteliales renales, que no expresan normalmente esta proteína.

65 Para obtener evidencias adicionales de que la actividad promotora del crecimiento en los extractos del antro parcialmente fraccionados estaba mediada por la proteína AMP-18, una alícuota del extracto de ratón se sometió a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; el procedimiento usado previamente para determinar la secuencia N-terminal de la proteína natural. El gel se cortó en trozos de 2 mm y cada trozo se extrajo con acetonitrilo al 3% en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 1%. Los sobrenadantes del extracto se ensayaron para la actividad

# ES 2 332 882 T3

mitogénica. Los resultados indicaron que un trozo que contenía proteína en el intervalo de 16-19 kDa tenía actividad promotora del crecimiento. De forma significativa, esta respuesta de crecimiento se bloqueaba por los sueros inmunes pero no por los preinmunes. Tomados junto con la velocidad relativamente baja de la proteína, estos hallazgos proporcionan evidencias adicionales que apoyan la conclusión de que AMP-18 es un mitógeno de células epiteliales y que funciona como un monómero o posiblemente un dímero homotípico. También implica que la estructura de la proteína es tal que puede readquirir fácilmente una conformación nativa después de las condiciones desnaturalizantes de la electroforesis en gel de SDS.

Para evaluar la interacción de la actividad de factor de crecimiento del antro con otras citoquinas, se ensayó su actividad para determinar si era aditiva con EGF en cultivos de células epiteliales. El EGF (50 ng/ml) añadido con extracto de antro de ratón sin tratar (10 µg/ml), o extracto de cerdo dializado, calentado (10 µg/ml) mostraba estimulación aditiva de la mitogénesis; un aumento de hasta el 74% en la cantidad de células por encima del nivel quiescente; la mayor estimulación observada hasta ahora para cualquier factor usando el ensayo de células BSC-1. Un ejemplo de esta aditividad se muestra para un péptido AMP y EGF sobre células AGS en la Fig. 11. Esta observación sugiere que AMP-18 y EGF inician la proliferación actuando sobre diferentes receptores de superficie celular. También implica que la actividad de factor de crecimiento de AMP-18 puede colaborar normalmente con otros factores autocrinos y paracrinos en el mantenimiento o restitución del epitelio. En vista de los resultados con EGF, es probable que AMP-18 se secrete en y actúe sobre la cara apical (es decir, la cara luminal del estómago) de la capa de células epiteliales mientras que otros factores (para los que EGF puede servir como ejemplo) actúan desde la superficie basal.

20

## 11. Bioactividad de Péptidos Relacionados con Gastroquina (AMP-18)

Las actividades de péptidos sintéticos de la presente invención son inesperadas. Se sintetizaron péptidos basados en la ORF de péptidos de clones de ADNc humano en la University of Chicago Cancer Center Peptide Core Facility, que comprueba la secuencia y los espectros de masas de los productos. Los péptidos se purificaron adicionalmente por HPLC. Se analizaron cinco oligopéptidos relativamente grandes (de aproximadamente 40 aminoácidos cada uno) que abarcan aproximadamente la longitud de la proteína sin incluir el péptido señal. Un péptido de 42 aminoácidos de longitud que abarca los aminoácidos lys-78 a leu-119 de la secuencia de pre-AMP (péptido 58-99 de la forma madurada de la proteína; véase la Tabla 1), que incluye una hélice y un giro glicina-prolina (GP) predichos, dio buena actividad mitogénica. Esta respuesta se bloqueó por el antisero específico, pero no por los sueros preinmunes.

35

TABLA 1

Bioactividad de péptidos sintéticos basados en la secuencia de la pre-gastroquina (pre-AMP-18)

40	Nombre de la Secuencia Peptídica en Ser Humano	NºAA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	K <sub>1/2,µM</sub>
45	78-119	42 KKTCIVHKMKKEVMPSIQSLDALVKEKKLQGKGPGGPPPKGL	0,3
50	78-88	11 KKTCIVHKMKK	Inactivo
55	87-105	19 KKEVMPSIQSLDALVKEKK	Inactivo
60	104-117	14 KKLQGKGPGGPPPK	0,8
65	104-111	18 KKLQGKGPGGPPPGLMY	1,0
	97-117	21 LDALVKEKKLQGKGPGGPPPK	0,3
	97-117**	21 GKPLGQPGKVPKLDGKEPLAK	Inactivo
	97-121	25 LDALVKEKKLQGKGPGGPPPGLMY	0,2
	109-117	9 KGPGGPPPK	2,5
	104-109	6 KKLQGK	7,4

<b>Nombre de la Secuencia</b>	<b>NºAA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>K<sub>1/2</sub>,μM</b>
<b>Peptídica en Ser Humano</b>		
110-113	4	GPGG
ratón		Inactivo
97-119	23	LDTMVKEQK..GKGPGGAPPKDLMY
<b>**mezclado</b>		0,2

Tabla 1

*Análisis de péptidos mitogénicos derivados de la secuencia de pre-gastroquina humana y de ratón (pre-AMP-18)*

Un dominio mitogénico de 14 aminoácidos está en negrita. \*Los péptidos se identifican por su posición en la secuencia de aminoácidos de la pre-gastroquina (preAMP-18). NºAA; cantidad de aminoácidos en un péptido. K<sub>1/2</sub>; concentración para estimulación del crecimiento la mitad de la máxima.

Péptidos inactivos solapantes pueden inhibir la actividad de los péptidos mitogénicos: es decir, los péptidos 78-88 y 87-105 humanos bloquean la actividad del péptido 78-119, y aunque el péptido 87-105 bloquea la actividad del péptido 104-117, el péptido 78-88 no. Los péptidos 78-88 y 87-105 bloquean la actividad de la proteína en extractos estomacales.

12. *El Dominio Estimulador del Crecimiento de Gastroquina (AMP-18)*

El hallazgo de que un péptido de 42 aminoácidos que representa una región central de la nueva proteína celular de la mucosa del antro AMP-18 tenía actividad mitogénica similar en carácter a la de la proteína intacta en extractos de antro de cerdo y ratón (Tabla 1), ha facilitado la caracterización de la región bioactiva de la molécula. Un péptido que incluye los aminoácidos en las posiciones 78-119, dio estimulación máxima similar del crecimiento de la línea de células epiteliales BSC-1 a la dada por los extractos tisulares y se inhibía de forma similar por varios antisueros diferentes creados en conejos contra la proteína del antro completa expresada en bacterias. La actividad mitogénica de varios péptidos de “deleción” sintéticos relacionados con el péptido “78-119” se resume en la Tabla 1. Las determinaciones de actividad de crecimiento se han conseguido hasta ahora con la línea de células epiteliales renales así como varias líneas gástricas e intestinales.

La secuencia de 42 aminoácidos original del péptido 78-119 se rompió en tres segmentos unidos por restos de lisina (K); del extremo N-terminal al C-terminal estos son péptidos con aminoácidos en las posiciones 78-88, 87-105 y 104-117. De estos solamente el péptido 104-117 tenía actividad mitogénica que da una meseta similar de estimulación del crecimiento pero que requiere una concentración molar más elevada que el péptido “78-119” original; esto se refleja en el valor de K<sub>1/2</sub> mayor, que sugiere que el péptido de 14 aminoácidos tiene un 30-40% de la actividad del péptido de 42 aminoácidos. Una conclusión de esto es que el péptido más pequeño tiene menos afinidad de unión por el receptor celular, quizás debido a una capacidad reducida de formar la conformación correcta, o como alternativa debido a la pérdida de regiones de unión complementarias. La última idea está apoyada por las observaciones de que los péptidos “78-88” y “87-105” pueden antagonizar la actividad del péptido 78-119 de 42 unidades intacto; estos péptidos también antagonizan la actividad de extractos del antro lo que apoya adicionalmente la validez de péptidos sintéticos como un medio para analizar la función biológica de la nueva proteína. Un aspecto adicional de la invención es que el péptido 87-105, pero NO el 68-88, antagoniza la actividad del péptido 104-117; obsérvese que el péptido 87-105 solapa la secuencia 104-117 adyacente en dos restos.

Tomados en conjunto estos resultados sugieren un modelo lineal relativamente simple para la región estimuladora del crecimiento de AMP-18; a saber, hay un dominio de unión extendido N-terminal (que se ha predicho que es en gran parte helicoide, cuya rigidez relativa puede explicar la organización lineal de las secuencias relevantes determinadas en los estudios de crecimiento celular), seguido de una región rica en glicina y prolina sin estructura predicha más allá de la probabilidad de giros. Es esta última región la que contiene el desencadenante de la estimulación del crecimiento. La especificidad del antagonismo por los péptidos 78-88 y 87-105 puede basarse en si solapan o no los péptidos 78-119 y 104-117 agonistas; por ejemplo 78-88 solapa e inhibe 78-119, pero no solapa o inhibe 104-117. La especificidad de la competición por estos péptidos tomada con la inactividad del péptido 78-119 mezclado, refuerza la conclusión de que AMP-18 interacciona con componentes celulares específicos. Se proporcionan evidencias adicionales de que la región de unión al receptor se extiende de forma N-terminal desde el péptido 104-117 por la actividad potenciada del péptido 97-117 que contiene una extensión N-terminal de siete aminoácidos de 104-117. Parece que un péptido con una extensión de cuatro aminoácidos en la dirección C-terminal (péptido 104-121) tiene ligeramente menos actividad que el precursor 104-117, pero incluye una tirosina natural, que hace posible el marcaje con yodo radiactivo, que

permite la determinación de la unión de péptidos relacionados con AMP a las células, inicialmente por evaluación de la cantidad de sitios de unión y posteriormente la detección de la(s) proteína(s) receptora(s).

El péptido 97-107 se usó para la mayoría de los ensayos a causa de su actividad (igual a la del oligómero de 42 unidades) y su economía relativa (21 aminoácidos de longitud). Sin embargo, una extensión C-terminal a la tyr-121 da el active péptido más activo hasta ahora, quizá porque estabiliza la estructura secundaria. Aunque este péptido no corresponde a la actividad nanomolar de EGF, por ejemplo, es mucho más potente que la informada para péptidos trébol (Podolsky, 1997). Una estimación de la actividad de la proteína AMP intacta es aproximadamente 1-10 nM.

#### 10 13. Expresión de Proteína Recombinante

(a) *E. coli*. Generalmente las construcciones recombinantes se diseñan por reacciones en cadena de la polimerasa usando oligonucleótidos sintéticos complementarios a las regiones apropiadas de las secuencias de ADNc de longitud completa dentro del vector PT/CEBP y se prolongan por sitios de enzimas de restricción convenientes para posibilitar la fácil inserción en los poli-enlazadores convencionales del vector. Los experimentos iniciales con expresión de la ORF de AMP en sistemas bacterianos empleaban un vector de expresión PT/CEBP, que incluía una marca His6 N-terminal (Jeon y col., 1994), pretendida para facilitar la purificación de la proteína expresada en resina Ni-NTA (Qiagen). La expresión del ADNc humano de longitud completa dentro de este vector en el huésped BL21 (DE3)pLyS daba buenos rendimientos de proteína insoluble, que después de electroforesis en condiciones desnaturalizantes era adecuada para su uso como inmunógeno en conejos para obtener anticuerpos específicos de elevado título, pero que no ha sido útil para el análisis de la estructura nativa y función de la proteína. Esta insolubilidad se debe muy probablemente a la presencia de un extremo N-terminal no natural, que tiene una marca His6 cadena arriba del péptido señal hidrófobo, en la proteína expresada. También son útiles vectores de diseño que expresarán la ORF sin la secuencia del péptido señal hidrófobo. Estos se construyen usando vectores de expresión bacterianos con y sin marcas His N- o C-terminales. La secuencia de AMP-18 humana que carece del péptido señal de 20 aminoácidos y que contiene una marca His6 también se expresó en bacterias.

(b) *Pichia pastoris*. Entre los eucariotas simples, la prometedora levadura *P. pastoris* está obteniendo gran popularidad como sistema de expresión de elección para la producción y secreción de proteínas recombinantes funcionales (Romanos y col., 1992; Cregg y col., 1993). En este sistema, la secreción de la proteína foránea puede utilizar su propio péptido señal o la señal tipo *alfa* de acoplamiento de levadura altamente compatible. Este organismo procesará correctamente y secretará y al menos modificará parcialmente la proteína AMP-18. Se desarrollan vectores para la expresión constitutiva y regulada de genes foráneos en *Pichia* (Sears y col., 1998). Además de un sitio de clonación poli-enlazador, estos vectores contienen el promotor constitutivo de elevada expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) o la alcohol oxidasa regulada por metanol (AOX1). El último es un promotor extremadamente riguroso que produce producto insignificativo en condiciones de cultivo normales mientras que da la mayor expresión de los vectores ensayados en presencia de metanol, que representa como mucho el 30% de las proteínas celulares. La ventaja que la levadura *Pichia* tiene sobre las alternativas de mamífero e insecto es que se cultiva de forma continua en medios libres de proteína, simplificando de este modo la purificación de la proteína expresada y eliminando las bioactividades extrañas que se originan en el suero o las células huésped animales. Una construcción pIB4 (inducible por medio que contiene metanol) contiene la secuencia de ADNc de preAMP-18 humana completa.

