



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 252**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03766674 .0**

96 Fecha de presentación : **31.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1526140**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio.**

30 Prioridad: **01.08.2002 JP 2002-225114**
26.06.2003 JP 2003-182989

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

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

72 Inventor/es: **Nozawa, Katsura y**
Mochizuki, Shinobu

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 314 252 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

Intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio útil en el rastreo de un agente para tratar una lesión celular debido a una reperfusión postisquémica y/o a una enfermedad inflamatoria.

10 **Antecedentes de la técnica**

Durante una isquemia, un órgano pasa de una fase reversible a la fase irreversible de la lesión celular. Se considera que es posible evitar una lesión si se realiza una reperfusión al órgano durante el proceso, pero los exámenes experimentales y clínicos señalan que la reperfusión *per se* vuelve a dañar el órgano. Esto se denomina lesión por reperfusión. Se sabe que tanto los radicales libres generados durante la reperfusión como el exceso de calcio intracelular (sobrecarga de calcio) debido a la reperfusión desempeñan un papel importante en la generación de las lesiones por reperfusión (referencias no de patente 1 y 2). Hay varias hipótesis propuestas sobre el mecanismo de sobrecarga de calcio, tal y como se exponen a continuación (referencia no de patente 3):

- 20 (1) Debido al fallo de un sistema de intercambio de calcio dependiente de la energía, el calcio fluye hacia el interior de las células según un gradiente de concentración del mismo.
- (2) Durante la isquemia, aumenta una concentración de iones de sodio intracelular y, por tanto, el calcio fluye hacia el interior de las células mediante un sistema de intercambio de sodio-calcio.
- 25 (3) Un aumento de la densidad del receptor α durante la isquemia promueve una sobrecarga de calcio tras la reperfusión.
- 30 (4) Debido a un fallo grave de una membrana celular, el calcio extracelular fluye hacia el interior de las células según un gradiente de concentración del mismo.

Además, se considera que en la muerte celular neuronal retardada que se produce durante la reperfusión postisquémica en el cerebro, se activa un receptor de glutamato, el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), se abre un canal de calcio activado por el NMDA y, por tanto, el calcio fluye hacia el interior de las células (referencia no de patente 4).

35 Tras una isquemia transitoria en un animal experimental, se observa en el cerebro, el corazón y el riñón el fenómeno del no reflujo (cuando se vuelve a hacer fluir un flujo sanguíneo, se genera una región en la que el flujo sanguíneo no es refluído tópicamente). Como mecanismos principales del fenómeno de no reflujo, se sugieren la hemorragia y la destrucción de la construcción microvascular (por ejemplo, el émbolo capilar por los leucocitos o el hinchamiento de células endoteliales vasculares), la trombosis plaquetaria o similares (referencia no de patente 5). Se observan, como las células que bloquean los microvasos de un foco de la oclusión arterial cerebral media, los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos o las plaquetas, además de los eritrocitos, y concretamente, se indica el émbolo capilar por neutrófilos clasificado dentro de los leucocitos como la causa del fenómeno del no reflujo (referencia no de patente 5). Al pasar a través de los microvasos, los leucocitos polimorfonucleares retrasan un flujo de eritrocitos. Además, 45 durante la isquemia del cerebro, los leucocitos polimorfonucleares interactúan con las células endoteliales vasculares o las plaquetas, aumentándose las expresiones de los receptores de adhesión en las superficies de los leucocitos polinucleares. Además, los anticuerpos monoclonales frente a factores de adhesión tales como L-selección, CD11, CD18 o ICAM-1 atenuaron la acumulación de leucocitos y redujeron la superficie de la infracción, sugiriendo así que la expresión de los factores de adhesión desempeña un papel importante en la acumulación de leucocitos durante la reperfusión postisquémica (referencias no de patente 6 y 7). Además, se ha informado que la expresión de los factores de adhesión en leucocitos se aumenta mediante el aumento de una concentración de calcio intracelular (referencia no de patente 8).

55 Se conocen numerosos canales iónicos que controlan un medio iónico intracelular. Como aquéllos que desempeñan un papel particularmente importante en la lesión por reperfusión postisquémica, se conocen, por ejemplo, un intercambiador de sodio-hidrógeno y un intercambiador de sodio-calcio. Durante el proceso de lesión por reperfusión postisquémica, hay dos etapas en el paso de la isquemia a la reperfusión. Una es la isquemia y la otra es la reperfusión. Durante la isquemia, no se suministra sangre y se produce una condición anaeróbica, y así se genera un agotamiento de la energía, una promoción del metabolismo anaeróbico, una acumulación de los metabolitos dañados y similares, 60 produciéndose como resultado una acidosis. Durante la reperfusión, se suministra oxígeno, y así se atenúa la acidosis, junto con un suministro de energía, un reinicio del metabolismo aeróbico y una eliminación de los metabolitos acumulados, para volver a las condiciones fisiológicas. Sin embargo, como la lesión avanza rápidamente durante la reperfusión, parece que las condiciones neutralizadas por la reperfusión son peores que las de la acidosis provocada por la isquemia. Se sabe que el intercambiador de sodio-hidrógeno y el intercambiador de sodio-calcio están implicados 65 en este fenómeno (referencia no de patente 9).

Se sabe que el intercambiador de sodio-hidrógeno existe sobre la membrana celular, que está implicado en un control del pH intracelular y que tiene la actividad de extrudir los iones de hidrógeno fuera de la célula conforme a un

gradiente de concentración durante la acidosis, y simultáneamente, la de incorporar iones de sodio a la célula. Se ha informado que el mecanismo en el que se suprimen la expresión y la actividad del intercambiador de sodio-hidrógeno durante el pre-acondicionamiento isquémico está implicado en una acción protectora (referencia no de patente 10). Es más, se ha informado que la activación del intercambiador de sodio-hidrógeno activa los neutrófilos y promueve la adhesión de los neutrófilos mediante la expresión de CD11, CD18 o ICAM-1 (referencia no de patente 11).

Hay dos tipos de reacciones del intercambiador de sodio-calcio, i.e., la reacción de intercambio de sodio-calcio clásica y la reacción de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio (referencias no de patente 12 y 13). Se considera que los intercambiadores de sodio-calcio existen en todos los tejidos. La función fisiológica es una extrusión del calcio intracelular fuera de la célula acompañada por un influjo de sodio extracelular. Además, se ha comunicado que la reacción inversa en la que el sodio intracelular es extrudido y el calcio fluye hacia el interior de la célula puede ocurrir fisiológicamente.

Según un informe sobre la dinámica iónica durante la lesión por reperusión postisquémica, no se suministra oxígeno y se promueve el metabolismo anaeróbico durante la isquemia, agotándose así el sustrato (ATP) de energía y avanzando la acidosis. Es decir, los iones de sodio no son extrudidos hacia fuera de la célula debido a la desactivación de las bombas de sodio, y los iones de sodio fluyen hacia el interior de la célula mediante la extrusión gradual de iones de hidrógeno fuera de la célula por medio del intercambiador de sodio-hidrógeno para un ajuste de la acidosis. La acumulación de iones de sodio intracelular da como resultado un aumento de los iones de calcio intracelular por medio del intercambiador de sodio-calcio. Además, debido a que el pH de alrededor de los tejidos se neutraliza rápidamente durante la reperusión, aumenta un gradiente de concentración entre los iones de hidrógeno intracelular acumulados por el metabolismo anaeróbico y los iones de hidrógeno disminuidos alrededor de los mismos. Además, se activa el intercambiador de sodio-hidrógeno y luego se extruden hacia fuera de la célula los iones de hidrógeno, fluyendo los iones de sodio rápidamente hacia el interior de la célula. Tras el rápido influjo de los iones de sodio, se activa el intercambiador de sodio-calcio y entonces se extruden hacia fuera de la célula los iones de sodio, y los iones de calcio son transportados hacia el interior de la célula. Es decir, la concentración de calcio intracelular aumenta rápidamente para convertirse en una sobrecarga de calcio. Este rápido aumento del pH y del influjo de calcio hacia el interior de la célula se considera como un desencadenante de las acciones perjudiciales que se producen durante la reperusión postisquémica (referencia no de patente 9). Como se describe anteriormente, la activación del intercambiador de sodio-hidrógeno como la primera etapa y la activación del intercambiador de sodio-calcio como la segunda etapa desempeñan un importante papel en una etapa relativamente temprana de la lesión por reperusión postisquémica.

En relación con el aumento de concentración del calcio intracelular en los leucocitos durante la reperusión postisquémica, se sabe que el influjo de calcio hacia el interior de las células es importante en el proceso de activación de los neutrófilos causado por los factores de movilización de leucocitos tales como la formilmetionil-leucilil-fenilalanina (fMLP), el ácido araquidónico o el leucotorieno B4, y que la activación de los neutrófilos es inhibida por la supresión del influjo (referencia no de patente 14). Además, se ha informado que el pH intracelular se ve aumentado por el tratamiento con fMLP y que los inhibidores del intercambiador de sodio-hidrógeno suprimen el aumento del pH intracelular y la migración leucocitaria (referencia no de patente 15).

Sin embargo, no se sabe si la inhibición del intercambiador de sodio-calcio en los leucocitos suprime la activación de los leucocitos, y hasta el momento, no se ha identificado ningún intercambiador de sodio-calcio que desencadene la activación leucocitaria que causa la lesión por reperusión y/o inflamación.

La referencia de patente 1 revela una secuencia constituida por 603 aminoácidos como la de un intercambiador de sodio-calcio humano. La referencia no de patente 16 revela una secuencia del gen de intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio NCKX3 que codifica 644 aminoácidos y es más abundante en el cerebro, con niveles más elevados en el núcleo talámico, las neuronas CA1 del hipocampo y la capa IV de la corteza cerebral. La referencia de patente 2 revela una secuencia de una proteína de diagnóstico humana constituida por 480 aminoácidos. La referencia de patente 3 revela secuencias de proteínas secretoras humanas constituidas por 235 y 169 aminoácidos.

La referencia no de patente 17 se dirige a la secuencia codificante completa del ARNm del intercambiador de Na/Ca dependiente del K de *Homo sapiens* NCKX4 (SLC24A4).

(Referencia no de patente 1): "Circulation", (EE.UU.), 1990, 82, p. 723-738.

(Referencia no de patente 2): "Annual Review of Physiology", (EE.UU.), 1992, 54, p. 243-256.

(Referencia no de patente 3): "Kokyu To Junkan", 2001, 49(1), p. 5-11.

(Referencia no de patente 4): "CLINICAL NEUROSCIENCE", (EE.UU.), 1999, 17(5), p. 567-569.

(Referencia no de patente 5): "Kokyu To Junkan", 2001, 49(1), p. 13-20

(Referencia no de patente 6): "Circulation", (EE.UU.), 1993, 88, p. 649-658.

(Referencia no de patente 7): "American Journal of Pathology", (EE.UU.), 1993, 143, p. 410-418.

- (Referencia no de patente 8): "Cell Adhesion & Communication", (Suiza), 1993, 1, p. 21-32.
- (Referencia no de patente 9): Yasuo Morishita *et al.*, "Zoki no Kyoketsu-saikanyu-shogai - Kiso to Rinsyo" ("Reperfusion Injury"), SHINDAN-TO-CHIRYOSHA, 2002, p. 1-225.
- (Referencia no de patente 10): "Circulation Research", (EE.UU.), 1999, 85, p. 723-730.
- (Referencia no de patente 11): "Journal of Cardiovascular Pharmacology", (EE.UU.), 2001, 37, p. 668-677.
- (Referencia no de patente 12): "Tanpakushitsu Kakusan Koso", 1998, 43(12), p. 1555-1560.
- (Referencia no de patente 13): "Journal of Biological Chemistry", (EE.UU.), 1993, 268, P. 6874-6877.
- (Referencia no de patente 14): "Biochemical & Biophysical Research Communications" J, (EE.UU.), 1981, 103, p. 227-232.
- (Referencia no de patente 15): "British Journal of Pharmacology", (Reino Unido), 1998, 124, p. 627-638.
- (Referencia no de patente 16): "Journal of Biological Chemistry", (EE.UU.), 2001, 276, p. 23161.
- (Referencia no de patente 17): BASE DE DATOS EMBL del 8 de julio de 2002 (08-07-2002). Secuencia codificante completa del "ARNm del intercambiador de Na/Ca dependiente del K NCKX4 (SLC24A4) de *Homo Sapiens*; CD completos; cortada y empalmada alternativamente". N.º de acceso de la base de datos AF520704.
- (Referencia de patente 1): WO 02/26980
- (Referencia de patente 2): WO 01/75067
- (Referencia de patente 3): WO 00/43495

Revelación de la invención

Según lo descrito en el apartado de "Antecedentes de la técnica" con respecto a la activación leucocitaria, la reperfusión postisquémica y la inflamación tienen aspectos comunes, tales como un aumento del pH intracelular en los leucocitos y la activación del intercambiador de sodio-hidrógeno mediante el mismo, así como un aumento de la concentración del calcio intracelular mediante lo anterior. Se considera que el intercambiador de sodio-calcio de los leucocitos está implicado en la activación leucocitaria durante la lesión por reperfusión postisquémica y la inflamación. Es decir, se considera que una inhibición de la activación del intercambiador de sodio-calcio de los leucocitos suprime el aumento de la concentración de calcio intracelular de los leucocitos e inhibe la activación leucocitaria.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio en los leucocitos, y un nuevo polinucleótido codificante del polipéptido, y además en proporcionar un sistema de rastreo conveniente para obtener una sustancia útil como agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica o una enfermedad inflamatoria, del que se consigue el efecto terapéutico inhibiendo una activación de los leucocitos.

