



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 964**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/16 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99926320 .5**

(86) Fecha de presentación : **18.05.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1086225**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

(54) Título: **Hormona polipeptídica derivada de tumor humano fosfatona.**

(30) Prioridad: **18.05.1998 GB 9810681**
04.09.1998 GB 9819387

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

(73) Titular/es: **University College London**
Rowland Hill Street
London NW3 2PF, GB

(72) Inventor/es: **Rowe, Peter**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

DESCRIPCIÓN

Hormona polipeptídica derivada de tumor humano fosfatona.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un polipéptido que está implicado en la regulación del metabolismo del fósforo, en particular en la regulación por incremento del cotransporte de fósforo dependiente de sodio. Más específicamente, la presente invención se refiere a un polipéptido novedoso, elemento fosfatúrico excretado de tumor metastásico (MEPE) o "fosfatona". Esta invención se refiere también a genes y polinucleótidos que codifican para polipéptidos de fosfatona, así como a vectores, células huésped, anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de fosfatona, y a los métodos recombinantes para producir los mismos. También se describen métodos de diagnóstico para detectar trastornos que se relacionan con el metabolismo del fósforo, y métodos terapéuticos para tratar tales trastornos. Se describen además en el presente documento métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de la fosfatona.

Se citan varios documentos durante todo el texto de esta memoria descriptiva. Sin embargo, no existe reconocimiento de que ningún documento citado sea de hecho técnica anterior con respecto a la presente invención.

20 **Antecedentes de la invención**

El fósforo desempeña un papel central en muchos de los procesos básicos esenciales de la célula y la mineralización ósea. En particular, la mineralización esquelética es dependiente de la regulación del fósforo y calcio en el cuerpo y cualquier alteración en la homeostasis fósforo-calcio puede tener repercusiones graves sobre la integridad ósea. En el riñón, el fósforo se pierde pasivamente en el filtrado glomerular y se reabsorbe activamente por medio de un cotransportador de fósforo dependiente de sodio (Na^+). En el intestino, el fósforo se reabsorbe a partir de los alimentos. Se descubrió que se expresaba un cotransportador de fósforo dependiente de sodio (Na^+) en el intestino y se clonó recientemente (Hilfiker, PNAS 95(24) (1998), 14564-14569). El hígado, piel y riñón están implicados en la conversión de la vitamina D3 a su metabolito activo, calcitriol, que desempeña un papel activo en el mantenimiento del equilibrio de fósforo y mineralización ósea.