(c) *Baculovirus/Células de insecto*. Un sistema de expresión eucariota no de mamífero, frecuentemente exitoso, alternativo es el que usa Baculovirus recombinantes, tales como *Autographa californica*, en un sistema de cultivo de células de insecto. Como con *Pichia*, está disponible un gran repertorio de vectores prácticos en este sistema, que contienen tanto glutatión S-transferasa (GST) como marcas His6 (Pharmingen). Se realizan transfecciones en células de *Spodoptera frugiperda* (*Sf*); estas células pueden adaptarse lentamente a medio libre de proteína para favorecer la purificación de proteínas secretadas. Si no funciona un péptido señal endógeno en estas células, la secreción de las proteínas foráneas también puede迫使se usando vectores que contienen la señal de secreción viral gp67 cadena arriba del sitio de clonación. Las proteínas recombinantes pueden expresarse a niveles que varían del 0,1-50% de proteína celular total. Algunas modificaciones proteicas pueden estar más favorecidas en este sistema de células de insecto con relación a las levaduras, pero aún no puede duplicar el sistema de mamífero. Parece que el sistema de expresión de insecto sería algo más laborioso que *Pichia*, y no sustituye completamente la expresión en células de mamífero. La secuencia de AMP-18 humana que carece del péptido señal de 20 aminoácidos y que contiene una marca His6 se expresó en Baculovirus.

(d) *Células de mamífero*. Pueden tener lugar modificaciones no detectables por análisis de inmunotransferencia en células de mamífero que no se duplican en células de otros eucariotas. Aunque no son tan prácticos como los sistemas de procariotas y eucariotas simples, las células de mamífero ahora se usan frecuentemente para expresión tanto transitoria como continua de proteínas foráneas. Se han expresado y secretado varios factores de crecimiento en cantidades significativas usando estos sistemas.

El sistema de plásmido pcDNA3/células renales humanas 293: pcDNA3 contiene un sitio de clonación poli-enlazador flanqueado por el promotor fuerte constitutivo de citomegalovirus (CMV) y una señal poliA de SV40 (Invitrogen). La experiencia de laboratorio es que pueden conseguirse niveles de transfección transitoria del 60-90%. Para este fin, se realiza la amplificación por PCR del clón de ADNc de preAMP humana con oligonucleótidos que contienen el codón de inicio y el sitio de unión al ribosoma nativo (secuencia Kozak) así como enlazadores de enzimas de restricción adecuados para la correcta orientación en pcDNA3. Se identificaron construcciones favorables en el ensayo transito-

# ES 2 332 882 T3

rio usando el potente antibiótico blasticidina S y un vector que contenía el gen de resistencia, se pueden establecer líneas celulares transfectantes de mamífero estables “en menos de una semana” (Invitrogen). Los vectores disponibles también incluyen el promotor constitutivo de CMV, un sitio de clonación poli-enlazador, un epítope V5/marca His6 electivo y la señal poli(A) de SV40 (PcDNA6/V5-His).

5

## 14. Expresión y Análisis de Formas Alteradas (Modificadas) de AMP-18

Dado un sistema de expresión eficaz para la producción de AMP-18 “de tipo silvestre”, puede crearse una serie de 10 proteínas mutantes, que contienen delecciones o sustituciones, que permitirán el análisis de los dominios funcionales. Las hélices anfipáticas, los restos de cisteína (C) conservados y los dobletes de aminoácidos básicos, que pueden ser 15 sitios de escisión, son dianas atractivas. Aunque no es tan simple como un ensayo enzimático, el ensayo de mitogénesis es rutinario y replicable, y posibilitaría caracterizar “mutantes” tan rápido como se construyan. “Mutantes” negativos (o positivos) dominantes serán tan significativos como mutaciones que muestra pérdida simple de la función, porque estos implicarán interacciones con otros factores incluyendo posibles receptores celulares.

## 15. Fraccionamiento Bioquímico y por Inmunoafinidad de Proteínas Gastroquinas Expresadas y Nativas

20 En el caso de algunas de las formas expresadas de la gastroquina AMP-18, la proteína recombinante contendrá marcas peptídicas que permitirán la rápida purificación de la proteína soluble. La presencia de marcas, si no impiden de forma grave las funciones normales de la proteína, también permitirán el análisis de interacciones con otras macromoléculas relevantes. Las marcas His6 permiten la purificación por la unión de las proteínas recombinantes con perlas 25 de resina Ni-NTA (Janknecht *y col.*, 1991; resina Ni-NTA de Qiagen). La proteína marcada se une con mayor afinidad que la mayoría de los complejos antígeno-anticuerpo y puede lavarse rigurosamente antes de que el complejo de quelación Ni<sup>2+</sup>-histidina se altere por el exceso de imidazol para liberar la proteína purificada. Las proteínas recombinantes 30 marcadas con GST se purifican en glutatión-agarosa, se lavan y después se eluyen con glutatión reducido (Smith y Johnson, 1988). Como con todos los sistemas de expresión propuestos, cada preparación proteica puede ensayarse en la etapa más temprana posible para su actividad de factor de crecimiento.

35 Se usan procedimientos de fraccionamiento convencionales para conseguir la pureza deseada, particularmente en el caso del aislamiento de la proteína natural de tejido. La mucosa del antro de cerdo es un punto de partida preferido para lo último, usando un protocolo inicial de centrifugación y tratamiento por calor, seguido de una columna de exclusión de tamaño: BioGel P60 es adecuada, dadas las evidencias de que existe la proteína de 18 kDa, muy probablemente 40 como un monómero en los extractos. El producto de elución se carga en una matriz de inmunoafinidad creada por entrecruzamiento de anticuerpos anti-AMP purificados en HiTrap Proteína A con Sepharose 4B activada con CNBr (Pharmacia). Puede ser útil una modificación adicional de la matriz de inmunoafinidad, por extensión del enlazador a la matriz, que ha demostrado ser útil en el pasado (Aithal *y col.*, 1994), o entrecruzando el anticuerpo con proteína A inmovilizada. Como la proteína activa puede recuperarse por elución en gel de SDS, la proteína activa también puede 45 recuperarse de los complejos antígeno-anticuerpo. Podría conseguirse fraccionamiento adicional por una columna de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa C8. Una etapa final es el uso de la técnica de elución en gel de SDS con confirmación de la identidad por secuenciación N-terminal. En todas estas etapas la AMP-18 inmunodetectable y la actividad de factor de crecimiento se fraccionarían juntas.

## 45 16. Péptidos Sintéticos Relacionados con AMP-18

La AMP-18 puede ser precursora para uno o varios péptidos bioactivos. Los péptidos sintéticos proporcionan una vía práctica para explorar la función de una proteína; los péptidos pueden imitar aspectos de la función o antagonizarlos. Si un péptido duplica o inhibe la actividad de la proteína, entonces sugiere la identidad de dominios funcionales de 50 la proteína intacta, y también proporciona la posibilidad de sintetizar sondas marcadas específicamente para explorar las interacciones proteína-célula.

55 El hallazgo de que un péptido sintético de 42 aminoácidos, que representa una región central de la proteína humana, es capaz de imitar la actividad de factor de crecimiento de los extractos de mucosa del antro parcialmente fraccionados ha proporcionado un atajo para el análisis de la función de AMP-18. Este péptido (denominado péptido 58-99; los aminoácidos están en las posiciones 58-99 de la proteína madura después de la eliminación del péptido señal) además de varios posibles sitios de procesamiento proteíco en pares de lisina, contiene una de las regiones capaces de la formación de hélices prolongadas así como un bucle de glicina-prolina. Una ventaja añadida de este péptido es que 60 contiene epítopes reconocidos por ambos antisueros descritos en este documento. Algunos péptidos más pequeños derivados de esta secuencia se sintetizaron para centrarse en las regiones bioactivas. Inicialmente se estudiaron las secuencias unidas por los restos de lisina porque pueden indicar distintos dominios dentro de la estructura proteica, en virtud de exponerse sobre la superficie de la proteína, como se evidencia por la antigenicidad de esta región, y pueden 65 ser sitios de escisión *in vivo* para péptidos bioactivos. La región de glicina-prolina es importante (véase la Tabla 1 que ilustra los dominios bioactivos de AMP-18). Se sabe que las secuencias de glicina-prolina están implicadas en ligandos SH3 (dominio de homología src tipo 3) (véase Cohen *y col.*, 1995; Nguyen *y col.*, 1998); como los dominio SH están implicados en interacciones proteína-proteína la región GP de AMP-18 puede estar implicada en la interacción de la proteína con un receptor de superficie celular. La secuencia GPGGPPP exacta encontrada en AMP-18 no se ha

## ES 2 332 882 T3

presentado para los dominios SH3 que actúan de forma intracelular, de modo que existe la fascinante posibilidad de que represente un nuevo dominio de interacción proteica para ligandos extracelulares. Un oligómero de 21 unidades derivado de los aminoácidos en las posiciones 97-117 de la secuencia madura tiene actividad similar a la del oligómero de 42 unidades. Este péptido más corto es útil para ensayos de crecimiento sobre diversas líneas de células epiteliales.

5 Este péptido no expresa el epítope reconocido por los antisueros descritos en este documento.

Todos los péptidos derivados de AMP-18 se sintetizaron por el Cancer Center Peptide Core Facility de la University of Chicago, que también confirmó la masa molecular y la secuencia de aminoácidos de los péptidos purificados que se aislan por HPLC. La actividad biológica del péptido 78-119 no solamente proporciona la base para buscar péptidos 10 más pequeños con actividad mitogénica, sino que permite encontrar rápidamente sustituciones de aminoácidos que tengan efectos positivos o negativos. Se ensayaron péptidos inactivos para su capacidad de bloquear la función de los péptidos activos o AMP-18 intacta. La posible inclusión de D-aminoácidos en los péptidos (en orden normal o inverso) puede estabilizarlos contra la degradación permitiendo al mismo tiempo la retención de la función biológica. Adicionalmente, la capacidad de sintetizar péptidos activos posibilita marcas que facilitan estudios de la naturaleza, 15 distribución tisular y cantidad de receptores celulares. Dichas marcas incluyen restos de His-6 biotina o tirosina yodada adjuntados a la secuencia peptídica (varios de los péptidos bioactivos tienen una tirosina de origen natural en el extremo C-terminal).

Los péptidos sintéticos también permiten la evaluación de la tarea de la estructura secundaria potencial sobre la 20 función. El hallazgo de que una extensión C-terminal de 4 aminoácidos del péptido activo 97-117, que se ha predicho que promueve una hélice similar a la encontrada para la secuencia de AMP-18 intacta, conduce a un péptido 97-121 más activo, es interesante. La propensión helicoide de estos péptidos activos, por ejemplo, el péptido 126-143, que 25 se parece a un péptido de magainina anti-microbiano, proporciona información útil. Con respecto a péptidos antimicrobianos, la función de la magaina en esta clase está relacionada con su capacidad de formar hélices anfipáticas (Boman, 1995). Los péptidos sintéticos que pueden estar encerrados en la forma helicoide por puentes de lactama (Houston y col., 1996) potenciaban la actividad biológica; ya existe al menos un par de restos aminoacídicos ácido y básica apropiados para la formación de lactama en regiones helicoides potenciales de AMP-18.

Otro aspecto igual de significativo de los estudios de péptidos es la disponibilidad potencial de péptidos anti-30 AMP-18 específicos que antagonicen sus funciones biológicas. Los estudios de cultivo tisular muestran que subpéptidos del péptido 78-119 promotor del crecimiento pueden antagonizar la actividad del péptido intacto (véase la Tabla 1). Los péptidos que pueden ocupar sitios de unión celular pero carecen de algún resto esencial para la actividad 35 pueden bloquear la acción de AMP-18 y sus péptidos activos. Esto hace que esté disponible otra serie de reactivos para el análisis de receptores celulares y para evaluar las constantes de afinidad receptor-ligando. La disponibilidad de antagonistas peptídicos definidos es útil en estudios con animales completos, y finalmente puede servir para regular la actividad de la proteína natural en seres humanos.

### 17. Interacciones de AMP-18 y Péptidos Relacionados con Células: Evaluación del Crecimiento Celular

40 Se eligieron la línea de células epiteliales renales de mono no transformadas BSC-1 y otras líneas de células epiteliales para evaluar los efectos sobre el crecimiento. En general, se eligieron condiciones para cada línea de modo que las células crecieran hasta confluencia en placas de plástico en medio de crecimiento suplementado con suero mínimo de ternera (o fetal) para el crecimiento (Lieske y col., 1997); las células BSC-1 llegan a ser confluientes a 45 10<sup>6</sup>/placa de 60 mm con suero de ternera al 1%. Al inicio del ensayo de crecimiento se aspiró el medio sobre el cultivo confluente y se remplazó con medio fresco con suero mínimo para mantener la viabilidad (0,01% para células BSC-1). Se añadieron preparaciones de AMP-18 al medio de cultivo y 4 días después se aclaró la monocapa celular, se 50 desprendió con tripsina, y se contaron las células usando un hemocitómetro. La determinación de la capacidad de AMP-18 de iniciar la síntesis de ADN se midió por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (Toback, 1980); para confirmar el ensayo de síntesis de ADN, se contaron autoradiogramas de células niveladas (Kartha y Toback, 1985).