Los presentes inventores llevaron a cabo intensos estudios y, como resultado, obtuvieron polinucleótidos codificantes de intercambiadores de sodio-calcio dependientes del potasio constituidos por secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente, y expresados abundantemente en los leucocitos; prepararon células que expresaban cada polipéptido; y proporcionaron herramientas de rastreo para obtener una sustancia útil como inhibidor de los intercambiadores de sodio-calcio, es decir, un agente terapéutico para lesión por reperfusión postisquémica o una enfermedad inflamatoria. Además, los presentes inventores construyeron sistemas para detectar la actividad de intercambio de sodio-calcio usando las células que expresaban cada intercambiador de sodio-calcio; y proporcionaron un procedimiento para rastrear una sustancia útil como agente terapéutico para la lesión por reperfusión postisquémica y una enfermedad inflamatoria en base a la inhibición de la actividad anterior. Además, los presentes inventores obtuvieron inhibidores de los intercambiadores de sodio-calcio mediante el anterior procedimiento de rastreo; confirmaron que los inhibidores inhibían la migración de leucocitos polimorfonucleares periféricos humanos, es decir, la activación de leucocitos; y proporcionaron nuevos agentes terapéuticos para la lesión por reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que contenían cada inhibidor de la activación leucocitaria; completándose así la presente invención.

La presente invención se refiere a:

[1] (1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido

ES 2 314 252 T3

por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;

[2] el polipéptido de [1], que es (a) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

[3] el polipéptido de [1] o [2], en el que la actividad de intercambio de sodio-calcio es una actividad de intercambio de sodio-calcio inversa;

[4] un polinucleótido codificante del polipéptido de [1] a [3];

[5] un vector de expresión que comprende el polinucleótido de [4];

[6] una célula transfectada con el vector de expresión de [5];

[7] un procedimiento para producir el polipéptido de [1] a [3], caracterizado por usar la célula de [6];

[8] un procedimiento para rastrear un inhibidor del polipéptido de [1] a [3], que comprende las etapas de:

- (1) poner en contacto una célula que expresa el polipéptido con una sustancia por ser analizada,
- (2) analizar si se inhibe o no la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido, y
- (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido;

[9] un procedimiento para rastrear un inhibidor de la activación leucocitaria que comprende las etapas de:

- (1) poner en contacto una célula que expresa el polipéptido de [1] a [3] con una sustancia por ser analizada,
- (2) analizar si se inhibe o no la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido, y
- (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido;

[10] un procedimiento para rastrear un agente terapéutico para la lesión por reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:

- (1) poner en contacto una célula que expresa el polipéptido de [1] a [3] con una sustancia por ser analizada,
- (2) analizar si se inhibe o no la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido, y
- (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido;

[11] un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar la lesión por reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:

- (1) poner en contacto una célula que expresa el polipéptido de [1] a [3] con una sustancia por ser analizada,
- (2) analizar si se inhibe o no la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido, y
- (3) preparar un medicamento que contenga la sustancia;

[12] una composición farmacéutica para inhibir la activación leucocitaria que comprende como ingrediente activo una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8];

[13] una composición farmacéutica para tratar una lesión por reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que comprende como ingrediente activo una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8];

[14] un procedimiento para inhibir la activación leucocitaria que comprende las etapas de:

administrar a un sujeto una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8];

5 [15] un procedimiento para tratar una lesión por reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:

administrar a un sujeto una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8];

10 [16] uso de una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8], en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir la actividad leucocitaria; y

[17] uso de una sustancia obtenible mediante el procedimiento de [8], en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una lesión por reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

15

La presente invención incluye el uso de la célula que expresa el polipéptido de [1] a [3] en el rastreo de un inhibidor de la activación leucocitaria o de un agente terapéutico para la lesión por reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

20

El término “agente terapéutico para una lesión por reperfusión postisquémica” o “composición farmacéutica para tratar una lesión por reperfusión postisquémica”, como se usa en la presente memoria, incluye tanto un agente o una composición farmacéutica usados para tratar a un paciente que padece una lesión por reperfusión postisquémica como aquéllos usados con carácter preventivo para un sujeto que tenga el riesgo de padecer una lesión por reperfusión postisquémica. El término “agente terapéutico para una enfermedad inflamatoria” o “composición farmacéutica para tratar una enfermedad inflamatoria”, como se usa en la presente memoria, incluye tanto un agente o una composición farmacéutica usados para tratar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria como aquéllos usados con carácter preventivo para un sujeto que tenga el riesgo de padecer una enfermedad inflamatoria.

25

30 El documento WO 02/26980 revela una secuencia de aminoácidos idéntica a la constituida por 603 aminoácidos de SEQ ID NO:4 de la presente solicitud, pero no revela que se obtuviera realmente un polipéptido constituido por la anterior secuencia de aminoácidos o un polipéptido codificante del polipéptido, ni tampoco revela un procedimiento específico para obtener el mismo. Por lo tanto, el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y el polinucleótido codificante del polipéptido fueron proporcionados por primera vez por los presentes inventores.

35

Además, el documento WO 01/75067 revela una proteína de diagnóstico humana (480 aminoácidos) en la que la secuencia de aminoácidos constituida por el tramo del aminoácido 35 al 480 de la misma tiene una homología del 82% con aquella constituida por el tramo del aminoácido 257 al 622 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de la presente solicitud, y tiene una homología del 77% con aquella constituida por el tramo del aminoácido 257 al 603 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 de la presente solicitud. El documento WO 00/43495 revela una proteína secretora humana (235 aminoácidos) y una proteína secretora humana (169 aminoácidos) en las que las secuencias de aminoácidos constituidas por los tramos del aminoácido 33 al 235 y del 1 al 169 tienen una homología del 86% y del 97% con aquellas constituidas por los tramos del aminoácido del 400 al 603 y del 435 al 603 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 de la presente solicitud, respectivamente. *J. Biol. Chem.*, 276, 23161, 2001 revela NCKX3 (644 aminoácidos) en la que la secuencia de aminoácidos constituida por el tramo del aminoácido 17 al 641 de la misma tiene una homología del 58% con aquella constituida por el tramo del aminoácido del 13 al 618 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de la presente solicitud y tiene una homología del 58% con aquella constituida por el tramo del aminoácido del 13 al 599 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 de la presente solicitud. Sin embargo, para obtener un polipéptido útil en el rastreo de un agente terapéutico de la lesión celular debida a la reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria, no hay referencias que sugieran una obtención del polipéptido de la presente invención. Además, el polipéptido de la presente invención tiene un efecto ventajoso que no se puede esperar de los anteriores polipéptidos conocidos, es decir, una utilidad como herramienta de rastreo para obtener un inhibidor de la activación leucocitaria (particularmente, un agente terapéutico para la lesión celular debida a la reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria).

50

55

Mejor modo de llevar a cabo la invención

60

De aquí en adelante, se explicará la presente invención detalladamente.

1. Polipéptido, polinucleótido, vector de expresión y célula de la presente invención

65

El polipéptido de la presente invención y/o usado en la presente invención incluye:

(1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4; y

- (2) un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados, y/o añadidos a una o más partes de la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ó 4, y que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio (preferiblemente, una actividad de intercambio de sodio-calcio inversa) (denominada de aquí en adelante variación funcionalmente equivalente). Se prefiere como polipéptido de la presente invención y/o como el usado en la presente invención, el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4.

El término “que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio”, como se usa en la presente memoria, significa que presenta una reacción de intercambio en la que el sodio intracelular es extrudido hacia fuera de la célula y el calcio extracelular fluye hacia el interior de la célula (sentido inverso), o que presenta una reacción de intercambio en la que el calcio intracelular es extrudido hacia fuera de la célula y el sodio extracelular fluye hacia el interior de la célula (sentido directo). Además, el término “que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio inversa”, como se usa en la presente memoria, significa que presenta una reacción de intercambio en la que el sodio intracelular es extrudido hacia fuera de la célula y el calcio extracelular fluye hacia el interior de la célula (intercambio de Na^+ - Ca^{2+} ; sentido inverso). El término “que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio directa”, como se usa en la presente memoria, significa que presenta una reacción de intercambio en la que el calcio intracelular es extrudido hacia fuera de la célula y el sodio extracelular fluye hacia el interior de la célula (intercambio de Na^+ - Ca^{2+} ; sentido directo).

El hecho de si un polipéptido (denominado de aquí en adelante polipéptido de análisis) “presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio” se puede confirmar mediante un procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica (Iwamoto T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 22391-22397; 19962). El procedimiento de confirmación no se especifica particularmente, pudiéndose usar, por ejemplo, el siguiente procedimiento.

Se transfectan células con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante del polipéptido de análisis. En el caso de confirmar la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa, se puede usar preferiblemente un procedimiento descrito en el ejemplo 4. Más concretamente, se tratan las células resultantes con un ionóforo (tal como monensina) contra un catión univalente para incorporar el sodio en las células; se cambia la solución extracelular a una solución que contiene ^{45}Ca , para intercambiar el sodio intracelular por el calcio extracelular; y se mide una radiactividad del ^{45}Ca intracelular. En el caso de confirmar la actividad de intercambio de sodio-calcio directa, se cultivan las células resultantes en un medio que contiene cloruro de calcio (cloruro de ^{45}Ca) para incorporar los iones de calcio a las células; se lavan las células con una solución de lavado para eliminar los iones de calcio no incorporados; se cambia la solución extracelular por una solución extracelular para medir el contenido de iones de sodio; y se mide una radiactividad de ^{45}Ca contenida en la solución. Cuando se detecta la radiactividad, se puede confirmar que el polipéptido de análisis “muestra una actividad de intercambio de sodio-calcio”.

Como polipéptido de la presente invención, se prefiere un polipéptido en el que se detecte una radiactividad de dos o más veces mayor que la obtenida en el caso de una solución extracelular que contiene 150 mmoles/l de NaCl cuando se usa el procedimiento del ejemplo 4.

Es posible confirmar si la actividad de intercambio de sodio-calcio del compuesto de análisis es “dependiente del potasio” mediante un procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica (Kimura, M., *J. Biol. Chem.*, 268, p. 6874-6877, 1993; Kraev A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 23161-23172, 2001). El procedimiento de confirmación no se especifica particularmente, pudiéndose usar, por ejemplo, el siguiente procedimiento (preferiblemente, un procedimiento descrito en el ejemplo 4). Más concretamente, se transfectan células con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante del polipéptido de análisis. Al medir la actividad de intercambio de sodio-calcio de las células resultantes, se varía una concentración de K^+ en la solución extracelular, y se mide una radiactividad del ^{45}Ca intracelular en cada concentración de K^+ . Cuando se detecta una actividad de intercambio de sodio-calcio mayor en presencia de K^+ , se puede confirmar que la actividad de intercambio de sodio-calcio del compuesto de análisis es “dependiente del potasio”.

Como polipéptido de la presente invención, se prefiere un polipéptido en el que se detecte una radiactividad de cinco o más veces mayor que la obtenida en el caso de la solución extracelular A descrita en el ejemplo 4 cuando se usa la solución extracelular C o D descritas en el ejemplo 4.

Los polipéptidos constituidos por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, que están incluidos en el polipéptido de la presente invención o el usado en la presente invención, son intercambiadores humanos de sodio-calcio dependientes del potasio constituidos por 622 y 603 residuos de aminoácido, respectivamente. Cada polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ó 4 se expresa en leucocitos periféricos, como se muestra en el ejemplo 2.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención no está particularmente especificada, siempre y cuando sea un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos, preferiblemente, de 1 a 3 aminoácidos en total estén sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias posiciones (por ejemplo, de 1 a 3 posiciones) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4, y presente una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio. Además, el origen de la variación funcionalmente equivalente no se limita a un ser humano.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención incluye, por ejemplo, no sólo variaciones humanas del polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4, sino además variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos a un ser humano (tales como un ratón, un hámster o un perro). Además, incluye polipéptidos preparados usando polinucleótidos obtenidos mediante la modificación artificial de sus secuencias de aminoácidos codificadas por el mismo mediante técnicas de ingeniería genética, en base a los polinucleótidos codificantes de estos polipéptidos nativos (i.e., variaciones humanas o variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos al ser humano), o en base a polinucleótidos codificantes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4. El término “variación”, como se usa en la presente memoria, significa una diferencia individual entre los mismos polipéptidos de la misma especie o una diferencia entre polipéptidos homólogos de varias especies.