La carencia de vitamina D provoca raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Ambos estados se caracterizan por fallo en la calcificación del osteoide, que es la matriz del hueso. Existen también varios estados no alimenticios que pueden conducir a raquitismo, incluyendo raquitismo hipofosfatémico resistente a vitamina D ligado al cromosoma X (HYP), hipercalcemia hereditaria con raquitismo hipofosfatémico (HHRH), enfermedad de Dent incluyendo ciertos tipos de síndrome de Fanconi renal, deficiencia en alfa-hidroxilasa renal 1 (VDDR I), defectos en el receptor de la 1,25-dihidroxi vitamina D3 (resistencia del órgano final, VDDR II), y osteomalacia hipofosfatémica oncogénica (OHO). Por tanto, se han caracterizado varias enfermedades familiares que dan como resultado trastornos de la captación de fósforo, metabolismo de la vitamina D y mineralización ósea. Recientemente se ha clonado y caracterizado un gen que es defectuoso en pacientes con raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (PHEX) (Francis, Nat. Genet. 11 (1995), 130-136; Rowe, Hum. Genet. 97 (1996), 345-352; Rowe, Hum. Mol. Genet. 6 (1997), 539-549). El gen PHEX es una glicoproteína de tipo II y un miembro de una familia (M13), de metaloendopeptidasas de Zn. Se propone que PHEX funciona mediante el procesamiento de un factor que desempeña un papel en la homeostasis del fósforo y la mineralización esquelética (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Rowe, Current Opinión in Nephrology & Hypertension 7(4) (1998), 367-376). La osteomalacia hipofosfatémica oncogénica (OHO), tiene muchas semejanzas a HYP con una patofisiología coincidente, pero defectos primarios diferentes (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Rowe, Current Opinión in Nephrology & Hypertension 7(4) (1998), 367-376; Drezner in Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (ed. Favus, M. J.) 184-188 (Am. Soc. Bone and Min. Res., Kelseyville, CA, 1990)). La osteomalacia es el equivalente adulto al raquitismo, y una característica clave de la osteomalacia adquirida por tumores es el ablandamiento de los huesos. Los huesos ablandados se hacen deformes, dando como resultado piernas arqueadas y otros cambios asociados reminiscentes de raquitismo familiar. Son también características clave compartidas con HYP fósforo en suero bajo, y metabolismo de vitamina D anormal. La osteomalacia adquirida por tumores es rara, y los tumores son principalmente de origen mesenquimal, aunque se han notificado también varios tipos de tumores diferentes (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Francis, Baillieres Clinical Endocrinology and metabolism 11 (1997), 145-163; Ioakimidis, The J. Rheumatology 21(6) (1994), 1162-1164; Lyles, Ann. Intern. Med. 93 (1980), 275-278; Rowe, Hum. Genet. 94 (1994), 457-467; Shane, Journal of bone and Mineral Research 12 (1997), 1502-1511; Weidner, Cancer 59 (1987), 1442-1442). La eliminación quirúrgica del tumor(es) cuando es posible, da como resultado la desaparición de estos síntomas y la curación del hueso, sugiriendo el papel de un factor(es) fosfatúrico circulante en la patogénesis de la enfermedad. También, el hetero-trasplante de tumores en ratones desnudos (Miyauchi, J. Clin. Endocrinol. Metab. 67 (1988), 46-53), la infusión de extractos salinos en ratas y perros (Aschinger, J. Paediatr. 91 (1977), 56-60; Popovtzer, Clin. Res. 29 (1981), 418A (Resumen)), y el uso de medio acondicionado del tumor (TCM), de líneas de células renales animales confirman todos que estos tumores secretan un factor fosfatúrico circulante.

Aunque el defecto primario en raquitismo ligado al cromosoma X se confirma como una metaloendopeptidasa de Zn mutada (PHEX), existen considerables pruebas que implican al factor(es) fosfatúrico circulante (Ecarot, J. Bone Miner. Res. 7 (1992), 215-220; Ecarot, J. Bone Miner. Res. 10 (1995), 424-431; Morgan, Arch. Intern. Med. 134 (1974), 549-552; Nesbitt, J. Clin. Invest. 89 (1992), 1453-1459; Nesbitt, J. Bone. Miner. Res. 10 (1995), 1327-1333; Nesbitt, Endocrinology 137 (1996), 943-948; Qiu, Genet. Res., Camb. 62 (1993), 39-43; Lajeunesse, Kidney Int. 50

(1996), 1531-1538; Meyer, J. Bone. Miner. Res. 4(4) (1989), 523-532; Meyer, J. Bone. Miner. Res. 4 (1989), 493-500). De la patofisiología coincidente de HYP y OHO surge la fascinante posibilidad de que el factor del tumor pueda procesarse en sujetos normales mediante el producto del gen PHEX. También, es probable que el procesamiento proteolítico mediante PHEX pueda actuar o bien degradando este factor(es) fosfatúrico no definido, o bien activando una cascada de conservación de fosfato (Carpenter, Pediatric Clinics of North America 44 (1997), 443-466; Econs, Am. J. Physiol. 273 (1997), F489-F498; Glorieux, Arch. Pediatr. 4 (1997), 102s-105s; Grief, Current Opinion in Nephrology & Hypertension 6 (1997), 15-19; Hanna, Current Therapy in Endocrinology & Metabolism 6 (1997), 533-540; Kumar, Nephrol. Dial. Transplant. 12 (1997), 11-13; Takeda, Ryoikibetsu Shokogun Shirizu (1997), 656-659). La clonación y caracterización del factor fosfatúrico del tumor es por tanto un prerrequisito para establecer cualquier vínculo entre osteomalacia tumoral y raquitismo familiar ligado al cromosoma X así como otros trastornos en el metabolismo del fosfato.