La proteína AMP-18 se expresa en la mucosa del antró y a un grado menor en la mucosa del cuerpo adyacente. Sin embargo, tanto los extractos del antró como los péptidos sintéticos activos estimulan la proliferación de las líneas de 55 células epiteliales más simples. El principal criterio usado, aparte de las células que pueden ser dianas naturales para AMP-18 o sus péptidos, fue el de control del crecimiento, particularmente la restricción de densidad celular. Muchas líneas de estómago transformadas derivadas de pacientes con cáncer humano están disponibles en diversas fuentes, pero la mayoría de éstas no muestran control del crecimiento. Por ejemplo, un sub-línea celular de adenocarcinoma AGS gástrico del Dr. Duane Smoot (Howard University College of Medicine) mostró un grado mayor de inhibición del contacto, y respondió bien a AMP-18 y sus péptidos derivados. Estas células no sintetizan de forma natural AMP-18. 60 Se observaron respuestas similares con las células epiteliales intestinales IEC de rata no transformadas (proporcionadas por el Dr. Mark Musch, Dept. Medicine, University of Chicago); las últimas mostraron excelentes características celulares epiteliales en cultivo (Quaroni y col., 1979; Digass y col., 1998).

### 65 18. Receptores para AMP-18 en la Superficie de Células Epiteliales

La caracterización de los receptores celulares diana de AMP-18 es intrigante a causa de la aparente existencia de receptores en células que no se espera que nunca contacten con esta proteína. Se realizaron ensayos de respuesta de

# ES 2 332 882 T3

crecimiento inicial sobre líneas de células epiteliales derivadas de riñón, que respondieron bien al factor estomacal. Se usaron líneas de células gástricas, así como las células IEC-6 de epitelio intestinal de rata no transformadas, para abordar los receptores en células que probablemente son las verdaderas dianas fisiológicas para el factor del antró. La especificidad para la acción de esta proteína *in vivo* probablemente surge de la naturaleza extremadamente específica 5 de tejido de su expresión, en lugar de la de su receptor. Es posible que la AMP-18 pueda interaccionar con receptores compartidos con otros factores de crecimiento. Sin embargo, el estímulo del crecimiento aditivo de EGF y los extractos del antró sugiere que la AMP-18 puede tener nuevos receptores.

Pueden buscarse moléculas proteicas en membranas celulares que interactúan con AMP-18 de varios modos 10 diferentes. Se usan AMP-18 pura o péptidos relacionados marcados, por ejemplo, con biotina o yodo radiactivo, para estimar la cantidad de sitios saturables sobre la superficie celular. Se usó el análisis de Scatchard de los valores de unión para determinar la cantidad y afinidad de los receptores. Para estudios cuantitativos, se mide la unión a concentraciones crecientes de ligando AMP, y se identifican componentes no específicos midiendo la unión en presencia de un exceso 15 de factor sin marcar. Los factores de crecimiento yodados se han entrecruzado con receptores celulares posibilitando su identificación (Segarini y col., 1987). Se incuban ligandos AMP marcados con células, y se entrecruza el ligando marcado con los receptores por suero de disuccinimidilo. Las proteínas marcadas se resuelven por SDS-PAGE, y se usa autorradiografía para visualizar el complejo entrecruzado que permite una estimación del PM del (de los) receptor(es). Los miméticos o antagonistas peptídicos sintéticos permiten estudios de los receptores celulares, y sus propiedades 20 se deducen de forma razonada antes de su futura identificación definitiva, supuestamente por técnicas de clonación.

Además de estudios de entrecruzamiento, se usan anticuerpos, o AMP-18 o péptidos marcados con his6 para aislar 25 proteínas celulares o mucosas que se unen a AMP-18. Como un enfoque adicional, puede crearse una matriz con afinidad por AMP-18 inmovilizada usando Sepharose activada con CNBr. Como un comienzo simple al análisis de la vía de transducción de señales mediada por cualquier receptor celular, está disponible un ensayo para ensayar la actividad tirosina quinasa de proteínas en aislados de afinidad (Yarden y Ullrich, 1988; Schlessinger y Ullrich, 1992).

## 19. ¿AMP-18 Se Procesa en Péptidos Bioactivos?

La(s) forma(s) molecular(es) funcional(es) de AMP-18 no es (son) conocida(s). Ciertamente, la de aproximadamente 30 18 kDa es la forma proteica que se acumula en las células de la mucosa del antró, y no se detectan cantidades sustanciales de polipéptidos de PM inferior con los antisueros, aunque reaccionan con fragmentos de pepsina hasta aproximadamente 10 kDa y también con el péptido 78-119 bioactivo (que tiene solamente 42 aminoácidos). Tener acceso a AMP-18 marcada o señalada posibilita explorar la cuestión de si la proteína se procesa en extractos de la 35 mucosa del antró, o por las células epiteliales que responden a la misma.

## 20. Genes para AMP-18 en el Hombre y Ratón

Usando técnicas de PCR que emplean cebadores basados en la secuencia del clón de ADN humano, se obtuvieron 40 clones genómicos de preAMP-18 humana y de ratón. La estructura de exones/intrones (Fig. 13) está completa. Los exones de AMP de ratón son suficientemente similares a los del ser humano y el cerdo para permitir que se ensambla una secuencia del gen de ratón. Los genes humano y de ratón tienen estructuras muy similares, siendo el gen de ratón ligeramente más pequeño. La ORF contenida en los exones del gen de ratón predice una proteína que tiene una 45 identidad del 65% con las proteínas humanas y de cerdo. Una secuencia de 2 kb está arriba del gen humano.

## 21. Eliminación del Gen de AMP-18 en Ratón

A partir del mapa de ratón se diseña una construcción de direccionamiento. La construcción preferiblemente contiene: [5' - TK (un gen de timidina quinasa funcional) - aprox. 5 kb del extremo 5' del ADN de AMP-18 - el gen 50 de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) - aprox. 3 kb del extremo 3' del gen - 3']. Se requiere una longitud considerable de homología de la construcción con el gen de AMP-18 residente para un direccionamiento eficaz. Aumentando la homología total de 1,7 a 6,8 kb se aumenta la 55 eficacia del direccionamiento homólogo en el gen *hrpt* aproximadamente 200 veces (Hasty y col., 1991). Más allá de la longitud total, la eficacia aumenta solamente ligeramente. Para facilitar la detección de integrantes homólogos por una reacción de PCR, es útil tener el gen *neo* cerca de un extremo del vector. Los transfectantes resultantes pueden proporcionarse por PCR con dos cebadores, uno en el gen *neo* y el otro en el locus AMP-18 justo fuera del vector de dirección. Se han obtenido regiones flanqueantes que se extienden 4 kb 5' y 4,5 kb 3' del gen de ratón. A 60 través de recombinación homóloga, se remplazará la región codificante por el gen *neo* para asegurar una eliminación completa del gen ya clonado. Después de retirar por recorte la secuencia plasmídica, se introducirá por transfección en casete de dirección en células ES y se obtendrán transfectantes estables por selección con G418, un análogo de neomicina, y ganciclovir (Mansour y col., 1988). Se usarán transferencias de Southern con la sonda de la secuencia flanqueante para explorar recombinantes homólogos dirigidos. Los clones de células ES correctamente dirigidos se 65 inyectarán en blastocitos de ratones C57BL/6.

Se reproduce la descendencia masculina obtenida de madres suplentes que tienen al menos un 50% del pelo agutí (células derivadas de células madre embrionarias (ES)) con ratones C57BL/6. Los ratones F1 que son agutíes tienen el

## ES 2 332 882 T3

componente paterno derivado de las células ES (agutí es dominante sobre negro). El 50% de estos ratones debe tener el alelo preAMP-18 eliminado. Estos ratones hemicigóticos se controlan para cualquier efecto de dosificación génica disminuida. Son preferibles ratones knockout homocigóticos. Si la única función de AMP-18 está en el estómago después del nacimiento, entonces se esperan homocigóticos viables. Si no pueden obtenerse estos, se indicaría un defecto letal para el feto, y se establecería una fase fetal de aborto. Este resultado sugeriría una tarea no prevista de la proteína en el desarrollo normal.

Los ratones AMP-18 knockout homocigóticos son útiles para investigaciones de morfología y función estomacal. Se espera que dichos ratones knockout muestren si AMP-18 es esencial, y en qué fase del desarrollo gastrointestinal es bioactiva. Es posible que los ratones AMP-18 knockout hemicigóticos ya muestren un fenotipo. Esto podría suceder si la dosificación reducida de la proteína redujera o eliminara su función, o si la imprimación parental o la expresión mono-alélica aleatoria tiene una influencia significativa. Un intervalo de posibles consecuencias de la eliminación de AMP-18 en ratones incluye: i) ausencia de homocigóticos viables, lo que implica una tarea en el desarrollo esencial no previsto; ii) homocigóticos viables, pero con funciones gastrointestinales obviamente alteradas; iii) sin fenotipo fuerte, es decir, la proteína no es importante para el desarrollo y vida del ratón de laboratorio. Si es apropiado, se persigue la generación de AMP-18 en ratones con sobre-expresión. Una proteína AMP-18 truncada producida en los ratones podría crear de forma potencial un fenotipo negativo dominante; el conocimiento obtenido de los experimentos definirá adicionalmente los dominios funcionales de la proteína.

20

### *Abreviaturas para aminoácidos*

25

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

**Documentos citados**

- Aithal, N.H., y col. (1994) *Am. J. Physiol.* 266:F612-619.
- 5 Altschul, S., (1997) y col. (1994) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402.
- Baczako, K., y col. (1995) *J. Pathol.* 176:77-S6.
- 10 Blaser, M.J. y col. (1987) *Gastroenterol.* 93:371-383.
- Boman, H.G. (1995) *Ann. Rev. Immunol.* 13:61-92.
- Cohen, G.B., y col. (1995) *Cell* 80:237-248.
- 15 Cregg, J.M., y col. (1993) *Bio/Technol.* 11:905-910.
- Dignass, A.U., y col. (1998) *Eur. J. clin. Invest.* 28:554-561.
- Falk, P., y col. (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90:2035-2039.
- 20 Goodwin, C.S., y col., (1956) *J. Clin. Microbiol.* 39:353-356.
- Hasty, P., y col. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11:5586-5591.
- 25 Houston, M.E., y col. (1996) *Biochem.* 35:10041-10050.
- Janknecht, R., y col. (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:8972-8976.
- 30 Jeon, C.J., y col. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:9106-9110.
- Johnson, F.R. y McMinn, R.M.H. (1970) *J. Anat.* 107:67-86.
- Kartha, S. y Toback, F.G. (1985) *Am. J. Physiol.* 249:F967-F972.
- 35 Kartha, S., y col. (1992) *Exp. Cell Res.* 200:219-226.
- Lieske, J.C., y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:6987-6991.
- Lieske, J.C., y col. (1997) *Am. J. Physiol.* F224-F233.
- 40 Lacy, E.R. (1998) *J. Clin. Gastroenterol.* 10 (Supl. 1):72-77.
- Mansour, S., y col. (1988) *Nature* 336:348.
- 45 Moore, K.S., y col. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:19851-19857.
- Nguyen, J.T., y col. (1998) *Science* 282:2088-2092.
- Nomura, A., y col. (1991) *N. engl. J. Med.* 325:1132-1136.
- 50 Nusrat, A., y col. (1992) *J. Clin. Invest.* 89:1501-1511.
- Park, C.B., y col. (1997) *FEBS Lett.* 411:173-178.
- 55 Parsonnet, J., y col. (1991) *N. Engl. J. Med.* 325:1127-1131.
- Podolsky, D.K. (1997) *J. Gastroenterol.* 32:122-126.
- Powell, C.J., (1987) Ph.D. Dissertation, University of Chicago.
- 60 Quaroni, A., y col. (1979) *J. Cell Biol.* 80:248-265.
- Romanos, M.A., y col. (1992) *Yeast* 8:423-488.
- 65 Rotimi, V.O., y col. (1990) *Afr. J. Med. med. Sci.* 19:275-280.
- Sands, B.E. y Podolsky, D.K. (1996) *Ann. Rev. Physiol.* 58:253.

ES 2 332 882 T3

Schlessinger, J. y Ullrich, A. (1992) *Neuron* 9:383-391.

Sears, I.B., y col. (1998) *Yeast* 14.

5 Segarini, P.R., y col. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:14655-14662.

Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40.

10 Toback, F.G. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:6654-6656.

Yarden y col. y Ullrich (1988) *Biochemistry* 27:3113-3119.