La variación funcionalmente equivalente derivada de un ser humano o de organismos distintos a un ser humano se puede obtener por aquéllos expertos en la técnica según la información de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 ó 3 (por ejemplo, la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1882 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, o la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1825 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3). Por ejemplo, se diseña una sonda apropiada o cebadores apropiados según la información de la secuencia de bases. Se lleva a cabo un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R. k., *et al.*, *Science*, 239, 487-491, 1988) o un procedimiento de hibridación usando una muestra (por ejemplo, ARN total o una fracción de ARNm, una genoteca de ADNc o una genoteca de fagos) preparada a partir de un organismo (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano, un ratón, un hámster o un perro) de interés y los cebadores o la sonda para obtener un polinucleótido codificante del polipéptido. Se puede obtener un polipéptido deseado expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado, y luego, por ejemplo, confirmando que el polipéptido expresado presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio mediante un procedimiento descrito en el ejemplo 4, y además confirmando que la actividad es dependiente de un ión de potasio mediante un procedimiento descrito en el ejemplo 4. A este respecto, se pueden desarrollar técnicas de ingeniería genética según procedimientos conocidos (por ejemplo, Maniatis T. *et al.*, “Molecular Cloning- A laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982), a no ser que se especifique otra cosa.

Además, es posible obtener el polipéptido modificado artificialmente anterior usando un polinucleótido modificado artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética mediante, por ejemplo, el siguiente procedimiento. Con un procedimiento convencional tal como una mutagénesis específica del sitio (Mark, D. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81, 5662-5666, 1984), se puede obtener un polinucleótido codificante del polipéptido. Es posible obtener un polipéptido deseado expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado y luego, por ejemplo, confirmando que el polipéptido expresado presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio mediante un procedimiento descrito en el ejemplo 4, y confirmando además que la actividad es dependiente de un ión de potasio mediante un procedimiento descrito en el ejemplo 4.

El polinucleótido de la presente invención no está particularmente especificado, siempre y cuando codifique el polipéptido de la presente invención. Como polinucleótido de la presente invención o usado en la presente invención, cabe mencionar, por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1882 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, o la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1825 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3. En cuanto a esto, el término “polinucleótido”, como se usa en la presente memoria, incluye tanto ADN como ARN.

No se especifica particularmente ningún procedimiento para producir el polinucleótido de la presente invención, pero cabe mencionar, por ejemplo, (1) un procedimiento que use la PCR, (2) un procedimiento que use técnicas convencionales de ingeniería genética (i.e., un procedimiento para seleccionar un transformante que comprenda un ADNc deseado de cepas transformadas con una genoteca de ADNc) o (3) un procedimiento de síntesis química, según lo descrito en el documento WO 02/052000. Estos procedimientos se explicarán por este orden en lo que sigue.

En el procedimiento que usa la PCR, se puede producir el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

Se extrae ARNm de células humanas o de tejido humano capaz de producir el polipéptido de la presente invención. Se sintetiza un par de cebadores, entre los que se localiza ARNm de longitud completa correspondiente al polipéptido de la presente invención o una región parcial del ARNm en base a la secuencia de bases de un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención. El ADNc de longitud completa codificante del polipéptido de la presente invención o una parte del ADNc se puede obtener realizando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), usando ARNm extraído como molde. Además, se puede obtener un fragmento de ADN deseado digiriendo el ADN obtenido con una enzima de restricción o similar y realizando la unión, si se desea.

En el procedimiento que usa técnicas de ingeniería genética convencionales, se puede producir el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento.

Primero, se sintetiza ADNc monocatenario usando transcriptasa inversa de ARNm preparado mediante el procedimiento de PCR anteriormente mencionado como molde, y luego se sintetiza ADNc bicatenario procedente del ADNc monocatenario.

A continuación, se prepara un plásmido recombinante que comprende el ADNc bicatenario y se introduce en una cepa de *Escherichia coli*, tal como DH 5 α , mediante lo cual se transforma la cepa. Se selecciona un transformante usando una resistencia farmacológica frente a, por ejemplo, tetraciclina o ampicilina como marcador. Como procedimiento para seleccionar un transformante que contiene el ADNc de interés de entre los transformantes resultantes, se pueden usar diversos procedimientos, tales como un procedimiento para rastrear un transformante usando una sonda de oligonucleótido sintética o un procedimiento para rastrear un transformante usando una sonda producida por PCR.

Se puede llevar a cabo un procedimiento para recoger el polinucleótido de la presente invención a partir del transformante resultante de interés según un procedimiento conocido (por ejemplo, Maniatis, T. *et al.*, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982). Por ejemplo, se puede llevar a cabo separando una fracción correspondiente al ADN plasmídico de células y cortando la región de ADNc del ADN plasmídico.

En el procedimiento de síntesis química, se puede producir el polinucleótido de la presente invención, mediante, por ejemplo la unión de fragmentos de ADN producidos mediante un procedimiento de síntesis química. Cada fragmento de ADN se puede sintetizar usando un sintetizador de ADN [por ejemplo, Sintetizador de ADN Oligo 1000M (Beckman) o Sintetizador de ADN/ARN 394 (Applied Biosystems)].

A este respecto, se conocen codones de cada aminoácido, y se pueden seleccionar opcionalmente y determinar mediante el procedimiento convencional, por ejemplo, teniendo en consideración el uso de un codón de cada huésped por ser usado (Crantham, R. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9, r43-r74, 1981). Además, se puede llevar a cabo una modificación parcial de los codones de estas secuencias de bases según un procedimiento convencional, tal como la mutagénesis específica de sitio usando un cebador que comprenda un oligonucleótido sintético codificante de una modificación deseada (Mark, D. F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81, 5662-5666, 1984).

La determinación de las secuencias de ADN obtenidas mediante los procedimientos anteriormente mencionados se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, un procedimiento de terminación de cadenas de didesoxinucleótidos (Messing, J. y Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276, 1982). Por ejemplo, se incorporan didesoxinucleótidos marcados con fluorescente en un fragmento de ADN mediante un procedimiento de PCR, usando una solución de reacción que contiene didesoxinucleótidos marcados con fluorescente. Se somete a electroforesis el fragmento de ADN amplificado en un secuenciador (por ejemplo, secuenciador 3700DNA; PE Biosystems) y se puede determinar la secuencia de bases del mismo mediante la detección de la fluorescencia.

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

El vector de expresión de la presente invención no está particularmente especificado, siempre y cuando comprenda el polinucleótido de la presente invención. Como vector de expresión, cabe mencionar, por ejemplo, un vector de expresión obtenido mediante la introducción del polinucleótido de la invención en un vector de expresión conocido seleccionado apropiadamente según una célula huésped por usar.

La célula de la presente invención no está particularmente especificada, siempre y cuando esté transfectada con el vector de expresión de la presente invención y comprenda el polinucleótido de la presente invención. La célula de la presente invención puede ser, por ejemplo, una célula en la que esté integrado el polinucleótido en un cromosoma de una célula huésped o una célula que contenga el polinucleótido como vector de expresión que comprenda el polinucleótido. Además, la célula de la presente invención puede ser una célula que exprese el polipéptido de la presente invención, o una célula que no exprese el polipéptido de la presente invención. La célula de la presente invención se puede obtener, mediante, por ejemplo, la transfección de una célula huésped deseada con el vector de expresión de la presente invención.

En las células huésped eucariotas, se incluyen, por ejemplo, células de vertebrados, insectos y levaduras. Como célula de vertebrado, caben mencionar, por ejemplo, célula COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, 23, 175-182, 1981), una cepa defectuosa en dihidrofolato reductasa de una célula de ovario de hámster chino (célula CHO-dhfr⁻) (Urlaub, G. y Chasin, L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77, 4216-4220, 1980), un fibroblasto de pulmón de hámster chino (célula Dede, ATCC: CCL-39) usada en el ejemplo 4, una célula HEK293 derivada de riñón fetal humano (ATCC: CRL-1573) usada en el ejemplo 4, una célula 293-EBNA (Invitrogen) obtenida mediante la introducción de un gen EBNA-1 del Virus de Epstein Barr en célula HEK293 o célula L929 (ATCC: CRL-2148).

Como vector de expresión de una célula de vertebrado, se pueden usar en general un vector que contenga un promotor localizado secuencia arriba del gen por ser expresado, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de la transcripción y similares. El vector puede contener además un origen de replicación, si fuera necesario. Como vector de expresión, cabe mencionar, por ejemplo, pSV2dhfr que contiene un promotor temprano de SV40 (Subramani, S. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1, 854-864, 1981), pEF-BOS que contiene un promotor de factor de alargamiento humano (Mizushima, S. y Nagata, S., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990), pCEP4 que contiene un promotor de citomegalovirus (Invitrogen), pIRESneo2 (CLONTECH) o pcDNA3.1 (Invitrogen).

Cuando se usa la célula COS como célula huésped, se puede usar como vector de expresión un vector que tenga un origen de replicación de SV40, que pueda realizar una replicación autónoma en la célula COS y que tenga un promotor de la transcripción, una señal de terminación de la transcripción, y un sitio de corte y empalme de ARN. Como vector, cabe mencionar, por ejemplo, pME18S (Maruyama, K. y Takebe, Y., *Med. Immunol.*, 20, 27-32, 1990),
 5 pEF-BOS (Mizushima, S. y Nagata, S., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990) o pCDM8 (Seed, B., *Nature*, 329, 840-842, 1987).

Es posible incorporar el vector de expresión en las células COS mediante, por ejemplo, un procedimiento con DEAE-dextrano (Luthman, H. y Magnusson, G., *Nucleic Acids. Res.*, 11, 1295-1308, 1983), un procedimiento de
 10 co-precipitación de ADN con fosfato de calcio (Graham, F. L. y van der ED. A. J., *Virology*, 52, 456-457, 1973), un procedimiento que usa un reactivo de transfección disponible comercialmente (por ejemplo, el reactivo de transfección FuGENE™6; Roche Diagnostics) o un procedimiento de electroporación (Neumann, E. *et al.*, *EMBO J.*, 1, 841-845, 1982).

Cuando se usa la célula CHO como célula huésped, se puede obtener un transformante capaz de producir esta-
 15 blemente el polipéptido de la presente invención llevando a cabo una co-transfección de un vector de expresión que comprenda el polinucleótido de la presente invención, junto con un vector capaz de expresar un gen neo que funcione como un marcador de la resistencia a G418, tal como pRSVneo (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) o pSV2-neo (Southern, P. J. y Berg, P., *J. Mol. Appl. Genet.*,
 20 1, 327-341, 1982) y seleccionar una colonia resistente a G418.

Cuando se usa una célula 293-EBNA como célula huésped, se puede usar como vector de expresión, por ejemplo, pCEP4 (Invitrogen) que contenga un origen de replicación del Virus de Epstein Barr y sea capaz de realizar una
 25 replicación autónoma en la célula 293-EBNA.

La célula de la presente invención se puede cultivar según el procedimiento convencional, y el polipéptido de la presente invención se produce en la superficie de la célula. Como medio por usar en el cultivo, se puede seleccionar apropiadamente un medio comúnmente usado en una célula huésped deseada. En el caso de la célula COS o la célula Dede, por ejemplo, se puede usar un medio tal como un medio RPMI-1640 o un medio esencial mínimo de Eagle
 30 modificado por Dulbecco (DMEM), complementándolo con un componente sérico tal como suero bovino fetal (SBF) si fuera necesario. En el caso de la célula 293-EBNA, se puede usar un medio tal como un medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un componente sérico tal como suero bovino fetal (SBF) y G418.

El polipéptido de la presente invención producido en la superficie celular cultivando la célula de la presente invención se puede separar y purificar de la misma mediante diversas técnicas de separación conocidas, haciendo uso de propiedades físicas, propiedades químicas y similares del polipéptido. Más concretamente, se puede obtener una fracción de membrana celular que contenga el polipéptido de la presente invención cultivando células que expresen el polipéptido de la presente invención, suspendiéndolas en un tampón, homogeneizándolas y centrifugando el producto homogéneo resultante. Una vez disuelta la membrana celular obtenida, se puede purificar el polipéptido de la presente invención mediante un tratamiento comúnmente usado, por ejemplo, un tratamiento con un precipitante proteínico, una ultra-filtración, diversas técnicas de cromatografía en fase líquida tales como una cromatografía sobre tamiz molecular (filtración sobre gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía en fase líquida de alta resolución (CLAR) o diálisis, o una combinación de las mismas.