Yoo, O.J. y col. (1982) *PNAS* 79:1049-1053.

15 Yoshikawa, Y., y col. (2000) *Jap. J. Cancer Res.* 91:459-463.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5        1. Una composición farmacéutica usada para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal, comprendiendo dicha composición un péptido estimulador del crecimiento; estando seleccionado dicho péptido estimulador del crecimiento entre el grupo constituido por las secuencias de aminoácidos KKLQGKGPGGPPPK, LDALVKEKKLQGKGPGGPPPK, y LDALVKEKKLQGKGPGGPPPKGLMY.

10      2. Uso de una composición que comprende una proteína gastroquina que comprende una secuencia de aminoácidos consenso seleccionada entre el grupo constituido por VKE(K/Q)KXXKGKGPGG(P/A)PPK, VKE(K/Q)KLQGKGPGG(P/A)PPK y VKE(KJQ)KGKGPGG(P/A)PPK, o un péptido seleccionado entre el grupo constituido por las secuencias de aminoácidos KKLQGKGPGGPPPK, LDALVKEKKLQGKGPGGPPPK, y LDALVKEKKLQGKGPGGPPPKGLMY para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión del tracto gastrointestinal de mamíferos, en la que tiene que estimularse la migración de células epiteliales.

15      3. Uso de una composición que comprende una proteína gastroquina que comprende una secuencia de aminoácidos consenso seleccionada entre el grupo constituido por VKE(K/Q)KXXKGKGPGG(P/A)PPK, VKE(K/Q)KLQGKGPGG(P/A)PPK y VKE(K/Q)KGKGPGG(P/A)PPK o un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos LDALVKEKKLQGKGPGGPPPK, para la preparación de un medicamento para la citoprotección de células epiteliales dañadas en el tracto gastrointestinal de mamíferos en la que las células epiteliales dañadas tienen que ser células a poner en contacto con dicha composición.

4. El uso de la reivindicación 3, en el que las células dañadas son una úlcera.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 332 882 T3

1 AGCTTTATAA CCATGTGATC CCATCTTATG GTTTCATCC ATGCACAGGA  
51 GGAAAATTGT GGGCACGAAAG TTTCCAAAGG GAAAATTAT AGATTGGTAG  
101 TTAATGAAAT ACAGTTTCC TCCTTGGCAA ATTTAATTAA CTAGCTTCAC  
151 TGTATAGGAA AAAGCAGGAA AAAAATTAAA ACCAACTCAC CTCCAAACCT  
201 GTTTTGAGCT TTTACTTGTG TGCCCAATTG ATAGTTCTA CTCTCTGCTT  
251 TTGATGAAAA TATTTTTAT TATTTTAATG TAACCTCTGA AAACTAAATT  
301 ATCTAGAACG AAATAAAAAG ATATTGCTTT TATAGTTCCC AGAAGGAAAA  
351 ACAAAACACT AGGAAAGTTC TATCTATCAG ATGGGGAGA TGTGATGGAG  
401 GCAGTGATAT TTGAGCTGAG CCTTGAACAA TGAACAGGAG TCTACCAAGC  
451 GAGAGGCTAG CGGGTGGCCC TCAAGATAAA ACAACAGCAT GTACAAAGGC  
501 ATGGAGACAT ACACATCTT ACTCTTCCAG GAATGCTGGG AACGCTGGTG  
551 GAGCTAGAAT GTAGGTACAT AGCATAAAGT GGCAAGACGGG AAGCCTTTGG  
601 AAATCTTATT ACATAGGACC CTGGATGCCA TTCCAATGAC TTTGAATT  
651 CTGTAGGCTG CCAGCGAAAT TTCCAAGCGT GATAGAGTCAT TGTCTATCTA  
701 TGCACTTCAAG AAGACAACC TCAGGGTTAA TGAAGAAAAT GCATTGGAAT  
751 ATAAGAAACT GGTGACCAAGA GTGATCAATT GCATGACTGT TGTGAAAGTC  
801 CAGGTGAGGG GAGCTGTGGG CAAGGTCAGA GTTGAGAGGC ATTTCAAGAGA  
851 TAAAATGACA GTAACTAAGT AGATGTCAGG CTGAGAAGAA AGGGCTGTAC  
901 CAGATATATG GTGCTATCAT TAAGTGAGCT CAACATTGCA GAAAAGGGGT  
951 AGGTTGGTG GGAGTTGCTC ACAAAACATG TTTAGTCTAA GCAAAACCAT  
1001 TGCCATGGGC TCAGATAAAA GTTAAGAAGT GGAAACCAATT CCTACATTCC  
1051 TATAGGAGCT GCTATCTGGA AGGCCTAGTA TACACGTGGC TTTTCAGCTG  
1101 TGATTTGTT TGATTTAGG GATTATTCTT TTTCTGAATC TGAGCAATGT

FIG. 1

# ES 2 332 882 T3

1151 TAGCGTGTAA AATACTCACA CCCACAGCTT TGACTGGGTG AGARGTTATC  
1201 ATAAATCATA TTGAGTTGT TGTGATACCT TCAGCTTCAA CAAGTGATGA  
1251 GTCAGGTCAA CTCCATGTGA AAGTTCCTTG CTAAGCATGC AGATATTCTG  
1301 AAAGGTTTCC TGTTACACTG GCTCATGGCA CAGATAGGAG AAATTGAGGA  
1351 AGGTAAGTCT TTGACCCCAC CTGATAACAC CTAGTTGAG TCAACCTGGT  
1401 TAAGTACAAA TATGAGAAGG CTTCTCATTC AGGTCCATGC TTGCCTACTC  
1451 CTCTGTCCAC TGCTTCGTG AAGACAAAGAT GAAGTTCACA GTGAGTAGAT  
1501 TTTTCCTTT GAATTTACCA CCAAATGATT GGAGACTGTC AATATTCTGA  
1551 GATTTAGGAG GTTTGCTTCT TATGGCCCCA TCATGGAAAG TTTGTTTAA  
1601 AAAAATTCTC TCTTCAAACA CATGGACACA GAGAGGGAA CAACACACAC  
1651 CAGGTCTGT TGCGGGGTGG AGAGTGAGGG GAGGGAACTT AGAGGACAGG  
1701 TCAATAGGGG CAGCAAACCA CCATGGCACA CATATACCTA TGTAACAAAC  
1751 CTGCACGTTTC TGACATGTA TCCCTTTTT TTAGAAGAAG AAATAATGAA  
1801 AAAAAACCTT TTTCTATTT ATATAATCAT GGCAATTATA AGCATCTCTA  
1851 TAGAGAAGGA TAATTGTGCT GAGATTAGAC AGCTGTCTGA GCACCTCACA  
1901 CTGACCTATT TTTA~~CH~~AAA TGACTTCCA CATCACCTGA TTTCGGCTCC  
1951 ATGCRGGGTA AGCAGTTCT AAGCCCTAGA AAGTGCCGAT CATCCCTCAT  
2001 TCTTGAATTC CTCCTTTAT TTACCAAAAT TCCTGAGCAT GTTCAGGAAA  
2051 GATGAAAAGC TTATTATCAA AATRAGTGGC TGAGATAGAC TTCTTGTAC  
2101 ATTTGTTACA GTAAAATGGG TCTCCAAGGA AGAAAGATTG GCCTTGGGCT  
2151 CTAGCATGGC CATTATTTA AGAAAGCATC TGAAACATGA AGCTACCACA  
2201 GCATCTCTCC TGTGGTTCCA GACGGAAGCC TGAGAGTCTA GGAGGAGGTG  
2251 GACCGAGAAA CCCTGCCAAA GTAACTAGTA GTGCCGGTT TCTCACAAACA  
2301 CGATGCAAAG GGGCTAGAAT CAGATGACTA TTTTCATGTT TCAACATACT

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

2351 ACACACTGGA AAAACGTTACG GCAGACTCTA CTTTATAATG GGGCTGCAAA  
2401 TGTAAAATGA CTACTAGAAC TAGGTCTCT TAATAGCAGC AAGGTTTAAA  
2451 AGGGTCAGAG GGAGGCTCCAG ACACAGGTTA GATTTGATTT CTCTCCTAGT  
2501 TCTGCTGTGA ACAAGAGGTA TAAGTTGGC CAACTCACTT AACCCCTGAA  
2551 GCTCAGTTAC CTTATCTGTA AAATGATTGC ATTGTACTAG GTGTTCTCTA  
2601 AAATTTCTTC TACCTCTGAC TTTTTAGGAG ACTAATTTT AACTCCCTTT  
2651 TAAGCTATTG GGAGAAAAAT TTAATTTTTT TTCAAAAGTT ACCTTGAAATC  
2701 TCTAGAGCAG TTCTCAAAAC TATTTTGTC CAGGCAAAGG AAATGAGACT  
2751 AGGTACCCAG AATGAGGCAC CCTGCATAAA GCTCTGTGCT CTGAAAACCA  
2801 ATGTCAGGGA CCCTGTGATA AATAATTAAA CCAAGTATCC TGGGACACTG  
2851 CTAGTGACAT CGCCTCTGCT GATCACTCTT GCCAGCGAGA CACTCTATAC  
2901 TTGCTTTCTC ATCATTGGCA TCCAAACTGC CTACTAATCC ATTGCTTTGG  
2951 AAAGTTTTTT TTAATAAAAA GATTATTTCT ATTAGGAGGA AACATCCCA  
3001 TGTTAAATAG GAAAATTAAC TGAAATCATT TTCAGATGTG ATTTTAGCA  
3051 CTTATAGCCA TTTCAAAACCA TGGTATTCAAT TTATACATG CTATTTATTG  
3101 TAAAACTTCT TTTTTTTCC AAGGAAAATA AGATAGTTG CTTTATTTA  
3151 AAACAGTAAC TTTCTTATAT TGGGGCACTG ACCAAATTC AATACTGGTA  
3201 CAAATATGTT ACCTAGGGGG TCaaaATATG TGCCAGGTGA ATTTCCTGAA  
3251 TTTCTCTAAA GAGAGAATT TAAACCTTAT AAAACAATTA GAAACAAAGTG  
3301 AGTGAGAGGT GAGGCATCAAC AACCTGTGTA ACATAAGCCA CAGTACAAAT  
3351 TTAAGCTGAA TAACCAAGCC ATGTCAGTTA TCCCAAATCA TTTTGTTAA  
3401 TATTTAGGAG GATACACATA TTTTCAATAA CTAAAAGTG AATCTTTACT  
3451 CCTATCTCTT AATACTCGAA GAAGTATAAC TTTCTTCTTT TACTAGATTT  
3501 AAATAATCCA AATACTACT CAAGGTAGGA TGCTGTCAATT AACATAGCT

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

3551 GAGTTTATCC AAAATAGAAG AATCATGAAG ATTTATAAAG CATT'TTAAAG  
3601 ATAATCATTG ATAGCAAGTC CTTGAAAGCT CTAAATAAGA AAGGCAGTTC  
3651 TCTACTTTCT AATAACACGT ATGGTTTATA TTACATAATA TAATTCAACA  
3701 AAACAGCGATT CTGACCAATG ATAATTATA GGAAATT'CAT TTGCCAAGTA  
3751 TATGTTTAT TATAAGTTA ATATTTGAC CAATCTAAA AATTTTAAA  
3801 CTCTATTCTG ACATTCCAG AAGTATTATC TTAGCAAGTC ATCTTTATGA  
3851 TACCACTTAT TAAACTGAAG AGAAACAAGA TGGTACATTG TGGGTTTAC  
3901 TTTAAAAGGG ATTTGATTCA ATAATTGAT TTATCACTAC TTGAAAATTA  
3951 CATTTCCTTC CTCAGACTGG ATGGCAATGA GATGAAAGCA GCTTCCTGG  
4001 CTCTCAACTT CCCTCTTCA TCAATTTCAG CAGCGTTCA TAAGGCCTAC  
4051 ACTAAAAATT CTAACACTAT ATATCACATT AATATAATTAA CTTATAATTAA  
4101 ATCAGCAATT TCACATTATC GTAAAAACCT TTATGGTTAA AAATGCAAG  
4151 GTAAGAGAAG APAAAACAC ATTGAACTAG AACTGAACAC ATTGGTAAA  
4201 TTAGTGAATA CTTTCATAA GCTTGGATAG AGGAAGAAAG AAGACATCAT  
4251 TTTGCCATGT AACAGGAGAC CAATGTTATT TGTGATTCA GATTGTCTT  
4301 GCTGGACTTC TTGGAGTCTT TCTAGCTCCT GCCCTAGCTA ACTATGTAAG  
4351 TCTCACCTTT TCAAGTTGC TACCAAAATG CATTGCAAG GAAATGTGAT  
4401 ATTAATCAC TCTCAATCTC TTATAAACTT CAGAATATCA ACGTCAATGA  
4451 TGACAAACAAC AATGCTGGAA GTGGGCAGCA GTCAGTGAGT GTCAACAATG  
4501 AACACAATGT GGCCAATGTT GACAATAACA ACGGATGGGA CTCCTGGAAT  
4551 TCCATCTGGG ATTATGGAAA TGTAGGTAGT CAACGTGCAA TTTTCACTTT  
4601 ATTTTTAAA AATACGACTT CTTTTTAACTA AAAATGTGC ATGTTAACCA  
4651 TAAAGAAATT AAAATAATAT TCTAATTACA CATAGCATAAC AGTTATAAGT

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

4701 AAAGGTGACC ATTTTGCTCA TCCGATTITG TTCCCTAGAG ATAACATACTG  
4751 TTAATA&GTG TTGCATGATC AGTTAAAATT CAAACCAACA AACACTATGT  
4801 TCAAGGGATT GTGGGTATAT ACAACAAATA TGAACATCCT TTTGCCCTG  
4851 CTGCAGATAC CCTCAATAAT GCTGAAAGAC TTATACACCA TTACTGCTTC  
4901 CAAAGCTTAG ACTATCTCAC TTTGTTTCA AAGGAGGTTT TACG&CCTTC  
4951 TAAAGAGATT GAAATTGACA TTTCACCTAA AACTCGGGAA ATGTAATGA  
5001 CAATATTAAAT TGGTAAGAGA GGAAAGAAGA AAGAAAGAAG GAAGGAAGA  
5051 AAGAAAGAAG GAGGAAAGGA AAGAAAGAAGA GAAAGAAGA AAGAGAGAGA  
5101 AAGAAAGAAGA AAGAAAAAGAG AGAGAAAGAG AGAAGGAAAG AAAGAGAGAA  
5151 GGAAGGAAA AGAGAAGCAA AGAAAGACAG GAGCAAAGAA AGGAACACTT  
5201 AGCACTAGTT GGGAGACCCA ACTCTGGAAT TATCAGCTAT ATATTAACA  
5251 AACGTTATAC TTTTAATAG CAAACTCTT ATTGTTCAA TTTTATCTGG  
5301 TCAATTGGAA AAATAATTAA TGTCTTATCT GTCTCCTTGA AATGTGAGGA  
5351 TCAAAGGAGA CTAAACATG ATAGCTTTA AAGTCTATTT CAGTAAACAA  
5401 GACTTATATA GAGGGTTTT TATCATGCTG GAACCTGGAA ATAAAGCAA  
5451 CCAGTTAGAT GCTCAGTCTC TGCCCTCACA GAATTGCAGT CTGCCCCAC  
5501 AAATGTCAGC AATAGATATG ATTGCCAAGC AGTGCCCAT CCAGTGCTCT  
5551 TATCCCAGCT CATCACGATC TTGGAGTTCC CATTCTCTC TGCAGGTGGA  
5601 ACTGACCTCT GATAAGAAAA GCTCCTCGGA GACACATGC CTCACATTT  
5651 GCCATCTACT TAAACAGGGC TTTGCTGCAA CCAGACTCTT TCAAAGAAG  
5701 ACATGCATTG TGCACAAAT GAACAGGAA GTCATGCCCT CCATTCAATC  
5751 CCTTGATGCA CTGGTCAAGG AAAAGAAGGT AAAATAAAA GGCTTTTAT  
5801 TTTGGTGAG GGGAGAGGTT TTACATCCTT CAGTAAATAA CGAGAAGATC  
5851 ACAGTCATTC CCTCTTGACT ACAGTATGTT GTAGTGTGCA GCACPAAGGG

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

5901 GGAAGTTATT GGTGATTGCC TGAGGGAGG CAACTTCTGC CACATCAAAT  
5951 GCTGTGGCTC ACACCTACCT CTACAAACCGC TGAGCAAAGC ACTTGAAACC  
6001 TTGACTGTTA GAGGAGCAAA GCTCTGGTCA CACCAATAGG AGCCTCAGTA  
6051 CTTTGCCAAG GACATTTTC TGCAAGAGTT AGTTAGGGTT ATTAGATTTA  
6101 GCAAATGAAA ATAGAAGATA TCCAGTTAGG TTTGAATTTT AGGTAAAGGAG  
6151 CAGGTCTTTT TGTATATAATA TATCCTATGC AATATTTGGG ATATACTAAA  
6201 AAAAGATCCA TTGTTATCTG AATTCAAAT GTAACGGGT ATTGTATATT  
6251 TTGTCCTGGCC ATACTAATCC AGGTGAGTGG AAAGAAGAGA TCCATATGT  
6301 TTTAAATAT TTGCCTGAGT TCATATTCC ATAACGTATA AATGAGTACC  
6351 TTTCAATTGAC AAGGTAGAGA AAATAATAAA ACTGCATTCT CAGAAGATGA  
6401 TTATTACATA GTCTAATCCA AGGARTCTAT GATGACCAAA TGAGGTCAA  
6451 GTTGCAGAAT AAATTAAGCC TCAGACTTCT GTGTTATGA GAAGCTGAGG  
6501 TTTCAACCA GGTAAATCCC TTAGGACACT TAGAAATGCT AAGATATAACA  
6551 GAATAAGCTA GAAATGGCTC TTCTTCATCT TGATTATGGA AAAATTTAGC  
6601 TGAGAACAC TCACTGTTGG CCTCGTATAC CCCTCAAGTC AACAAACAC  
6651 TGGGCTTGGC ATTCAATTCTC TCCCATTCTT CCTTTCTACC TCTCTTTCC  
6701 ACACTCAGCT TCAGGGTAAG GGACCAAGGAG GACCACCTCC CAAGGGCTG  
6751 ATGTACTCAG TCAACCCAAA CAAGTCGAT GACCTGAGCA AGTCGGAAA  
6801 AACATTTGCA AACATGTGTC GTGGGATTCC AACATACATG GCTGAGGAGA  
6851 TGCAAGGTGA GTAGCATCCC TACTGTGCAC CCCAAGTTAG TGCTGGTGGG  
6901 ATTGTCAGAC TATCCTCGCG CGTGTCCATA GTGGGCACCA GTGATGCAGG  
6951 GATGGTCATC AAGGCCAACA TTTGTGCAGT GCTTGCTCTG TGCCAGGTAC  
7001 TGTTCTATGT GCTTTAAGTG TGTTAACTCG GTTCTTCACA GCAATCTTAT  
7051 AGGTTCTATT TTATCCTAC TTTATGGATG AGGAAACTGA GGTACAGAGA

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

7101 GGTCAACAAAAA TCCTTGCCTG GGTCATTCG AAGCATTTCG GCTGTGGATT  
7151 CTGTGCTCTT AAATATTATG GAACACTGCC TTTTAAGTGT GAATCAAGAG  
7201 TAGACTCAAG TCATATTCAA AAGAATGCAT GAATGGCTAA ATGAAAGAAG  
7251 AATGCTAATA GAATCTATTA ACTTTCTATA GCTCAGACAA TCACTTAATT  
7301 TCTGGACATT CAAAGAACAG CTGCACACAA ACAAAAGTGTAC TACCTAGGGA  
7351 CCTAACTTAA TGCGAATTTT CCAGATCTCT GAATTGATTG ATTTCATCAC  
7401 AACAAAGTAGA TAAACCTTGA CATTAGCACA TAGCTAGTTT GGAAACCCCT  
7451 ACTCCCCCAA TCCCCTCCAA GAAAAGAGTC CTTAAATAGA CTTAAATATA  
7501 GGCTTCTTCT TTCTCTTTA TTAGAGGCCT GCCTGTTTT TTACTCAGGA  
7551 ACGTGCTACA CGACCAGTGT ACTATGGATT GTGGACATTT CCTTCTGTGG  
7601 AGACACGGTG GAGAACTAAA CAATTTTTA AAGCCACTAT GGATTTAGTC  
7651 ATCTGAATAT GCTGTGCAGA AAAAATATGG GCTCCAGTGG TTTTACCAT  
7701 GTCATTCTGA AATTTTTCTC TACTAGTTAT GTTTGATTTC TTTAAGTTTC  
7751 AATAAAATCA TTTAGCATTG AATTCAAGTGT ATACTCACAT TTCTTACAAT  
7801 TTCTTATGAC TTGGAATGCA CAGGATCAA AATGCAATGT GGTGGTGGCA  
7851 AGTTGTTGAA GTGCATTAGA CTCAACTGCT AGCCTATATT CAAGACCTGT  
7901 CTCCTGTAAA GAACCCCTTC AGGTGCTTCA GACACCACTA ACCACAAACCC  
7951 TGGGAATGGT TCCATACTC TCCTACTCCT CTGTCCACTG CTTAA

FIG. 1 Cont.

# ES 2 332 882 T3

1 CATGCTTGCC TACTCCTCTG TCCACTGCCT TCGTGAAGAC AAGATGAAGT  
51 TCACAATTGT CTTTGCTGGA CTTCTGGAG TCTTTCTAGC TCCTGCCCTA  
101 GCTAACTATA ATATCAACGT CAATGATGAC AACAAACAATG CTGGAAAGTGG  
151 GCAGCAGTCAGTCA GTGAGTGTCA ACAATGARCA CAATGTGGCC AATGTTGACA  
201 ATAACAAACGG ATGGGACTCC TGGAATTCCA TCTGGGATTA TGGAATTGGC  
251 TTTGCTGCAA CCAGACTCTT TCAAAAAGAAG ACATGCATMG TGCACTAAAT  
301 GAACACGGAA GTCATGCCCT CCATTCAATC CCTTGATGCA CTGGTCAAGG  
351 AAAAGAAGCT TCAGGGTAGG GGACCAGGAG GACCAACCTCC CAAAGGGCCTG  
401 ATGTAATCAG TCAACCCAAA CAAAGTCGAT GACCTGAGCA AGTCGGAAA  
451 AAACATTGCA AACATGTGTC GTGGGATTCC AACATACATG GCTGAGGAGA  
501 TGCAAGAGGC AAGCCTGTTT TTTTAATCAG GAACTGTGCTA CACGACCAAGT  
551 GTACTATGGA TTGTGGACAT TTCCCTCTGT GGAGACACGG TGGAGAACTA  
601 AACAAATTAA TAAAGCCACT ATGGATTTAG TCATCTGAAT ATGCTGTGCA  
651 GAAAAAAATAT GGGCTCCAGT GGTTTTACC ATGTCATTCT GAAATTTTC  
701 TCTACTAGTT ATGTTTGATT TCTTTAAGTT TCAATAAAAT CATTAGCAT  
751 TG

FIG. 2

**FIG. 3**

1	MKFTIVFAGLLGVFLAPALANYNINVNDDNNNAGSGQQSVVNNEHNVAN	50
51	VDNNNGWDSWNSIWGYGNGFAATRLFQKKTCIVHKMNKEVMPSIQSLDAL	100
101	VKEKKLQGKGPGGPPPGLMYSVNPNKVDDLSKFGKNIANMCRGIPTYMA	150
151	EEMQEASLFFYSGTCYTTSVLWIVDISFCGDTVEN	185

# ES 2 332 882 T3

1 GAATTCAAAAC AGCAGGCCAT CTTCACCCAG CACTATCCGA ATCTAGCCAT  
51 ACCAGCATTC TAGAAGAGAT GCAGGCAGTG AGCTAAGCAT CAGACCCCTG  
101 CAGCCCTGTA AGCTCCAGAC CATGGAGAAG AGGAAGGTTG TGGGTTCAAG  
151 GAGCTTTCA GACTGGAAAT CTGTGGATCA GTGATTTATA AAACACAGTT  
201 TCCCCCTTTA TTAGATTGAA ACCACCAGCT TCAGTTGTAG AAGAGAACAG  
251 GTTAAAAAAAT AAATAAGTGTGTC AGTCAGTTCT CCTTCAAAAC TATTTAAAC  
301 GTTTACTTAT TTTGCCAACT GACAGTCTCT GCTTCCTCTC CTAGGAGAAG  
351 TCTTCCCTTA TTTTAATATA ATATTGAAA GTTTTCATTA TCTAGACCAG  
401 TGGTTCTCAT CCTGTGGGCC ATGAGCCCTT TGGGGGGTT GAACGACCC  
451 TTCACAGGGG TCACATATCA GATATCCTGC ATCTTAGCTA TTTACATTAT  
501 GATTCAAAAC AGTAGCAAAA TTAGTTAGGA AGTAGGAAACA AAATAACGTT  
551 ATGGTTGTGG TCACCACTAT GTTAGAGGGT CCGCAGCATT CAGAGGGTTG  
601 AGAACCTGTG TTCTAGAGGC AAATAAGAAG ACAGAGTTCC TTGATAGGGC  
651 CCAGAGGCAG TGAAAGAAGT TTCCACGTAG AAAGTGAAGA AGGTCTGGTG  
701 TCCGAAGCAG TGAGGAACCTT AAAAAAAAGAA AACCAAAAC ATTGCCAACT  
751 AACAGTCCAG GAGAAGAGCG GGGCATGAAA GGCTGAGTTG CCATGGGATG  
801 CCTTGAATGG AATCACAGTG TGGAAAATT GGTGTGGCTG GAAGGCAGGT  
851 GCCGGGCATC TCAGACGCTG GTAGCTGGGG AAACAGGAAA CCCCTTCTAGG  
901 ATCCCAAGAT GCCATCCAA TGAGCTTGAG ATTTTCTCA TGGACTGCCA  
951 GTGAATGTTT CTACGCTCCG GAAATTAATG TTTACTTATT TTCCATATTC  
1001 TAGGGGAGAA CCCTGGAAA AATGGAGGAC ATTCAATTGAA ATATCTGAGT  
1051 CCTGGGATAA GGCAGGCTTG GTCCCTACAAAC TCTGGTAAAA GTCCATCAGG  
1101 AAGTGCCTTG ACCAAGGCTG GAGTGGAGAG CTGTTGGTGA GATGTAAGGG