45 2. Rastreo de los agentes terapéuticos para la lesión celular debida a una reperusión postisquémica y a una enfermedad inflamatoria

Se puede rastrear una sustancia que inhiba el polipéptido de la presente invención usando la célula que expresa el polipéptido de la presente invención para que presente la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del
 50 potasio.

Según lo descrito en el apartado de Antecedentes de la técnica, se sabe que la sobrecarga de calcio intracelular debida a una reperusión desempeña un importante papel en la generación de una lesión por reperusión y que el intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio está implicado en el influjo de calcio hacia el interior de la célula acompañado por la extrusión del sodio intracelular (sentido inverso). Además, se sabe que el intercambiador de sodio-calcio extrude el sodio intracelular hacia fuera de la célula e incorpora calcio en la célula durante la reperusión postisquémica, para devolver la sobrecarga de sodio intracelular causada por la reperusión a su estado original. Además, se sabe que se aumentó una expresión de factores adhesivos en leucocitos mediante el aumento de la concentración del calcio intracelular, y que los anticuerpos monoclonales contra los factores adhesivos suprimieron la acumulación de leucocitos y redujeron la superficie de la infracción. De este modo, se considera que una inhibición de una sobrecarga del calcio intracelular en leucocitos suprime la acumulación de leucocitos y la activación de los leucocitos por parte de los factores adhesivos debido a la sobrecarga, y tiene una actividad de evitar la lesión celular causada por el fenómeno de no reflujo.

El polipéptido de la presente invención que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 2 6 4 es un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio que se expresa abundantemente en los leucocitos periféricos. Por lo tanto, se considera que un agente que inhiba o suprima el intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio (sentido inverso) en el polipéptido de la presente invención suprime el influjo de calcio hacia el interior de la célula e inhibe

la activación o la adhesión leucocitaria, y que por tanto es útil en el tratamiento de una lesión celular debida a una reperfusión postisquémica.

Además, con respecto a la activación leucocitaria, la reperfusión postisquémica y la inflamación tienen aspectos comunes, tales como un aumento del pH intracelular en leucocitos y la activación del intercambiador de sodio-hidrógeno mediante el mismo, así como un aumento de la concentración del calcio intracelular mediante lo anterior y, por tanto, se considera que el intercambiador de sodio-calcio de los leucocitos está implicado en una activación leucocitaria durante la lesión por reperfusión postisquémica y la inflamación. Es decir, se considera que una inhibición de la activación del intercambiador de sodio-calcio en los leucocitos suprime el aumento de la concentración de calcio intracelular en los leucocitos e inhibe la activación leucocitaria.

Por lo tanto, se puede usar la célula de la presente invención *per se* como herramienta de rastreo para un inhibidor del polipéptido de la presente invención y un inhibidor de la activación leucocitaria (particularmente, un agente terapéutico para la lesión celular debida a la reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria).

El término “que inhibe o suprime el polipéptido de la presente invención” significa que inhibe o suprime la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio, incluyendo el caso de inhibición o supresión de la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio mediante la inhibición o supresión de la expresión del polipéptido.

El procedimiento para rastrear un inhibidor del polipéptido de la presente invención y un inhibidor de la activación leucocitaria (particularmente, un agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria) comprende las etapas de:

- poner en contacto la célula de la presente invención con una sustancia por ser analizada,
- analizar si la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio está o no está inhibida en el polipéptido, y
- seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido.

Las sustancias por ser analizadas que pueden ser aplicadas en el procedimiento de rastreo de la presente invención no están particularmente especificadas, pero cabe mencionar, por ejemplo, diversos compuestos conocidos (incluyendo péptidos) registrados en archivos químicos, compuestos obtenidos mediante técnicas de Química Combinatoria (Terrett, N. K., *et al.*, *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995) o péptidos aleatorios preparados mediante el empleo de un procedimiento de visualización de fagos (Felici, F. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991) y similares. Además, se pueden usar sobrenadantes tisulares de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas u organismos marinos o extractos de tejidos animales como sustancias de análisis para el rastreo. Además, se pueden usar compuestos (incluyendo péptidos) obtenidos mediante la modificación química o biológica de compuestos (incluyendo péptidos) seleccionados mediante el procedimiento de rastreo de la presente invención.

El procedimiento de rastreo de la presente invención no está particularmente especificado, siempre y cuando comprenda las etapas de:

(1) poner en contacto una célula que exprese el polipéptido de la presente invención para que funcione como el intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio (i.e., incluyendo una célula que fue transfectada con un vector de expresión que comprendía un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención y que expresa el polipéptido para que funcione como un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio, y una célula natural que exprese el polipéptido de la presente invención para que funcione como un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio) con una sustancia por ser analizada,

(2) analizar si está inhibida o no la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido y

(3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido. Cabe mencionar, en base a las diferencias en los procedimientos usados para analizar la inhibición del polipéptido de la presente invención, por ejemplo:

- [1] un procedimiento de rastreo que utiliza la absorción de iones de radioisótopo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ o
- [2] un procedimiento de rastreo que utiliza un tinte sensible al calcio. Entre estos procedimientos, se prefiere el procedimiento de rastreo que utiliza la absorción de iones de radioisótopo $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Como célula usada en el rastreo, es preferible la célula de la presente invención preparada mediante su transfección con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención.

Según el procedimiento anterior [1], es posible rastrear una sustancia que inhiba el polipéptido de la presente invención y sea útil en el tratamiento de la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad

inflamatoria mediante, por ejemplo, el siguiente procedimiento. Se incorpora sodio en las células que expresan el polipéptido de la presente invención en la superficie celular usando un ionóforo (tal como monensina) frente a un catión univalente; se cambia la solución extracelular a una solución extracelular que contiene iones de radioisótopo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ con o sin un compuesto de prueba; y se mide una radiactividad del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intracelular. Luego, se analiza si el polipéptido de la presente invención está inhibido o no en base a la diferencia en las cantidades de radiactividad incorporadas en las células en presencia o en ausencia de la sustancia de análisis. Es decir, el procedimiento de rastreo [1] de la presente invención comprende las etapas de:

Incorporar iones de radioisótopo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en la célula que expresa el polipéptido de la presente invención en la superficie celular y, simultáneamente, poner en contacto la célula con una sustancia por ser analizada y detectar una cantidad de radiactividad incorporada en la célula.

Por ejemplo, se tratan las células que expresan el polipéptido de la presente invención con una solución extracelular que contiene un compuesto de análisis y monensina para incorporar sodio a las células. Se cambia la solución extracelular a una solución extracelular que contiene el compuesto de análisis y $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para incorporar $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a las células mediante la actividad de intercambio de sodio-calcio. Se lavan las células con una solución que contiene lantano, un inhibidor de la actividad de intercambio de sodio-calcio para eliminar el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no incorporado. Cuando se inhibe la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa, se disminuye una cantidad de influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ hacia el interior de las células y, por tanto, se puede analizar si el polipéptido de la presente invención está inhibido o no en base a la radiactividad en las células como un indicador de la actividad de intercambio de sodio-calcio. Más concretamente, es preferible detectar la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4. Se puede rastrear un inhibidor del polipéptido de la presente invención analizando un cambio de la radiactividad incorporada en las células mediante la adición de la sustancia de análisis.

Cuando se rastrea una sustancia que inhibe el polipéptido de la presente invención y es útil en el tratamiento de una lesión celular debida a una reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria, mediante el procedimiento [2] anterior, por ejemplo, se incorpora un tinte sensible al calcio en las células que expresan el polipéptido de la presente invención en la superficie celular, y se analiza si el polipéptido de la presente invención está inhibido o no en base al cambio de una intensidad de fluorescencia del mismo en las células en presencia o en ausencia del compuesto de análisis. Es decir, en el procedimiento de rastreo [2] de la presente invención, se tratan las células que expresan el polipéptido de la presente invención en la superficie celular con una solución extracelular que contiene un ionóforo (tal como monensina) contra un catión univalente, para incorporar sodio a las células. Se cambia la solución extracelular a una solución extracelular que contiene un compuesto de análisis y un tinte sensible al calcio para incorporar el tinte sensible al calcio a las células mediante la actividad de intercambio de sodio-calcio. Se lavan las células con una solución que contiene un inhibidor de la actividad de intercambio de sodio-calcio tal como lantano, para eliminar el tinte sensible al calcio no incorporado. Cuando se inhibe la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa, disminuye la intensidad de fluorescencia del tinte sensible al calcio en las células y así se puede analizar si el polipéptido de la presente invención está o no está inhibido, en base a la intensidad de fluorescencia de las células como un indicador de la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa. Se puede rastrear un inhibidor del polipéptido de la presente invención detectando la intensidad de fluorescencia del tinte sensible al calcio en presencia del compuesto de análisis. El procedimiento de rastreo comprende las etapas de:

Incorporar un tinte sensible al calcio a la célula y luego poner en contacto la célula con una sustancia por ser analizada, y

detectar la intensidad de fluorescencia del tinte sensible al calcio en la célula. Este rastreo utiliza la característica de que los tintes sensibles al calcio pueden detectar ópticamente el influjo de calcio acompañado por una activación en modo inverso del intercambiador de sodio-calcio.

Más concretamente, es posible detectar la actividad del polipéptido de la presente invención usando, por ejemplo, Fura-2 o un derivado del mismo como tinte sensible al calcio. Se puede rastrear un inhibidor del polipéptido de la presente invención comparando un cambio de la intensidad de fluorescencia del tinte en presencia o en ausencia de la sustancia de análisis. Cuando se inhibe la actividad de intercambio de sodio-calcio inversa, disminuye la intensidad de fluorescencia.

Tal y como se describe anteriormente, según el procedimiento de rastreo de la presente invención, se puede rastrear una sustancia (particularmente, un compuesto) que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio del polipéptido de la presente invención, i.e., una sustancia (particularmente un compuesto) que tiene una actividad inhibidora. Un compuesto que tiene una actividad inhibidora por ser seleccionado en el procedimiento de rastreo de la presente invención se puede definir como un compuesto que inhibe una actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4. Como el compuesto, se prefiere un compuesto que tenga una CI_{50} de 100 $\mu\text{moles/l}$ o menor. Por ejemplo, cuando se hace reaccionar un compuesto de análisis durante un período predeterminado en condiciones descritas en el ejemplo 6, se puede seleccionar un compuesto que tenga una CI_{50} de 100 $\mu\text{moles/l}$ o menor como sustancia que tiene una actividad inhibidora. Usando un compuesto inhibidor aislado mediante el rastreo como componente principal, se puede obtener un medicamento que se dirige al nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4. Por ejemplo, la CI_{50} del metanosulfonato de 2-[2-[4-(4-nitrobenciloxi)fenil]etil]isotiourea (denominado de aquí en adelante compuesto A) seleccionado en el ejemplo 6 fue de 15,8 $\mu\text{moles/l}$.

y de 35,0 μ moles/l, con respecto al nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4, respectivamente. Además, la CI_{50} del 3'-4'-diclorobenzamilo (denominado de aquí en adelante compuesto B) fue de 20,2 μ moles/l y de 58,9 μ moles/l, con respecto a los nuevos intercambiadores de sodio-calcio dependientes del potasio constituidos por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente. A partir de los resultados, es evidente que se puede seleccionar un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 mediante el procedimiento de rastreo de la presente invención.

3. Medicamento

El medicamento de la presente descripción que comprende, como ingrediente activo, un compuesto (preferiblemente, el compuesto A o B anterior) que modifica una actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 se puede preparar usando vehículos, cargas u otros aditivos usados generalmente en la preparación de medicamentos conforme al ingrediente activo.

Los ejemplos de administración incluyen la administración oral mediante comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, gránulos finos, polvos, soluciones orales y similares, y la administración parenteral mediante inyecciones (p. ej., intravenosa, intramuscular o similares), supositorios, preparaciones transdérmicas, preparaciones de absorción transmucosal y similares. Particularmente, en el caso de péptidos que son digeridos en el estómago, se prefiere una administración parenteral tal como una inyección intravenosa o similar.

En la composición sólida para su uso en la administración oral, se pueden mezclar una o más sustancias activas con al menos un diluyente inerte tal como lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa, almidón, pirrolidona polivinílica o silicato de aluminio y magnesio. En el modo habitual, la composición puede contener aditivos distintos del diluyente inerte tales como un lubricante, un agente desintegrante, un agente estabilizante o un agente potenciador de la disolución o la solubilización. Si fuera necesario, se pueden revestir los comprimidos o las píldoras con una cubierta de azúcar o una película de una sustancia gástrica o entérica.

La composición líquida para una administración oral puede incluir, por ejemplo, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires, y puede contener un diluyente inerte usado generalmente tal como agua purificada o alcohol etílico. La composición puede contener aditivos distintos al diluyente inerte, tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y antisépticos.

Las inyecciones para una administración parenteral pueden incluir soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas asépticas. Los ejemplos del diluyente para su uso en las soluciones y las suspensiones acuosas incluyen agua destilada para su uso en inyección y solución salina fisiológica. Los ejemplos del diluyente para su uso en las soluciones y las suspensiones no acuosas incluyen alcoholes (p.ej., etanol), glicoles, (p.ej., propilenglicol o polietilenglicol), polysorbate 80 (nombre comercial) y similares. Tal composición puede contener además un agente humectante, un agente emulsionante, un agente de dispersión, un agente estabilizante, un agente potenciador de la disolución o la solubilización, un antiséptico y similares. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante, por ejemplo, la filtración a través de un filtro de retención de bacterias, la mezcla de un germicida o la irradiación. Alternativamente, antes de su uso, se pueden convertir primero en composiciones sólidas estériles y disolverlas en agua estéril u otro disolvente estéril para un uso en inyección.

La dosis se decide opcionalmente teniendo en consideración la fuerza de cada ingrediente activo seleccionado mediante el anterior procedimiento de rastreo o los síntomas, la edad, el sexo o similares de cada paciente al que se le vaya a administrar. Por ejemplo, en el caso de la administración oral, la dosis habitual para un adulto (60 kg de peso) es de aproximadamente 0,1 a 100 mg, preferiblemente, de 0,1 a 50 mg al día. En el caso de la administración parenteral, la dosis habitual es de aproximadamente 0,01 a 50 mg, preferiblemente, de 0,01 a 10 mg al día en forma de inyección.

Ejemplos

A continuación, se ilustrará la presente invención en mayor profundidad, pero de ningún modo quedará restringida, mediante los siguientes ejemplos. Los procedimientos fueron realizados según los procedimientos conocidos (por ejemplo, Maniatis, T., *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982; y Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2ª Ed., Sinauer Associates Inc., MA, 1992), a no ser que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1

Aislamiento de los genes codificantes de los nuevos intercambiadores de sodio-calcio dependientes del potasio y construcción de vectores de expresión

Se obtuvo un ADNc de longitud completa codificante de cada nuevo intercambiador de sodio-calcio de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 mediante el procedimiento de reacción en

ES 2 314 252 T3

cadena de la polimerasa con la transcriptasa inversa (RT-PCR) usando ADNc de cerebro humano (ADNc de Marathon-Ready; Clontech) como molde mediante el siguiente procedimiento.

Se llevó a cabo una PCR usando ADNc de cerebro humano (ADNc de Marathon-Ready; Clontech) como molde, un oligonucleótido constituido por la secuencia de bases de SEQ ID NO: 5 (que tiene la secuencia de reconocimiento de EcoRI añadida al terminal 5') como cebador directo, un oligonucleótido constituido por la secuencia de bases de SEQ ID NO: 6 (que tiene la secuencia de reconocimiento de KpnI añadida al terminal 5') como cebador inverso y una ADN polimerasa (Taq ADN polimerasa PLATINUM de alta fidelidad; GIBCO-BRL). En la PCR, se realizó primero una desnaturalización térmica a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces un ciclo constituido por reacciones a 98°C durante 10 segundos, a 60°C durante 20 segundos y a 68°C durante 3 minutos. Como resultado, se amplificaron dos bandas de ADN de aproximadamente 1,9 kpb. El fragmento de ADN más largo se denominó "622" y el más corto se denominó "603".

Se digirió cada fragmento de ADN con enzimas de restricción EcoRI y KpnI, y se clonaron en plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen). Los clones resultantes fueron denominados pcDNA-622 y pcDNA-603. A este respecto, el plásmido pcDNA3.1 contiene una secuencia promotora de citomegalovirus y se puede usar para expresar un nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio en una célula animal.

Se analizaron las secuencias de bases de los clones pcDNA-622 y pcDNA-603 usando un secuenciador de ADN (secuenciador de ADN ABI377; Applied Biosystems) mediante un procedimiento con terminador didesoxi para obtener las secuencias de bases de SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente.

La secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 (pares de bases totales = 1.902 pb) contiene un marco de lectura abierto representado por la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1.882. La secuencia de aminoácidos deducida del marco de lectura abierto y constituida por 622 residuos de aminoácido fue la de SEQ ID NO: 2.

La secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 (pares de bases totales = 1.845 pb) contiene un marco de lectura abierto representado por la secuencia constituida por el tramo de la base 14 a la base 1825. La secuencia de aminoácidos deducida del marco de lectura abierto y constituida por 603 residuos de aminoácido fue la de SEQ ID NO: 4.

Ejemplo 2

Análisis de la distribución de la expresión de los intercambiadores de sodio-calcio dependientes del potasio en tejidos humanos

Se analizó una distribución de expresión del gen (SEQ ID NO: 1) codificante del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio en tejidos humanos mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa con la transcriptasa inversa (RT-PCR) con el siguiente procedimiento.

Se trató ARN poly A⁺ (5 ng, respectivamente; Clontech) de cada tejido humano con DNasa y entonces se sintetizó una primera cadena de ADNc llevando a cabo una transcripción inversa usando un equipo de RT-PCR (Sistema de síntesis de primeras cadenas SUPERScript para RT-PCR; GIBCO-BRL).

Se llevó a cabo una PCR usando el ADNc de primera cadena resultante como molde, un oligonucleótido constituido por la secuencia de bases de SEQ ID NO: 7 como cebador directo, un oligonucleótido constituido por la secuencia de bases de SEQ ID NO: 8 como cebador inverso y una ADN polimerasa (Taq ADN polimerasa PLATINUM de alta fidelidad; GIBCO-BRL). En la PCR, se realizó primero una desnaturalización térmica a 94°C durante 1 minuto y luego se repitió 35 veces un ciclo constituido por reacciones a 98°C durante 10 segundos, a 64°C durante 20 segundos y a 68°C durante 1 minuto y 30 segundos. A este respecto, las secuencias de bases de los cebadores son secuencias específicas contenidas comúnmente en ambos genes codificantes de los polipéptidos constituidos por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4.

Cuando se llevó a cabo el análisis de RT-PCR de los leucocitos periféricos humanos, se amplificaron fragmentos de ADN de aproximadamente 750 pb y aproximadamente 700 pb. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 750 pb y aproximadamente 700 pb contenían "la secuencia constituida por el tramo de la base 348 a la base 1.101 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1" y "la secuencia constituida por el tramo de la base 348 a la base 1.044 de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3", respectivamente. De los resultados, se descubrió que el ARNm de cada intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio de la presente invención se expresaba en leucocitos periféricos humanos.

Ejemplo 3

Expresión de intercambiadores de sodio-calcio dependientes del potasio en células animales HEK293, Dede y CHO

Se expresó cada polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 en células animales para detectar una nueva actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio del polipéptido. Como

células animales, se usaron la célula HEK293 (ATCC: CRL-1573), una célula Dede (ATCC: CCL-39) y una célula CHO-dhfr⁻ (ATCC: CRL-9096). Se transfectaron las células HEK293, células Dede o células CHO-dhfr⁻ con el vector de expresión pcDNA-622 o pcDNA-603 preparado en el ejemplo 1 y un reactivo de transfección comercialmente disponible (LipofectAMINE2000; GIBCO-BRL) para expresar cada intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio en cada célula. A este respecto, el procedimiento concreto se llevó a cabo según el manual que acompañaba al reactivo de transfección. Además, se preparó una célula transfectada con el plásmido pcDNA3.1 como célula control de una manera similar. Las células transfectadas resultantes se usaron en los siguientes ejemplos 4 y 5.

Ejemplo 4

Detección de la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio

Se midió la actividad de intercambio de sodio-calcio usando cada una de las células preparadas en el ejemplo 3.

Se incorporó sodio a las células cambiando el medio a una solución extracelular que contenía monensina [i.e., una solución que contenía 0,01 mmoles/l de monensina; 1 mmol/l de ouabaína; 146 mmoles/l de NaCl; 4 mmoles/l de KCl; 0,1 mmoles/l de MgCl₂; 10 mmoles/l de glucosa; albúmina de suero bovino al 0,1% y 10 mmoles/l de HEPES-Tris (pH = 7,4)] e incubando las células a 37°C durante 30 minutos. Se cambió la solución a una solución extracelular que contenía cloruro de calcio (⁴⁵CaCl₂; 55,5 kBq/ml) [i.e., una solución que contenía 0,01 mmoles/l de verapamil; 1 mmol/l de ouabaína; 150 mmoles/l de NaCl; 0,1 mmoles/l de CaCl₂; 2 mmoles/l de MgCl₂; 10 mmoles/l de glucosa; albúmina de suero bovino al 0,1% y 10 mmoles/l de HEPES-Tris (pH = 7,4); solución extracelular A], y se dejaron reposar las células a temperatura ambiente durante 15 minutos para intercambiar los iones de sodio intracelular por los iones de calcio.

Además, se usó una solución extracelular en que la que se había sustituido el cloruro de colina por NaCl (solución extracelular B). Además, para examinar la dependencia de un ión de potasio, se usaron una solución extracelular que contenía cloruro de calcio (⁴⁵CaCl₂; 55,5 kBq/ml) y cloruro de potasio [i.e., una solución que contenía 0,01 mmoles/l de verapamil; 1 mmol/l de ouabaína; 4 mmoles/l de KCl; 146 mmoles/l de cloruro de colina; 0,1 mmoles/l de CaCl₂; 2 mmoles/l de MgCl₂; 10 mmoles/l de glucosa; albúmina de suero bovino al 0,1% y 10 mmoles/l de HEPES-Tris (pH = 7,4); solución extracelular C] y una solución extracelular que tenía una composición igual a la de la solución extracelular C, a excepción de que la cantidad de KCl era de 150 mmoles/l y que no contenía cloruro de colina (solución extracelular D).

Se lavaron las células tratadas con una solución de lavado que contenía 120 mmoles/l de cloruro de colina, 10 mmoles/l de LaCl₃ y 10 mmoles/l de HEPES-Tris (pH = 7,4) para eliminar los iones de calcio no incorporados, y luego se midió una radiactividad de los iones de calcio intracelulares y se analizó mediante un contador de centelleo líquido. En las células HEK293, células Dede o células CHO-dhfr⁻ que expresaban el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4, se midió una radiactividad aproximadamente dos veces más elevada que la obtenida en el caso de la solución extracelular A cuando se usó la solución extracelular B (solución extracelular en la que el sodio fue reemplazado por colina). Además, se midieron radiactividades de aproximadamente cinco veces y aproximadamente 10 veces más elevadas que las obtenidas en el caso de la solución extracelular A cuando se usaron las soluciones C y D (solución extracelular que contiene potasio), respectivamente.

Según lo descrito anteriormente, se confirmó que, en las células que expresan el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 de la presente invención, se pueden intercambiar los iones de sodio intracelular por iones de calcio extracelular más eficazmente en presencia de iones de potasio, y que el polipéptido de la presente invención constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio.

Ejemplo 5

Construcción de cepa celular que expresa de forma estable el intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio

Para construir una cepa celular de expresión estable, se sub-cultivaron repetidas veces las células Dede preparadas en el ejemplo 3 en un medio DMEM que contenía G-418 (GIBCO-BRL) a una concentración final de 400 mg/l, y se sembraron las células en pozos de placas de 96 pozos (5.000 células/pozo). Se midió la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio de cada pozo según el procedimiento descrito en el ejemplo 4, para seleccionar células que tenían una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en la que una radiactividad en el caso de la solución extracelular C o D fuera de 5.000 cpm/pozo o mayor y una proporción de S/N de 10 o más. Las cepas celulares de expresión estable resultantes derivadas de una célula Dede se usaron en el siguiente ejemplo 6.

Ejemplo 6

Sustancias de rastreo que inhiben la nueva actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio utilizando la liberación de iones de radioisótopo de calcio (^{45}Ca)

Se rastrearon, según el procedimiento descrito en el ejemplo 4, sustancias que inhiben la actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente de potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 mediante la medición de una radiactividad de los iones de calcio.