FIG. 4

# ES 2 332 882 T3

1151 CAAGGTTTAG TTGCTAGATA TGATAGTGGC AAGATGGTGC TGCCAACAGC  
1201 CCCCCAGAGCT CTAACCCACT GAGAAACCCA GGAATGAATG ATGGGAGATG  
1251 GCTTTGGTGC CAGCTGCTAG TGACATGGCT GGAAAGCTGC ACTGGCTTCG  
1301 AGGCCAGACA ATTCTCTAAG GAAACATCTG GCCAGGGTGC AAGGGCCAGT  
1351 TTCCTTCCTT GGAGTTCCCTT TCACAGCTAA GAACATCATC CCCAACAC  
1401 TGGTTTGTT AAAAAGTTT CAGTATGACT TGAGCATGGT CAAGAAGCAT  
1451 AGAGAGGGGG AAATAAGGGT GGAAGGAGCT GGAGRAAGCT TACATAGGA  
1501 CTGGGTAAAG GGAAGGAGAA GAAACATTTC CCGCATTCCC ATAGGAGCCA  
1551 GTACCAGGAA GGGCAGGTGT ACACACAGAT CTCATCTAAG GGCATGTTG  
1601 GTTTAGGGAT TACTCTTCTC CGGAATCTGA GCAGCACCAA TACGTAAAAT  
1651 ACCCACCCCC ATGGCTTCCA TATTCCAGAA CTTATCACAA ACCGTGTAGA  
1701 GTTTACTGAG ATACCTTCGT CAGAGGATGA GTCAGAGGCC TCCTGCTAA  
1751 GGGCCCTACT GAGCAGGCAG CTAAAGGCTT CGGGCCTCT GCAGCTCCAC  
1801 AGATACAGGA GAGGGAGCA GATAAGCCGT GGACTCCACC TGAGCACACC  
1851 TAGCTTGAGC AAGCTGGTC AGGTACAAAT AGCAGAGGGC TGAATGTCTG  
1901 TGAGCACGCC GCCTGATCCT CTGCTCCACC ACACTCCTGC CGCCATGAAG  
1951 CTCACAGTAA GTCAGATCTT CTTTCAATG CAGCACCCATA CAACATTAAT  
2001 AGTCAGGGGT GAGGGGGTCT GACTCTTACG GCACTGTTAC CATA GTGGAA  
2051 ATATTCTCCT TTCTTTCAT GGAATCATGG TGTTTACAAG CATGTCCATA  
2101 GAGAAGAAGA ATTGCCCGG AAGAGCCTGT CACAGGCTGA ATACTGTAGA  
2151 ATTGTCTTTC ACACCACTTG TTCCAAGGTT CTACTTAAGA CGAGCAGTCT  
2201 CTGGGCTCCA GAAAGAGTCT TTCTTAGCCT TGATCTCTT CTTATTTCTG  
2251 ATTTCTCCTT TCTTATCCAT GATTCCACT TTTACCAGTT CTGGGCATGT

FIG. 4 Cont.

# ES 2 332 882 T3

2301 TCCGGTCAGA CTGGAAAGATC ACTGTTGTCA AAACTAGTCT TCAACACTCT  
2351 TGGCTGTTAA CATGAATAACA ACGGTCCTTG GGCCCTGTGC AAGCATTTCT  
2401 TGGAGAAAGT CTCTGGGAT GAAGCTATCT CAGTTTCCCC ACTGAAGTCC  
2451 TAGGATACAG AGGCTCAAAC AGAGTGCACA TATTCAATTT CAGCATACTC  
2501 TATTGGCGCT GCTTAATGAA TCATATGAAT TTATGGAATT GGAATTGTAA  
2551 ACTATGACCA AGAAGCGTCC ACCTCAGAAC AGGTTGGGTG GGGAACTCCA  
2601 AGCACAGGCC AGAGGGCTGC GTTCTCTTC TAGTTCTGTC TAGAGGAGTG  
2651 GTTCTCGACC TTCCTAAATGC TGTGACCCCTT TAATACAGTT CCTCACGTTG  
2701 TCGTGACTCC CAGCCATAAA ATTACTTTCA TTGCTACTGC ATAACGTAA  
2751 TTTTGCTACC ATTATGAGTT GTAATGTAAA TATCTGATAT GCAAGATAACC  
2801 AGATAACCTA AGAACCGGTT GTTGACCTT TAAAGGGTC ACAACCCACA  
2851 GGTGGAGAAC TACTGGTCTA GGGTCCTTTA CAGTCCTTTA GCTGCCTCAT  
2901 TTACAGGAGA TAACATCATG CTCAAAAACT CCCTCCACAT TTGGCTTTT  
2951 GGGTTGTTTT GTTTGTTTT TCAAGACAGG GTTCTCTGT GTAGCCCTGG  
3001 CTGTCCTGGA ACTCACCTTT GTAGACCAGG CTGGCCTCGA ACTCAGAAAT  
3051 CCGCCTGCTT CTGCCTCCTG AGCGCTGGGA TTAARGGCGT GCGCCACCAT  
3101 GTCTGGCTCA CATCTGGCTT TTTAAGAGAC CGATTTAAC TTCTTGCATT  
3151 GAAAATAAT ATAGTAGAA TGCTTAACCT ACTAAGACAA TAAAAACAGG  
3201 ATTCCCTCTG CTAGGAAGAA CACGTTCCAG ACTAAGGAAA AAAACCTTT  
3251 CAGGGCTTTC ATTACACTGT GCCATGCACT AATTTTATGT TTTCTTCATC  
3301 AGTTTCAGT GTCTGAATT CAGTGTCAA ATTCTAAGAC TACATATGAA

FIG. 4 Cont.

ES 2 332 882 T3

3351 TATCATTACK GTAACTCAGC AATTCTATGT TACCGTAAG TTTTCTGTA  
3401 GTTTLAALAA AAGGTGGAAG AAGAAAGCAC AGATAGTTA GCACATGGT  
3451 AAATTCAGTA ACTATTTCTG ATGAGCTTGG TGAAGATGCT GTCACCATG  
3501 CGACCACCAAG TCCTGTTCTC TGTGCTTCAG GATGTTCGTC GTGGGTCTGC  
3551 TTGGCCTCCT TGCAGCTCCT GGTTTGCTT ACGTAAGTCT CATTTCCTG  
3601 AAGTTCAATTG TCAAAACTGC ATTTACAGTG AAAATGTGATC TTAAGTCACC  
3651 CTCTGCTTCT TATGAAACATT AGACGGTCAA CATCAATGGT AATGATGGCA  
3701 ATGTAGACGG AAGTGGACAG CATTGGTGA GCATCAATGG TGTGCCAAC  
3751 GTGGCCATA TCGACACAA TAACGGCTGG GACTCCTGGA ATAGCCTCTG  
3801 GGACTATGAA AACGTATGTA ATGGACACAC AGGGTAAAGA TATGGTAG  
3851 CCACCAACCA TTAAAATTC TGAGGTGAAT TCTAGCTGTT CATGAAACATT  
3901 AAAAGCTACC AGTAAAAGTG CCCATTCCAC TCAAAACAAT TTTACTTTT  
3951 TGCATATAAT TATTGCTAAT AAGTATTACA CAATAGGTGCG AAATTCAAAG  
4001 GGATCAATRG TAAGGATAAA AACTATGTAC AAAGACAAAC ACAGCATCCT  
4051 TTGGTCTTCC CTGCAGAGAG TCTCCATGAT GTAAAGGTC CAATGTTTA  
4101 TGGAGGCTGA ATGAAATACG AATGCCTCTG TGATGGAAAA GGCCCAACAT  
4151 CTTATGGAGA ATGAGTGAAG TATGAATGCT ATTAGTTGTA AGAGAAGGCG  
4201 ATGCAAAGCA ACACCTGGCA CCACCTGCCA ATTACTACTT TCCTATTTAA  
4251 ATGTAGTTA AAAAGCAAAG CCTGTCTTCC CTGCCTCTG GAAACACTGC  
4301 GGATGGAGGT AGACCAAGGT ATGACAGCCT TTAAAAGTTT GTCAGCAAAA  
4351 CACTCCCCCA TAACACACATA CACACACCCCT CCTACTACAC TGGAACGTGAA

FIG. 4 Cont.

# ES 2 332 882 T3

4401 GCAAAGGCAG TGGGTTAGAT ATATCCACCC TCTAAGAGTT TGCAGGTCA  
4451 CTATATATGA TAGCCAGAGA CACAAGTCA GGACAGCCAG ACTCTGAGCA  
4501 CTCTCCCCAG CTCCTTGAG CTCGTGTTCA GTGGTGACTT GTGACAGAA  
4551 TCCTGGGGAA CCTGTGCCTC ACTGTTCTCT GTCTTCTTA ATAGAGTTTC  
4601 GCTGCCACGA GACTCTCTC CAGAAGTCA TGCATTGTGC ACAGAACATGAA  
4651 CAAGGATGCC ATGCCCTCCC TTCAAGGCCT CGATACATG GTCAAGGAAC  
4701 AGAAGGTAAA GTCCCTGCCTT CTTCTTGGA GTGACAGGAA GTCTTACAGT  
4751 CTCCAGTACA CAGTGAAGTC ACCCCCATTG CCTCTTGTT GGAGCATGAC  
4801 AGCATGTTG TCATGATAAA TGCCACAAAC ATGTAAAAT GTTCAGTGTC  
4851 TGCGTGAATG GAGGGTGGCT TCCACTGTGT CAGATGCCGT GGCCCACATC  
4901 TGCCTCTGCA GGGTCCHGTA AAGCAGCTGGC TATCTTGAGT GTCAGAGACC  
4951 CAAAGGTCTG TACACTTCAG TACAAGGCCT CCATATTCA AGGGCACACT  
5001 CCTACAGTCG TTGGGGTTAT CAGAACTAGC AAACATAGAG ACTGGATTTT  
5051 CAGATGAAAA GAAATCCTT TTAAAGTCTA AGTATGCCTT ATACAATGTT  
5101 TGAGATATTC TCAATACTAA AAAAAAAA ATTGTTGCTT GCTTGAAAT  
5151 CAAATGTAC CAAGTGTCTT ATATCCAGTG TCAATCATGG CTGTAGTAGA  
5201 TGGGAAGAGG GAGCCCGTGG TTTTCACAGT CAGACGCCTG AGTTATTCTT  
5251 CTAAGTGATA AATTGGTTCC TATAACAAGC AAGCCAGTGA ATATAAATAA  
5301 GCTCTATCTC AGAAGTTATC CTGTAAGTGC ACCCTAGAAT CTAAGAGAGC  
5351 AAAAGTGCTT CAAATTTCAG AATAAGTTTT GCTTTGGACT TCTGTTTTC  
5401 TAAACAACTA TAACTTCATA CCATCTAAGC CTCGTGGGAC ACTTAGAAAT  
5451 ACCAAGCCAT TCAAAAGCTAG AATTGTTCT TCACCTTACT TGAAACAAA

FIG. 4 Cont.