Se sembraron células de expresión estable derivadas de una célula Dede, preparadas en el ejemplo 5, en cada pozo de placas de 96 pozos (5.000 células/pozo) y se determinó la actividad inhibidora midiendo una radiactividad de los iones de calcio según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 para rastrear sustancias que inhiben la actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente de potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4. Tras tratar las células con monensina, se añadió cada solución que contenía un compuesto de análisis [i.e., una solución de un compuesto de análisis disuelto en sulfóxido de dimetilo (DMSO)] a la solución extracelular C o D que contenía cloruro de calcio ($^{45}\text{CaCl}_2$; 55,5 kBq/ml), y se midió para seleccionar sustancias que presentaran una actividad inhibidora del 30% o más.

Como resultado, se obtuvieron dos compuestos que presentaban una actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente de potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4, i.e., metanosulfonato de 2-[2-[4-(4-nitrobenciloxi)fenil]etil]isotiourea [compuesto A; Publicación de patente japonesa sin examinar (Kokai) 9-67336 o *J. Biol. Chem.* 1996. 271(37): 22391-7] y 3',4'-diclorobenzamil [compuesto B; compuesto de catálogo N.º B-710, NIMH Chemical Inventory, EE.UU. o *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, mayo de 1984; 81(10): 3238-42].

Ejemplo 7

Efecto de los inhibidores en leucocitos polimorfonucleares periféricos humanos

Se evaluaron los compuestos obtenidos en el ejemplo 6 usando leucocitos polimorfonucleares periféricos humanos (PMN). Se obtuvo una muestra de sangre extrayendo sangre de un adulto sano. Se vertió una solución de Ficoll para la separación (medio de resolución Mono-poly; Dainippon Pharmaceutical) en cada tubo de centrifugación, y se tendió sobre la solución de Ficoll un componente de sangre recién preparado. Se llevó a cabo la centrifugación a 400 xg a temperatura ambiente durante 30 minutos para separar la capa superior (monolitos), la capa intermedia (PMN) y el precipitado (eritrocitos). Se recogió cada capa de tal manera que no se mezclaron entre sí, se suspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a centrifugar. Se suspendió cada capa recogida en un medio de RPMI1640 que contenía albúmina de suero bovino al 0,2% (ASB), y se usaron en el siguiente experimento tras contar el número de células. Se tiñó una porción del componente de PMN resultante con un tinte de hematoxilina y eosina para confirmar que contenía neutrófilos (aproximadamente el 95%) y eosinófilos (aproximadamente 5%).

Se llevó a cabo un test de migración usando una cámara de quimiotaxis desechable de 24 pocillos Transwell 3 μm ; Corning). Se preparó cada solución de análisis que contenía compuesto A o B (concentración final = 10 $\mu\text{moles/l}$; 30 $\mu\text{moles/l}$ y 100 $\mu\text{moles/l}$) en un medio (ASB al 0,2%, medio RPMI1640) que contenía 100 nmoles/l de formilmetionil-leucinil-fenilalanina (fMLP), y se añadió 1 ml de cada solución de análisis a cada uno de los pocos inferiores. Se añadieron los PMN recogidos a cada pozo superior (2,0 x 10⁶ células/pozo; 0,2 ml) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se contaron los números de células que emigraron a los pozos inferiores con un hemacitómetro. Se repitió el análisis independientemente tres veces.

En la tabla 1, se muestran los resultados. Cada valor mostrado en la tabla 1 es un valor relativo considerando como 100 el valor obtenido en el caso de usar DMSO en lugar de los compuestos de análisis. Además, cada valor mostrado en la tabla 1, es una media y una desviación estándar (DE) en base a tres experimentos independientes. Los datos obtenidos en el caso en que los PMN no fueron estimulados con fMLP (BG) se muestran en la tabla 1.

Tal y como se muestra en la tabla 1, los compuestos A y B inhibieron la emigración de los PMN de manera dependiente de la dosis. A partir de los resultados, se descubrió que los compuestos que inhiben una actividad del nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 4 tienen un efecto capaz de inhibir la emigración de los PMN. Es decir, se descubrió que tales compuestos tienen un efecto ventajoso como agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

TABLA 1

Número de células emigrantes (valor relativo)		
Control	DMSO	100
Compuesto A	10 μ moles/l	78,18 $\pm$ 25,93
	30 μ moles/l	29,50 $\pm$ 26,16
	100 μ moles/l	16,84 $\pm$ 10,78
Compuesto B	10 μ moles/l	100,68 $\pm$ 7,27
	30 μ moles/l	72,90 $\pm$ 15,85
	100 μ moles/l	44,58 $\pm$ 32,82
BG	fMLP(-)	19,22 $\pm$ 6,20

Aplicabilidad industrial

El polipéptido de la presente invención es un intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio expresado en los leucocitos periféricos y, por tanto, está implicado en la activación leucocitaria, la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y la inflamación. Por lo tanto, una sustancia que inhiba el polipéptido de la presente invención es útil en la inhibición de la activación leucocitaria y el tratamiento de la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

Además, el polipéptido de la presente invención y la célula de la presente invención que expresa el polipéptido en su superficie son útiles para rastrear un inhibidor de la activación leucocitaria y un agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria. Se puede proporcionar un sistema de rastreo conveniente para obtener un inhibidor de la activación leucocitaria y un agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria. Además, el polinucleótido y el vector de expresión de la presente invención son útiles en la fabricación de una herramienta de rastreo de un inhibidor de la activación leucocitaria y un agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

Según la herramienta de rastreo o el procedimiento de rastreo de la presente invención, se puede rastrear una sustancia útil como un inhibidor de la activación leucocitaria y un agente terapéutico para la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y una enfermedad inflamatoria. La composición farmacéutica para inhibir la actividad leucocitaria es útil en la prevención de la lesión celular debida a una reperfusión postisquémica y en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad inflamatoria.

Texto libre del listado secuencial

Las características de "Secuencia artificial" se describen en el identificador numérico <223> del listado secuencial. Más concretamente, cada secuencia de bases de SEQ ID NO: 5 a 8 es una secuencia cebadora sintetizada artificialmente.

Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a realizaciones específicas, es posible realizar diversos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. (1) Un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la actividad de intercambio de sodio-calcio es una actividad de intercambio de sodio-calcio inversa.
3. Un polinucleótido codificante del polipéptido según la reivindicación 1 ó 2.
4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 3.
5. Una célula transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 4.
6. Un procedimiento para producir el polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por usar la célula según la reivindicación 5.
7. Un procedimiento para rastrear un inhibidor del polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, que comprende las etapas de:
 - (1) poner en contacto una célula según la reivindicación 5 que expresa el polipéptido con una sustancia por ser analizada,
 - (2) analizar si la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio está inhibida o no en el polipéptido, y
 - (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido.
8. Un procedimiento para rastrear un inhibidor de la actividad leucocitaria que comprende las etapas de:
 - (1) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido seleccionado entre 1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y 2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y transfectado con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de dicho polipéptido en contacto con una sustancia por ser analizada,
 - (2) analizar si la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio está inhibida o no en el polipéptido, y
 - (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el polipéptido es (1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
10. Un procedimiento para rastrear un agente terapéutico para la lesión por reperusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:
 - (1) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido seleccionado entre 1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y 2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y transfectado con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de dicho polipéptido en contacto con una sustancia por ser analizada,
 - (2) analizar si la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio está inhibida o no en el polipéptido, y

ES 2 314 252 T3

- (3) seleccionar una sustancia que inhiba la actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio en el polipéptido.

11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el polipéptido es (1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

12. Uso de una célula que expresa un polipéptido seleccionado entre:

(1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y

(2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y transfectado con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de dicho polipéptido en el rastreo de un inhibidor de la activación leucocitaria o un agente terapéutico para la lesión por reperfusión postisquémica y/o una enfermedad inflamatoria.

13. El uso según la reivindicación 12, en el que el polipéptido es (1) un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o (2) un polipéptido que presenta una actividad de intercambio de sodio-calcio dependiente del potasio y que está constituido por una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 5 aminoácidos en total están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

ES 2 314 252 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

5 <120> Nuevo intercambiador de sodio-calcio dependiente del potasio

<130> Y0335PCT-693

10 <150> JP 2002-225114

<151> 01-08-2002

<150> JP 2003-182989

15 <151> 26-06-2003

<160> 8

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1902

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

30 <221> CDS

<222> (14)..(1882)

<223>

35 <220>

<223> Inventor: Nozawa, Katsura; Mochizuki, Shinobu

40

45

50

55

60

65

ES 2 314 252 T3

<400> 1

	gggaattcga tcc atg gcg ctc cgc ggg acc ctc cgg ccg ctc aaa gtt	49
5	Met Ala Leu Arg Gly Thr Leu Arg Pro Leu Lys Val	
	1 5 10	
	cgc agg agg cga gag atg ctg ccg cag caa gtc ggc ttc gtg tgc gcg	97
10	Arg Arg Arg Arg Glu Met Leu Pro Gln Gln Val Gly Phe Val Cys Ala	
	15 20 25	
	gtg ctg gcc ctg gtg tgc tgt gcg tcc ggc ctc ttc ggc agc ttg ggg	145
15	Val Leu Ala Leu Val Cys Cys Ala Ser Gly Leu Phe Gly Ser Leu Gly	
	30 35 40	
	cac aaa aca gct tct gct agc aaa cgt gtc ctg cca gac aca tgg aga	193
20	His Lys Thr Ala Ser Ala Ser Lys Arg Val Leu Pro Asp Thr Trp Arg	
	45 50 55 60	
	aat aga aag ttg atg gcc cca gtg aat ggg aca cag aca gcc aag aac	241
25	Asn Arg Lys Leu Met Ala Pro Val Asn Gly Thr Gln Thr Ala Lys Asn	
	65 70 75	
	tgc aca gat cct gcg att cac gag ttc ccc aca gat ctg ttc tcc aat	289
30	Cys Thr Asp Pro Ala Ile His Glu Phe Pro Thr Asp Leu Phe Ser Asn	
	80 85 90	
	aag gag cga cag cac gga gcc gtc ctg ctg cac atc ctt ggt gct ctg	337
35	Lys Glu Arg Gln His Gly Ala Val Leu Leu His Ile Leu Gly Ala Leu	
	95 100 105	
	tat atg ttc tat gcc ttg gcc ata gtg tgc gat gac ttc ttt gtt ccg	385
40	Tyr Met Phe Tyr Ala Leu Ala Ile Val Cys Asp Asp Phe Phe Val Pro	
	110 115 120	
	tct cta gag aag atc tgt gag aga ctc cat ctg agc gaa gat gtg gct	433
45	Ser Leu Glu Lys Ile Cys Glu Arg Leu His Leu Ser Glu Asp Val Ala	
	125 130 135 140	
	gga gcc acc ttc atg gct gca gga agc tca acg cca gag ctg ttt gcg	481
50	Gly Ala Thr Phe Met Ala Ala Gly Ser Ser Thr Pro Glu Leu Phe Ala	
	145 150 155	
	tct gtt att ggg gtg ttc atc acc cac ggg gac gtc ggg gtg ggc acc	529
55	Ser Val Ile Gly Val Phe Ile Thr His Gly Asp Val Gly Val Gly Thr	
	160 165 170	
	atc gtg ggc tct gct gtg ttc aac atc ctg tgc ata att gga gtg tgc	577
60	Ile Val Gly Ser Ala Val Phe Asn Ile Leu Cys Ile Ile Gly Val Cys	
	175 180 185	
	gga ctg ttt gct ggc cag gtg gtc cgt ctg acg tgg tgg gcc gtg tgc	625
65	Gly Leu Phe Ala Gly Gln Val Val Arg Leu Thr Trp Trp Ala Val Cys	
	190 195 200	
	cga gac tcc gtg tac tac acc atc tct gtc atc gtg ctc atc gtg ttc	673
	Arg Asp Ser Val Tyr Tyr Thr Ile Ser Val Ile Val Leu Ile Val Phe	
	205 210 215 220	