ES 2 332 882 T3

5501 ATGACAAACCA AAAATTGTCC CCACTGCCCT TGTACATCTT CAGATCAGTA  
5551 AAGTCCTGGG CTCAGGGATC ATTCACTTTC TTTCTTCCT TTCACACTCA  
5601 ACTTCAGGGT AAAGGGCCTG GAGGAGCTCC TCCCAGGAC TTGATGTACT  
5651 CCGTCACCCC TACCAGAGTG GAGGACCTGA ATACATTCGG ACCAAAGATT  
5701 GCTGGCATGT GCAGGGGCAT CCCTACCTAT GTGGCCGAGG AGATTCCAGG  
5751 TGTGTACCCCT GAGATGCTGT ATATCCCAAT GCAGTACTGA GAGAGCCATC  
5801 AGACACTCTA AAGTGTGACC ACAGACGGAC CAATCATGTG GATTATCAGA  
5851 GCAAACACTT GCTTGCTCCT TGTCAAGACAG TTGTCCATGC TTCAAAAGTT  
5901 CATTAAAAAA AATAGTTCAC AGGCTCCTCA CAGAAACCTT AGTAGAAATCC  
5951 ACAGCTTCTG CTCTTAGTCT TACTTTTAG AACTGAGAC CCAGAGAAAG  
6001 GTCHCAAAAC TTTTGTCTGG CTCAGGTTCT ATGTCTTTAA CTTTATAGAA  
6051 TACCGTCTTT CTGGGTGGGT GGGCTCTAGA GTAAACTTCA AGTGAGTTCA  
6101 AGGAAGCAT GAGAAGTAGG GAAGACCAAATGAAAGGAGA ATGCCAATGA  
6151 AATCTATCGA TTCTATAGCG CCAATGCTTA ACTCCTAGGC GTTCAAAGAA  
6201 TAGTATCCAC AAGGTGTCAG CCTAAGATCC TAATCTAACCA GCAAGTTTC  
6251 AGATCTCTGA AGTGAAAAGA GAAAGCAAGA GAGGAACAGA GACAGAAACA  
6301 GTAAGAGACA GAGAGGCAGA GACAAAGAGA CAGGGAGAAT AGAGAGGGAT  
6351 TAAATTTAAT ATATAGTTA GAAATTACGA CTCCTCACAG TCCCTGCAGA  
6401 GTCCTAGGAT AGGCACTGAT TTGGACTTCT TTTCTCTCA CTAGGACCAA  
6451 ACCAGCCTTT GTACTCAAG AAGTGCTACA CAGCTGACAT ACTCTGGATT  
6501 CTGGGGATGT CCTTCTGTGG AACATCAGTG GAGACATACT AGAAGTCACA  
6551 GGAAAACAAAC CCGTGGGCTC TGACCATCGC AATGCTTGAT TATGAGAGTG

FIG. 4 Cont.

# ES 2 332 882 T3

6601 TTCTCTGGGG GTTGTGATTA GCTTCTTAA GGCTCAATAA ACCCACGTGG  
6651 CAGCACATCC AGTTTGTAAT GACATGCCTC ATGACTTCTA TGGGAGTCCA  
6701 ATGTGGCACC TGCCAGCCTG TATTCAAGGAC CTCTCCGCTA TAAGCATCC  
6751 CTCCAGAGTT TTCAAACTACT ACAAAAGCACA GCCTGGGTTT GGGCTCAGAT  
6801 AGGCCACTGC TGCGTGAAC AATTACAGAC AAACAAGTTT TAAAAAGAAAG  
6851 AAAAAAGAGC TCAGAGTGGC TGGAAATCAGC AAGGGTGTTC TTCCTGCAAG  
6901 GAGCCAGAAG TATCAATAAT CACCCAGGA GGAGACACTG GGAATGAGAG  
6951 ACTAGAACAC ACACCTGCAG ATACGGAGAA CCTCAGCATT GCCGCTCTCT  
7001 CCCATAACTG CACACCCCT TCTGTAACT CTGCTTCTTT CTTTCACCTG  
7051 AAGATGGCCC TTGCTTTTT TTATTATAGG ACAAGATAAC TAGACCAGAA  
7101 AGTCACCTG ACTCTCTACA TTTATATGTC TTCCCCAGNTC AAGAAATATT  
7151 ATTTACTGGT GAATGGCACT TCTATATTCC CTTGGTTCAA TAAGTCTACA  
7201 GGATCCATTC ATTGACAGGC CAAGAGTGAG ATCACATGAT ACCCAAGCAC  
7251 ATGGGTCTTT CCTTGAAAGGA GAAGGATCCA

FIG. 4 Cont.

# ES 2 332 882 T3

1 ATGTTCGTCGTGGTCTGCTTGGCCTCCTSCAGCTCCTGGTTGCTTACACGGTCAAC  
61 ATCAATGGTATTGATGGCAATGTAGP CGGAAGTGGACAGCATTGGTGAGCATCAATGGT  
121 GTGCACAACGTGCCAATATCGACAAACAATAACGGCTGGGACTCCTGGAATAGCCTCTGG  
181 GACTATGAAAAACAGTTTCGCTGCCACGAGACTCTTCTCCAAAGPAGTCATGCATTGTGCAC  
241 AGAATGAAACAAGGATGCCATGCCCTCCCTCAGGACCTCGATAACATGGTCAAGGAACAG  
301 AAGGGTAAGGGCCTGGAGGAGCTCCCTCCAAGGACTTGATGTACTCCGTCAACCCCTACC  
361 AGAGTGGAGGACCTGAATACATTCGGACCAAAGATTGCTGGCATGTGCAGGGGCATCCCT  
441 ACCTATGTGGCCGAGGAGATTCCAGGACCAAACCGCCTTGTACTCAAAGAAGTGCTAC  
501 ACAGCTGACATACTCTGGATTCTGGGATGTCCTTGTGAAACATCAGTGGAGACATAAC  
561 TAG

FIG. 5

ES 2 332 882 T3

1 MKLTNEVVGL LGLLAAPGFA YTVNNGNDG NVDGSGQQSV SINGVHHVAH  
51 IDNNNGWDSW MSLWDYENSE AATRLFSKKS CIVHRMNUKDA MPSLQDLOTH  
101 VKEQKGKGPG GAPPKDLHYS VNPTTRVEDLN TFGPKIAGHC RGIFTYVAEE  
151 IPGPQNQPLYS KKCYTADILW ILRHSFCGTS VETY

FIG. 6

# ES 2 332 882 T3

1 atgcctgact tctcacttca ttgcatttgt gaagccaaga tgaagttcac  
51 aattgccttt gctggacttc ttgggtctt cctgactcct gcccttgctg  
101. actatagtat cagtgtcaac gacgacggca acagtggtgg aagtgggcag  
151 cagtcagtga gtgtcaacaa tgaacacaac gtggccaacg ttagacaataa  
201 caatggatgg aactccttgg a atgcctctg ggactataga actggctttg  
251 ctgttaaccag actcttcgag aagaagtcat gcattgtgca caaaatgaag  
301 aaggaaagcca tgcctccct tcaagccctt gatgegctgg tcaaggaaaa  
351 gaaycttcag ggttaagggucc cagggggacc acctcccaag agcctgaggt  
401. actcagtcaa ccccaacaga gtcgacaacc tggacaagtt tggaaaatcc  
451 atcggttgcca tgtgcaaggg gattccaaca tacatggctg aagagattca  
501 aggagcaaac ctgatttcgr actcagaaaa gtgcattcgt gccaataatac  
551 tctggattct taacatttcc ttctgtggag gaatacgcca gaactaa

FIG. 7

ES 2 332 882 T3

Fig.8

1 MKFTIAFAGL LGVFLTPALA DYSISVNDDG NSGGSGQQSV SVHNEHMVAN  
51 VDINNNGWNSW NALWDYRTGF AVTRLFEKKS CIVHJMKEA MPSLQALDAL  
101 VKEKKLQGKG PGGPPPKSLR YSVMPNRVDN LDKFGKSIVA MCKGIPTYMA  
151 EEIQGANLIS YSEKCISANI LWILNISFCG GIAEN

ES 2 332 882 T3

Ser humano	1	MKFTIVFAGLLGVFLAPALANYNINVNDNNNAGSGQQSVVNNEHNVAN	50
Cerdo	1	MKFTIAFAGLLGVFLTPALADYSISVNDDGNSGGSGQQSVVNNEHNVAN	50
	51	VDNNNGWDSWNSIWDYGNNGFAATRLFQKKTCIVHKMNKEVMPSIQSLDAL	100
	51	VDNNNGWNSWNALWSYRTGFAVTRLFRKKSCIVHMKKEAMPSLQALDAL	100
	101	VKEKKLQGKGPGGPPPGLMYSVNPNKVDDLSKFGKNIANMCRGIPTYMA	150
	101	VKEKKLQGKGPGGPPPSSLRYSVNPNRVDNLDFGKSIVAMCKGIPTYMA	150
	151	EEMQEASLFFYSGTCYTTSVLWIVDISFCGDTVEN 185	
	151	EEIQGANLISYSEKCISANILWILNISFCGGIAEN 185	

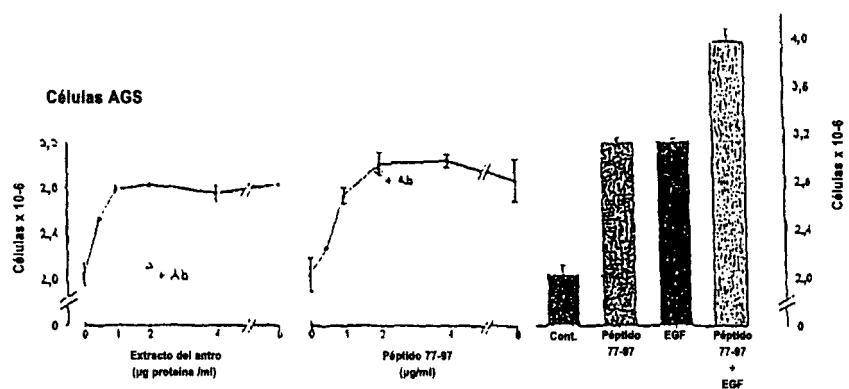
**FIG. 9**

ES 2 332 882 T3

	1	50
Ser humano	MKFTIVF.AG LLGVFLAPAL ANYNINVN.D DNNNAGSGQQ SVSVNNEHNV	
Cerdo	MKFTIAF.AG LLGVFLTPAL ADYSISVN.D DGNSGGSGQQ SVSVNNEHNV	
Ratón	MKLTM.FVVG LLGLLAAPGF A.YTVNINGN DGNVDGSGQQ SVSINGVHNV	
	51	100
Ser humano	ANVDNNNGWD SWNSIWDYGN GFAATRLFQK KTCIVHKMNK EVMPSIQSLD	
Cerdo	ANVDNNNGWN SWNALWDYRT GFAVTRLFEK KSCIVHKMKK EAMPSLQALD	
Ratón	ANIDNNNGWD SWNSLWDYEN SFAATRLFSK KSCIVHRMNK DAMPSLQDLD	
	101	150
Ser humano	ALVKEKKLQG KGPGGPPPKG LMYSVNPNKV DDLSKFGKNI ANMCRGIPTY	
Cerdo	ALVKEKKLQG KGPGGPPPKS LRYSVNPNRV DNLDKFGKSI VAMCKGIPTY	
Ratón	TMVKEQK..G KGPGGAPPKD LMYSVNPTRV EDLNTFGPKI AGMCRGIPTY	
	151	188
Ser humano	MAEEMQEASL FFYSGTCYTT SVLWIVDISF CGDTVEN	
Cerdo	MAEEIQGANL ISYSEKCISA NILWILNISF CGGIAEN	
Ratón	VAEEIPGPNQ PLYSKKYTA DILWILRMSF CGTSVETY	

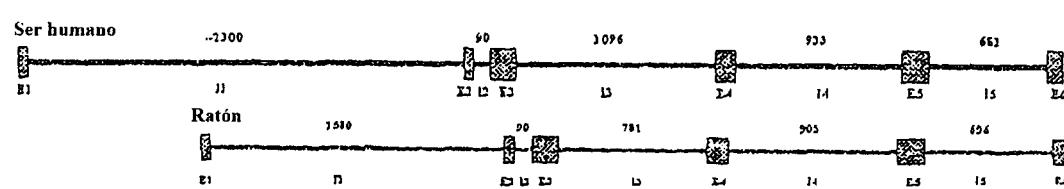
**FIG. 10**

# ES 2 332 882 T3



**FIG. 11**

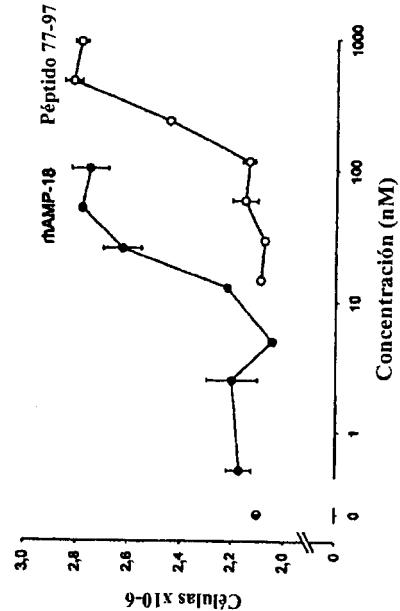
# ES 2 332 882 T3



**FIG. 12**

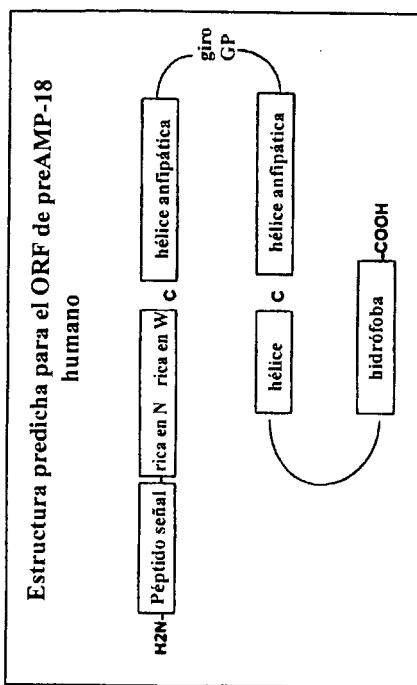
ES 2 332 882 T3

**FIG. 13**



mrgshhhhhgs      21 NYNIINVNDNNNAGSGQQSVSVNNEHNTAN  
 51 VDNNNNNGWDSWNSIWWDYGNQGFAATRLFQKRTCIVHKMNKEVMPMSIQSILDAL  
 101 VKEKKLQGKGPGGGPPPKGLMYSVNPNNPVDLSSKFGKNTIAMCRGIFTYMA  
 151 EEMQEASLFFYSGGTCYTTSVLWIVDISFCGDTVEN

FIG. 14

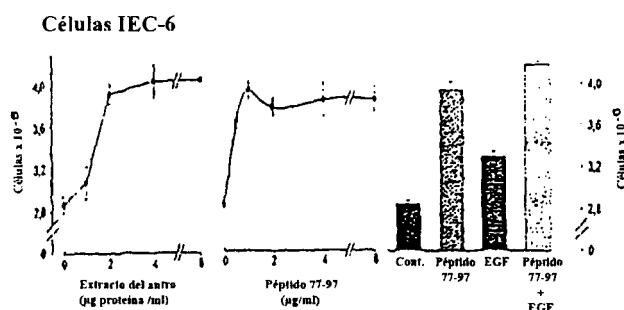


SER HUMANO 1	<b>MKPTIVPAGILGVFLAPALANYNINVDDNNRAGSGQOSVSVNNEHNVAN</b>	50
CERDO 1	<b>MKFTIAPAGILGVFLTPALADYSISVNDGNSGGSCQQSVVNNEHNVAN</b>	50
	.	.
51	<b>VDDNNGWDSWNSIWIDYGNNGFAATRLPQKXTCTVKMKKEVMPQSISLDAL</b>	100
	.	.
51	<b>VDDNNGWDSWNSIWIDYRTGFAVTRLFEKSCIVVERKKKEAMPSLQALDAL</b>	100
	.	.
101	<b>VKEKKLQGKGPGPPPKGLMISVAPAKVDDLSKPGKNNIANMCRGIPTIMA</b>	150
	.	.
101	<b>VKEKKLQGKGPGPPPKSLRYSVNPVRVDNLDKFGKSIVAMCKGIPTIMA</b>	150
	.	.
151	<b>EEMQEASLFFYSGTCYTTSVLWIVDISFCGDTVEN*</b>	186
	.	*
151	<b>EEIQGANLISYSEK CISANILWILNTISFCGGIAEN*</b>	186

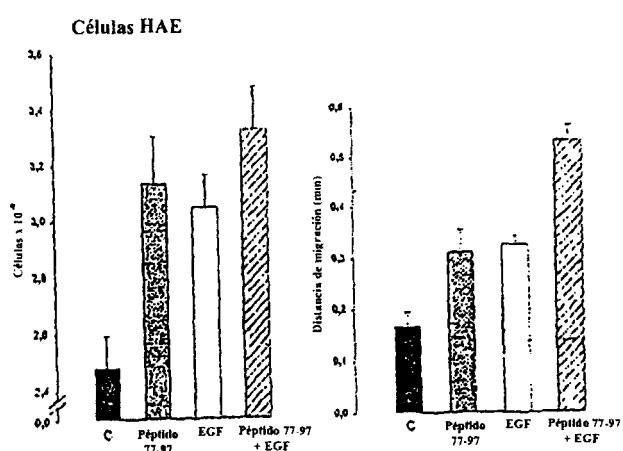
\* = terminación

ES 2 332 882 T3

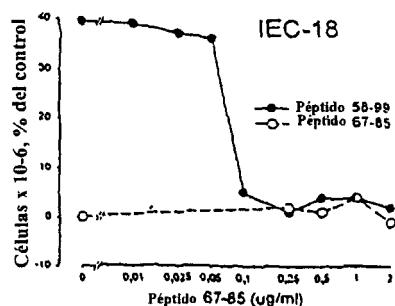
**FIG. 15**



**FIG. 16**

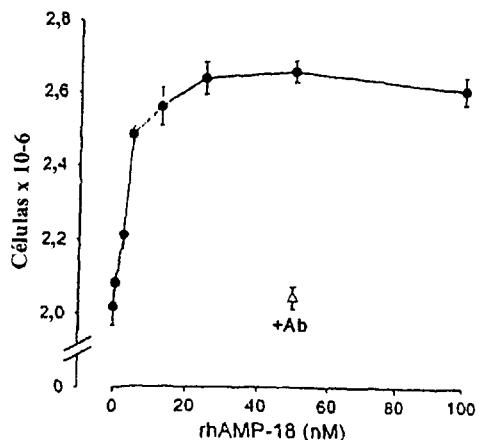


**FIG. 17**

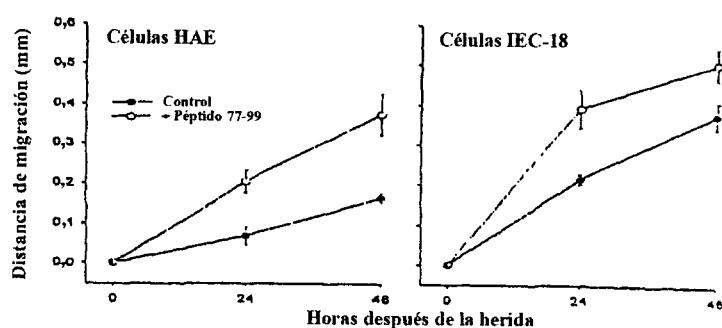


ES 2 332 882 T3

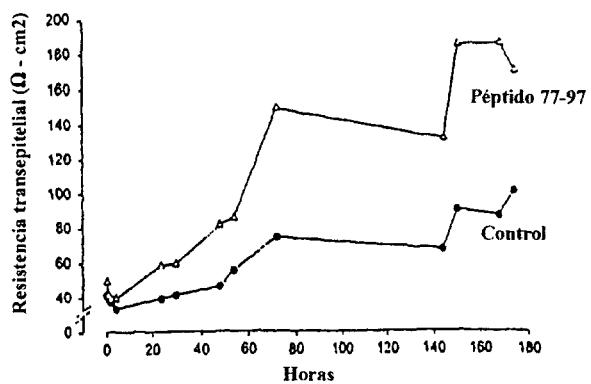
**FIG. 18**



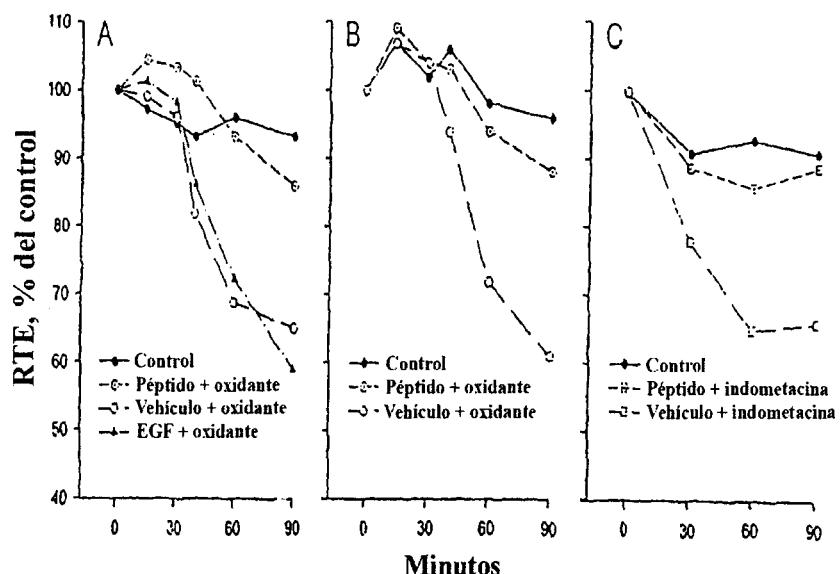
**FIG. 19**



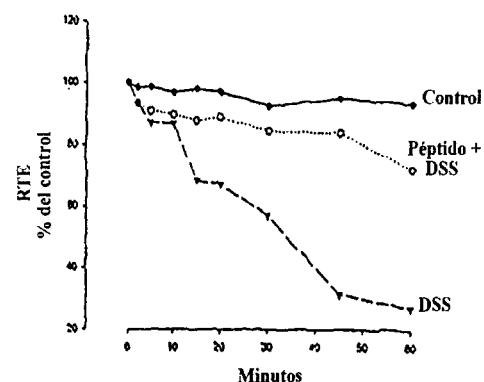
**FIG. 20**



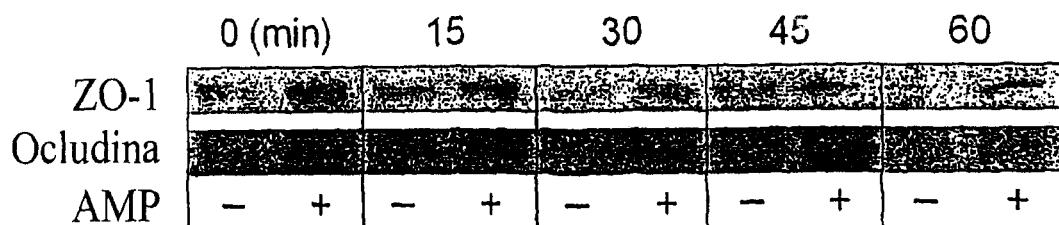
**FIG. 21**



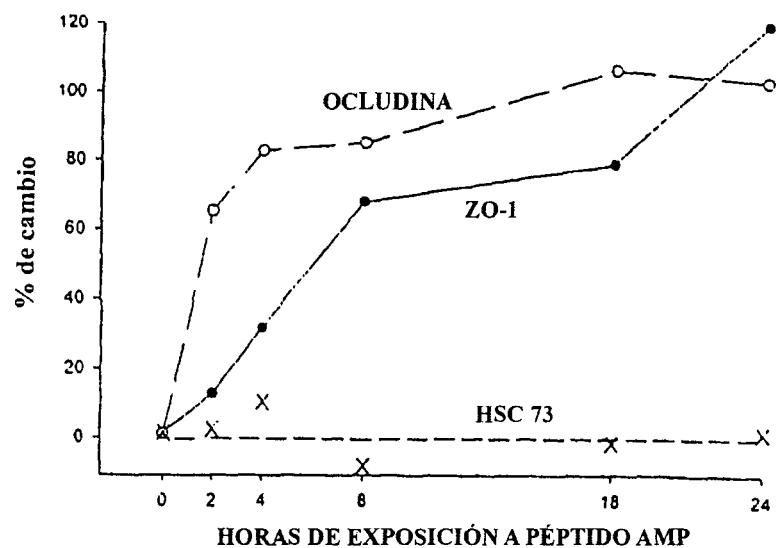
**FIG. 22**



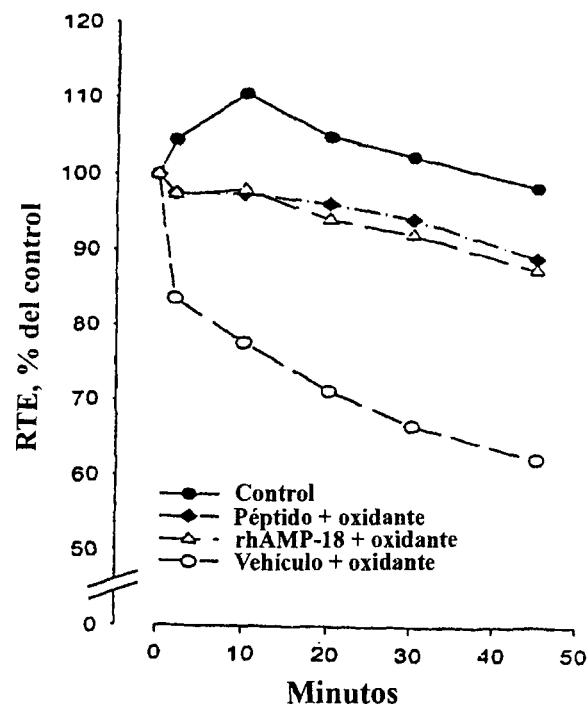
**FIG. 23**



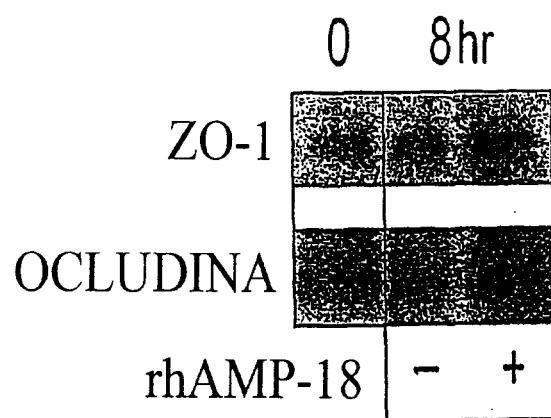
**FIG. 24**



**FIG. 25**



**FIG. 26**



**FIG. 27**