ES 2 314 252 T3

5	ata tat gat gaa caa att gtg tgg tgg gaa ggc ctg gtg ctc atc atc Ile Tyr Asp Glu Gln Ile Val Trp Trp Glu Gly Leu Val Leu Ile Ile 225 230 235	721
10	ttg tat gtg ttt tat att ctg atc atg aag tac aat gtg aag atg caa Leu Tyr Val Phe Tyr Ile Leu Ile Met Lys Tyr Asn Val Lys Met Gln 240 245 250	769
15	gcc ttt ttc aca gtc aaa caa aag agc att gca aac ggt aac ccg gtc Ala Phe Phe Thr Val Lys Gln Lys Ser Ile Ala Asn Gly Asn Pro Val 255 260 265	817
20	aac agt gag ctg gag gct ggt aat gat ttc tat gac ggt agc tat gat Asn Ser Glu Leu Glu Ala Gly Asn Asp Phe Tyr Asp Gly Ser Tyr Asp 270 275 280	865
25	gac cct tcc gtg cca ttg ctg ggg caa gtg aag gag aag cca cag tat Asp Pro Ser Val Pro Leu Leu Gly Gln Val Lys Glu Lys Pro Gln Tyr 285 290 295 300	913
30	ggc aag aac ccc gtg gtg atg gtg gac gag att atg agc tcc agc cct Gly Lys Asn Pro Val Val Met Val Asp Glu Ile Met Ser Ser Ser Pro 305 310 315	961
35	ccc aag ttc acc ttc cct gaa gca ggc tta cga atc atg atc acc aat Pro Lys Phe Thr Phe Pro Glu Ala Gly Leu Arg Ile Met Ile Thr Asn 320 325 330	1009
40	aag ttt gga ccc agg acc cga cta cgg atg gcc agc agg atc atc att Lys Phe Gly Pro Arg Thr Arg Leu Arg Met Ala Ser Arg Ile Ile Ile 335 340 345	1057
45	aat gag cgg cag aga ctg atc aac tcg gcc aat ggt gtg agc agt aag Asn Glu Arg Gln Arg Leu Ile Asn Ser Ala Asn Gly Val Ser Ser Lys 350 355 360	1105
50	ccg ctt caa aac ggg agg cac gag aac att gag aac ggg aat gtt cct Pro Leu Gln Asn Gly Arg His Glu Asn Ile Glu Asn Gly Asn Val Pro 365 370 375 380	1153
55	gtg gaa aac ccc gaa gac cct cag cag aat cag gag cag cag ccg ccg Val Glu Asn Pro Glu Asp Pro Gln Gln Asn Gln Glu Gln Gln Pro Pro 385 390 395	1201
60		
65		

ES 2 314 252 T3

5	cca cag cca cca ccg cca gag cca gag ccg gtg gag gct gac ttc ctg Pro Gln Pro Pro Pro Pro Glu Pro Glu Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu 400 405 410	1249
10	tcc ccc ttc tcc gtg ccg gag gcc aga ggg gac aag gtc aag tgg gtg Ser Pro Phe Ser Val Pro Glu Ala Arg Gly Asp Lys Val Lys Trp Val 415 420 425	1297
15	ttc acc tgg ccc ctc atc ttc ctc ctg tgc gtc acc att ccc aac tgc Phe Thr Trp Pro Leu Ile Phe Leu Leu Cys Val Thr Ile Pro Asn Cys 430 435 440	1345
20	agc aag ccc cgc tgg gag aag ttc ttc atg gtc acc ttc atc acc gcc Ser Lys Pro Arg Trp Glu Lys Phe Phe Met Val Thr Phe Ile Thr Ala 445 450 455 460	1393
25	acg ctg tgg atc gct gtg ttc tcc tac atc atg gtg tgg ctg gtg act Thr Leu Trp Ile Ala Val Phe Ser Tyr Ile Met Val Trp Leu Val Thr 465 470 475	1441
30	att atc gga tac aca ctt ggg atc ccg gat gtc atc atg ggc att act Ile Ile Gly Tyr Thr Leu Gly Ile Pro Asp Val Ile Met Gly Ile Thr 480 485 490	1489
35	ttc ctg gca gca ggg aca agt gtt cca gac tgc atg gcc agc cta att Phe Leu Ala Ala Gly Thr Ser Val Pro Asp Cys Met Ala Ser Leu Ile 495 500 505	1537
40	gtg gcg aga caa ggc ctt ggg gac atg gca gtc tcc aac acc ata gga Val Ala Arg Gln Gly Leu Gly Asp Met Ala Val Ser Asn Thr Ile Gly 510 515 520	1585
45	agc aac gtg ttt gac atc ctg gta gga ctt ggt gta ccg tgg ggc ctg Ser Asn Val Phe Asp Ile Leu Val Gly Leu Gly Val Pro Trp Gly Leu 525 530 535 540	1633
50	cag acc atg gtt gtt aat tat gga tca aca gtg aag atc aac agc cgg Gln Thr Met Val Val Asn Tyr Gly Ser Thr Val Lys Ile Asn Ser Arg 545 550 555	1681
55	ggg ctg gtc tat tcc gtg gtc ctg ttg ctg ggc tct gtc gct ctc acc Gly Leu Val Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Gly Ser Val Ala Leu Thr 560 565 570	1729

ES 2 314 252 T3

gtc ctc ggc atc cac cta aac aag tgg cga ctg gac cgg aag ctg ggt 1777
Val Leu Gly Ile His Leu Asn Lys Trp Arg Leu Asp Arg Lys Leu Gly
575 580 585

gtc tac gtg ctg gtt ctc tac gcc atc ttc ttg tgc ttc tcc ata atg 1825
Val Tyr Val Leu Val Leu Tyr Ala Ile Phe Leu Cys Phe Ser Ile Met
590 595 600

ata gag ttt aac gtc ttt acc ttc gtc aac ttg ccg atg tgc cgg gaa 1873
Ile Glu Phe Asn Val Phe Thr Phe Val Asn Leu Pro Met Cys Arg Glu
605 610 615 620

gac gat tag cgctgagtcg cggtaacctgg 1902
Asp Asp

 $\langle 210 \rangle$ 2 $\langle 211 \rangle$ 622

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

 $\langle 400 \rangle$ 2

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

Glu Met Leu Pro Gln Gln Val Gly Phe Val Cys Ala Val Leu Ala Leu
20 25 30

Val Cys Cys Ala Ser Gly Leu Phe Gly Ser Leu Gly His Lys Thr Ala
35 40 45

Ser Ala Ser Lys Arg Val Leu Pro Asp Thr Trp Arg Asn Arg Lys Leu
50 55 60

Met Ala Pro Val Asn Gly Thr Gln Thr Ala Lys Asn Cys Thr Asp Pro
65 70 75 80

ES 2 314 252 T3

5	Ala Ile His Glu Phe Pro Thr Asp Leu Phe Ser Asn Lys Glu Arg Gln	85	90	95	
10	His Gly Ala Val Leu Leu His Ile Leu Gly Ala Leu Tyr Met Phe Tyr	100	105	110	
15	Ala Leu Ala Ile Val Cys Asp Asp Phe Phe Val Pro Ser Leu Glu Lys	115	120	125	
20	Ile Cys Glu Arg Leu His Leu Ser Glu Asp Val Ala Gly Ala Thr Phe	130	135	140	
25	Met Ala Ala Gly Ser Ser Thr Pro Glu Leu Phe Ala Ser Val Ile Gly	145	150	155	160
30	Val Phe Ile Thr His Gly Asp Val Gly Val Gly Thr Ile Val Gly Ser	165	170	175	
35					
40	Ala Val Phe Asn Ile Leu Cys Ile Ile Gly Val Cys Gly Leu Phe Ala	180	185	190	
45	Gly Gln Val Val Arg Leu Thr Trp Trp Ala Val Cys Arg Asp Ser Val	195	200	205	
50	Tyr Tyr Thr Ile Ser Val Ile Val Leu Ile Val Phe Ile Tyr Asp Glu	210	215	220	
55	Gln Ile Val Trp Trp Glu Gly Leu Val Leu Ile Ile Leu Tyr Val Phe	225	230	235	240
60					
65	Tyr Ile Leu Ile Met Lys Tyr Asn Val Lys Met Gln Ala Phe Phe Thr	245	250	255	

ES 2 314 252 T3

5	Val Lys Gln Lys Ser Ile Ala Asn Gly Asn Pro Val Asn Ser Glu Leu	260	265	270
10	Glu Ala Gly Asn Asp Phe Tyr Asp Gly Ser Tyr Asp Asp Pro Ser Val	275	280	285
15	Pro Leu Leu Gly Gln Val Lys Glu Lys Pro Gln Tyr Gly Lys Asn Pro	290	295	300
20	Val Val Met Val Asp Glu Ile Met Ser Ser Ser Pro Pro Lys Phe Thr	305	310	315
25	Phe Pro Glu Ala Gly Leu Arg Ile Met Ile Thr Asn Lys Phe Gly Pro	325	330	335
30	Arg Thr Arg Leu Arg Met Ala Ser Arg Ile Ile Ile Asn Glu Arg Gln	340	345	350
35	Arg Leu Ile Asn Ser Ala Asn Gly Val Ser Ser Lys Pro Leu Gln Asn	355	360	365
40	Gly Arg His Glu Asn Ile Glu Asn Gly Asn Val Pro Val Glu Asn Pro	370	375	380
45	Glu Asp Pro Gln Gln Asn Gln Glu Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro Pro	385	390	395
50	Pro Pro Glu Pro Glu Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Ser Pro Phe Ser	405	410	415
55	Val Pro Glu Ala Arg Gly Asp Lys Val Lys Trp Val Phe Thr Trp Pro	420	425	430
60				
65				

ES 2 314 252 T3

Leu Ile Phe Leu Leu Cys Val Thr Ile Pro Asn Cys Ser Lys Pro Arg
 435 440 445
 5
 Trp Glu Lys Phe Phe Met Val Thr Phe Ile Thr Ala Thr Leu Trp Ile
 450 455 460
 10
 Ala Val Phe Ser Tyr Ile Met Val Trp Leu Val Thr Ile Ile Gly Tyr
 465 470 475 480
 15
 Thr Leu Gly Ile Pro Asp Val Ile Met Gly Ile Thr Phe Leu Ala Ala
 485 490 495
 20
 Gly Thr Ser Val Pro Asp Cys Met Ala Ser Leu Ile Val Ala Arg Gln
 500 505 510
 25
 Gly Leu Gly Asp Met Ala Val Ser Asn Thr Ile Gly Ser Asn Val Phe
 515 520 525
 30
 Asp Ile Leu Val Gly Leu Gly Val Pro Trp Gly Leu Gln Thr Met Val
 530 535 540
 35
 Val Asn Tyr Gly Ser Thr Val Lys Ile Asn Ser Arg Gly Leu Val Tyr
 545 550 555 560
 40
 Ser Val Val Leu Leu Leu Gly Ser Val Ala Leu Thr Val Leu Gly Ile
 565 570 575
 45
 His Leu Asn Lys Trp Arg Leu Asp Arg Lys Leu Gly Val Tyr Val Leu
 580 585 590
 50
 Val Leu Tyr Ala Ile Phe Leu Cys Phe Ser Ile Met Ile Glu Phe Asn
 595 600 605
 55
 60
 65

ES 2 314 252 T3

Val Phe Thr Phe Val Asn Leu Pro Met Cys Arg Glu Asp Asp
610 615 620

5
<210> 3
<211> 1845
<212> ADN
10 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
15 <222> (14)..(1825)
<223>

20 <400> 3

caggaattcc acc atg gcg ctc cgc ggg acc ctc cgg ccg ctc aaa gtt 49
Met Ala Leu Arg Gly Thr Leu Arg Pro Leu Lys Val
25 1 5 10

cgc agg agg cga gag atg ctg ccg cag caa gtc ggc ttc gtg tgc gcg 97
Arg Arg Arg Arg Glu Met Leu Pro Gln Gln Val Gly Phe Val Cys Ala
30 15 20 25

gtg ctg gcc ctg gtg tgc tgt gcg tcc ggc ctc ttc ggc agc ttg ggg 145
Val Leu Ala Leu Val Cys Cys Ala Ser Gly Leu Phe Gly Ser Leu Gly
35 30 35 40

cac aaa aca gct tct gct agc aaa cgt gtc ctg cca gac aca tgg aga 193
His Lys Thr Ala Ser Ala Ser Lys Arg Val Leu Pro Asp Thr Trp Arg
40 45 50 55 60

aat aga aag ttg atg gcc cca gtg aat ggg aca cag aca gcc aag aac 241
Asn Arg Lys Leu Met Ala Pro Val Asn Gly Thr Gln Thr Ala Lys Asn
45 65 70 75

tgc aca gat cct gcg att cac gag ttc ccc aca gat ctg ttc tcc aat 289
Cys Thr Asp Pro Ala Ile His Glu Phe Pro Thr Asp Leu Phe Ser Asn
50 80 85 90

aag gag cga cag cac gga gcc gtc ctg ctg cac atc ctt ggt gct ctg 337
Lys Glu Arg Gln His Gly Ala Val Leu Leu His Ile Leu Gly Ala Leu
55 60 95 100 105

65

ES 2 314 252 T3

5	tat atg ttc tat gcc ttg gcc ata gtg tgc gat gac ttc ttt gtt ccg Tyr Met Phe Tyr Ala Leu Ala Ile Val Cys Asp Asp Phe Phe Val Pro 110 115 120	385
10	tct cta gag aag atc tgt gag aga ctc cat ctg agc gaa gat gtg gct Ser Leu Glu Lys Ile Cys Glu Arg Leu His Leu Ser Glu Asp Val Ala 125 130 135 140	433
15	gga gcc acc ttc atg gct gca gga agc tca acg cca gag ctg ttt gcg Gly Ala Thr Phe Met Ala Ala Gly Ser Ser Thr Pro Glu Leu Phe Ala 145 150 155	481
20	tct gtt att ggg gtg ttc atc acc cac ggg gac gtc ggg gtg ggc acc Ser Val Ile Gly Val Phe Ile Thr His Gly Asp Val Gly Val Gly Thr 160 165 170	529
25	atc gtg ggc tct gct gtg ttc aac atc ctg tgc ata att gga gtg tgc Ile Val Gly Ser Ala Val Phe Asn Ile Leu Cys Ile Ile Gly Val Cys 175 180 185	577
30	gga ctg ttt gct ggc cag gtg gtc cgt ctg acg tgg tgg gcc gtg tgc Gly Leu Phe Ala Gly Gln Val Val Arg Leu Thr Trp Trp Ala Val Cys 190 195 200	625
35	cga gac tcc gtg tac tac acc atc tct gtc atc gtg ctc atc gtg ttc Arg Asp Ser Val Tyr Tyr Thr Ile Ser Val Ile Val Leu Ile Val Phe 205 210 215 220	673
40	ata tat gat gaa caa att gtg tgg tgg gaa ggc ctg gtg ctc atc atc Ile Tyr Asp Glu Gln Ile Val Trp Trp Glu Gly Leu Val Leu Ile Ile 225 230 235	721
45	ttg tat gtg ttt tat att ctg atc atg aag tac aat gtg aag atg caa Leu Tyr Val Phe Tyr Ile Leu Ile Met Lys Tyr Asn Val Lys Met Gln 240 245 250	769
50	gcc ttt ttc aca gtc aaa caa aag agc att gca aac ggt aac ccg gtc Ala Phe Phe Thr Val Lys Gln Lys Ser Ile Ala Asn Gly Asn Pro Val 255 260 265	817
55	aac agt gag ctg gag gct gtg aag gag aag cca cag tat ggc aag aac Asn Ser Glu Leu Glu Ala Val Lys Glu Lys Pro Gln Tyr Gly Lys Asn 270 275 280	865

65

ES 2 314 252 T3

5	ccc gtg gtg atg gtg gac gag att atg agc tcc agc cct ccc aag ttc Pro Val Val Met Val Asp Glu Ile Met Ser Ser Ser Pro Pro Lys Phe 285 290 295 300	913
10	acc ttc cct gaa gca ggc tta cga atc atg atc acc aat aag ttt gga Thr Phe Pro Glu Ala Gly Leu Arg Ile Met Ile Thr Asn Lys Phe Gly 305 310 315	961
15	ccc agg acc cga cta cgg atg gcc agc agg atc atc att aat gag cgg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Met Ala Ser Arg Ile Ile Ile Asn Glu Arg 320 325 330	1009
20	cag aga ctg atc aac tcg gcc aat ggt gtg agc agt aag ccg ctt caa Gln Arg Leu Ile Asn Ser Ala Asn Gly Val Ser Ser Lys Pro Leu Gln 335 340 345	1057
25	aac ggg agg cac gag aac att gag aac ggg aat gtt cct gtg gaa aac Asn Gly Arg His Glu Asn Ile Glu Asn Gly Asn Val Pro Val Glu Asn 350 355 360	1105
30	ccc gaa gac cct cag cag aat cag gag cag cag ccg ccg cca cag cca Pro Glu Asp Pro Gln Gln Asn Gln Glu Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro 365 370 375 380	1153
35	cca ccg cca gag cca gag ccg gtg gag gct gac ttc ctg tcc ccc ttc Pro Pro Pro Glu Pro Glu Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Ser Pro Phe 385 390 395	1201
40	tcc gtg ccg gag gcc aga ggg gac aag gtc aag tgg gtg ttc acc tgg Ser Val Pro Glu Ala Arg Gly Asp Lys Val Lys Trp Val Phe Thr Trp 400 405 410	1249
45	ccc ctc atc ttc ctc ctg tgc gtc acc att ccc aac tgc agc aag ccc Pro Leu Ile Phe Leu Leu Cys Val Thr Ile Pro Asn Cys Ser Lys Pro 415 420 425	1297
50	cgc tgg gag aag ttc ttc atg gtc acc ttc atc acc gcc acg ctg tgg Arg Trp Glu Lys Phe Phe Met Val Thr Phe Ile Thr Ala Thr Leu Trp 430 435 440	1345
55	atc gct gtg ttc tcc tac atc atg gtg tgg ctg gtg act att atc gga Ile Ala Val Phe Ser Tyr Ile Met Val Trp Leu Val Thr Ile Ile Gly 445 450 455 460	1393

ES 2 314 252 T3

5	tac aca ctt ggg atc ccg gat gtc atc atg ggc att act ttc ctg gca Tyr Thr Leu Gly Ile Pro Asp Val Ile Met Gly Ile Thr Phe Leu Ala 465 470 475	1441
10	gca ggg aca agt gtt cca gac tgc atg gcc agc cta att gtg gcg aga Ala Gly Thr Ser Val Pro Asp Cys Met Ala Ser Leu Ile Val Ala Arg 480 485 490	1489
15	caa ggc ctt ggg gac atg gca gtc tcc aac acc ata gga agc aac gtg Gln Gly Leu Gly Asp Met Ala Val Ser Asn Thr Ile Gly Ser Asn Val 495 500 505	1537
20	ttt gac atc ctg gta gga ctt ggt gta ccg tgg ggc ctg cag acc atg Phe Asp Ile Leu Val Gly Leu Gly Val Pro Trp Gly Leu Gln Thr Met 510 515 520	1585
25	gtt gtt aat tat gga tca aca gtg aag atc aac agc cgg ggg ctg gtc Val Val Asn Tyr Gly Ser Thr Val Lys Ile Asn Ser Arg Gly Leu Val 525 530 535 540	1633
30	tat tcc gtg gtc ctg ttg ctg ggc tct gtc gct ctc acc gtc ctc ggc Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Gly Ser Val Ala Leu Thr Val Leu Gly 545 550 555	1681
35	atc cac cta aac aag tgg cga ctg gac cgg aag ctg ggt gtc tac gtg Ile His Leu Asn Lys Trp Arg Leu Asp Arg Lys Leu Gly Val Tyr Val 560 565 570	1729
40	ctg gtt ctc tac gcc atc ttc ttg tgc ttc tcc ata atg ata gag ttt Leu Val Leu Tyr Ala Ile Phe Leu Cys Phe Ser Ile Met Ile Glu Phe 575 580 585	1777
45	aac gtc ttt acc ttc gtc aac ttg ccg atg tgc cgg gaa gac gat tag Asn Val Phe Thr Phe Val Asn Leu Pro Met Cys Arg Glu Asp Asp 590 595 600	1825
50	cgctgagtcg cggtacctgg	1845
55	<210> 4 <211> 603 <212> PRT	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		

ES 2 314 252 T3

<400> 4

5	Met Ala Leu Arg Gly Thr Leu Arg Pro Leu Lys Val Arg Arg Arg Arg	1 5 10 15
10	Glu Met Leu Pro Gln Gln Val Gly Phe Val Cys Ala Val Leu Ala Leu	20 25 30
15	Val Cys Cys Ala Ser Gly Leu Phe Gly Ser Leu Gly His Lys Thr Ala	35 40 45
20	Ser Ala Ser Lys Arg Val Leu Pro Asp Thr Trp Arg Asn Arg Lys Leu	50 55 60
25	Met Ala Pro Val Asn Gly Thr Gln Thr Ala Lys Asn Cys Thr Asp Pro	65 70 75 80
30	Ala Ile His Glu Phe Pro Thr Asp Leu Phe Ser Asn Lys Glu Arg Gln	85 90 95
35	His Gly Ala Val Leu Leu His Ile Leu Gly Ala Leu Tyr Met Phe Tyr	100 105 110
40	Ala Leu Ala Ile Val Cys Asp Asp Phe Phe Val Pro Ser Leu Glu Lys	115 120 125
45	Ile Cys Glu Arg Leu His Leu Ser Glu Asp Val Ala Gly Ala Thr Phe	130 135 140
50	Met Ala Ala Gly Ser Ser Thr Pro Glu Leu Phe Ala Ser Val Ile Gly	145 150 155 160
55	Val Phe Ile Thr His Gly Asp Val Gly Val Gly Thr Ile Val Gly Ser	165 170 175

ES 2 314 252 T3

	Ala Val Phe Asn Ile Leu Cys Ile Ile Gly Val Cys Gly Leu Phe Ala	
	180	185 190
5		
	Gly Gln Val Val Arg Leu Thr Trp Trp Ala Val Cys Arg Asp Ser Val	
	195	200 205
10		
	Tyr Tyr Thr Ile Ser Val Ile Val Leu Ile Val Phe Ile Tyr Asp Glu	
	210	215 220
15		
	Gln Ile Val Trp Trp Glu Gly Leu Val Leu Ile Ile Leu Tyr Val Phe	
	225	230 235 240
20		
	Tyr Ile Leu Ile Met Lys Tyr Asn Val Lys Met Gln Ala Phe Phe Thr	
	245	250 255
25		
	Val Lys Gln Lys Ser Ile Ala Asn Gly Asn Pro Val Asn Ser Glu Leu	
	260	265 270
30		
	Glu Ala Val Lys Glu Lys Pro Gln Tyr Gly Lys Asn Pro Val Val Met	
	275	280 285
35		
	Val Asp Glu Ile Met Ser Ser Ser Pro Pro Lys Phe Thr Phe Pro Glu	
	290	295 300
40		
	Ala Gly Leu Arg Ile Met Ile Thr Asn Lys Phe Gly Pro Arg Thr Arg	
	305	310 315 320
45		
	Leu Arg Met Ala Ser Arg Ile Ile Ile Asn Glu Arg Gln Arg Leu Ile	
	325	330 335
50		
	Asn Ser Ala Asn Gly Val Ser Ser Lys Pro Leu Gln Asn Gly Arg His	
	340	345 350
55		
60		
65		

ES 2 314 252 T3

	Glu Asn Ile Glu Asn Gly Asn Val Pro Val Glu Asn Pro Glu Asp Pro	
	355	360 365
5		
	Gln Gln Asn Gln Glu Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Glu	
	370	375 380
10		
	Pro Glu Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Ser Pro Phe Ser Val Pro Glu	
	385	390 395 400
15		
	Ala Arg Gly Asp Lys Val Lys Trp Val Phe Thr Trp Pro Leu Ile Phe	
		405 410 415
20		
	Leu Leu Cys Val Thr Ile Pro Asn Cys Ser Lys Pro Arg Trp Glu Lys	
		420 425 430
25		
	Phe Phe Met Val Thr Phe Ile Thr Ala Thr Leu Trp Ile Ala Val Phe	
		435 440 445
30		
	Ser Tyr Ile Met Val Trp Leu Val Thr Ile Ile Gly Tyr Thr Leu Gly	
		450 455 460
35		
	Ile Pro Asp Val Ile Met Gly Ile Thr Phe Leu Ala Ala Gly Thr Ser	
		465 470 475 480
40		
	Val Pro Asp Cys Met Ala Ser Leu Ile Val Ala Arg Gln Gly Leu Gly	
		485 490 495
50		
	Asp Met Ala Val Ser Asn Thr Ile Gly Ser Asn Val Phe Asp Ile Leu	
		500 505 510
55		
	Val Gly Leu Gly Val Pro Trp Gly Leu Gln Thr Met Val Val Asn Tyr	
		515 520 525
60		
65		

ES 2 314 252 T3

Gly Ser Thr Val Lys Ile Asn Ser Arg Gly Leu Val Tyr Ser Val Val
530 535 540

5

Leu Leu Leu Gly Ser Val Ala Leu Thr Val Leu Gly Ile His Leu Asn
545 550 555 560

10

Lys Trp Arg Leu Asp Arg Lys Leu Gly Val Tyr Val Leu Val Leu Tyr
565 570 575

15

Ala Ile Phe Leu Cys Phe Ser Ile Met Ile Glu Phe Asn Val Phe Thr
580 585 590

20

Phe Val Asn Leu Pro Met Cys Arg Glu Asp Asp
595 600

25

30 <210> 5

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebadora sintetizada artificialmente.

40

<400> 5

caggaattcc accatggcgc tccgcgggac cctc

34

45

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebadora sintetizada artificialmente.

55

<400> 6

ccaggtaccg cgactcagcg ctaatcg

27

60

<210> 7

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebadora sintetizada artificialmente.

ES 2 314 252 T3

<400> 7
atgccttggc catagtgtgc gatg 24

5 <210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebadora sintetizada artificialmente.

15 <400> 8
ctgctcacac cattggccga gttg 24

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65