Rowe *et al* (1996) han notificado proteína(as) de 56 y 58 kDa candidatas responsables de la mediación de defectos renales en OHO (Rowe, Bone 18, (1996), 159-169). Se trató un paciente con OHO mediante eliminación del tumor y se usaron antisueros pre- y post-operatorios del paciente en una indentificación por inmunotransferencia de proteínas de los medios acondicionados del tumor. Ni las células tumorales ni los antisueros estuvieron nunca disponibles para el público, sin embargo.

En una revisión en Exp. Nephrol. 5 (1997), 335-363, Rowe (1997) trata las enfermedades anteriores y el papel del gen PHEX (previamente conocido como gen PEX). Se ha identificado el producto del gen PHEX como una metaloproteinasa de zinc. En estados de enfermedad tales como raquitismo familiar, PHEX defectuoso da como resultado fosfatonina no escindida que dará como resultado regulación por disminución del cotransportador de fosfato dependiente de sodio y regulación por incremento de la 24-hidroxilasa mitocondrial renal. Sin embargo, Rowe (1997) no notificó purificación de fosfatonina. Por tanto, no se hizo disponible al público material fuente de fosfatonina. Además, no ha sido posible la purificación, identificación y caracterización de la fosfatonina.

Por tanto, hay una necesidad de polipéptidos que regulen el metabolismo del fosfato, ya que las alteraciones de tal regulación pueden estar implicadas en enfermedades hipo- e hiperfosfatémicas, incluyendo osteomalacia, particularmente osteoporosis e insuficiencia renal. Además, hay una necesidad de identificar y caracterizar tales polipéptidos que puedan desempeñar un papel en la detección, prevención y/o corrección de tales trastornos y puedan ser útiles para diagnosticar esos trastornos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que codifican al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 (figura 8);
- (b) polinucleótidos que comprenden la secuencia codificante tal como se describe en la SEQ ID NO: 1 (figura 8) que codifican al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido;
- (c) polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido de (a) o (b) que codifican para un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (d) polinucleótidos que codifican para un polipéptido cuya secuencia tiene una identidad del 60% o más con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por un polinucleótido de (a) o (b), en los que dicho polipéptido regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (e) polinucleótidos que codifican para un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d), en los que dicho fragmento regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (f) polinucleótidos que codifican para una parte que lleva un epítipo de un polipéptido de fosfatonina que comprende los residuos de aminoácidos desde 1 hasta 40, desde 141 hasta 180 y/o desde 401 hasta 429 en la SEQ ID NO: 2 (figura 8); y
- (g) polinucleótidos cuya secuencia de nucleótidos está degenerada como resultado del código genético hasta una secuencia de nucleótidos de un polinucleótidos de uno cualquiera de (a), (b), (e) o (f)

y los polinucleótidos codificantes. Dicho polipéptido se denomina también fosfatonina. Además, la presente invención se refiere a vectores, células huésped, anticuerpos, y métodos recombinantes para producir dichos polipéptidos y polinucleótidos. Se describen también en el presente documento métodos de diagnóstico para detectar trastornos relacionados con los polipéptidos, y métodos terapéuticos para tratar tales trastornos. La presente invención se refiere además a métodos de selección para identificar componentes de unión de fosfatonina. Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden dichos polipéptidos, a polinucleótidos, vectores o células huésped.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La figura 1 (a) y (b) muestran respectivamente cromatogramas con picos que contienen proteína de baja afinidad y alta afinidad a partir de una columna de concanavalina A.

Figura 2: Cromatograma de intercambio catiónico de fracciones a partir de la columna de concavalina A.

Figura 3: Predicción informática de la hidrofiliidad e hidrofobicidad de la fosfatonina.

Figura 4: Predicción informática de la antigenicidad de la fosfatonina.

Figura 5: Predicción informática de la flexibilidad de la fosfatonina

Figura 6: Predicción informática de la probabilidad de superficie de la estructura secundaria de la fosfatonina.

Figura 7: Predicción informática de la estructura secundaria de la fosfatonina.

Figura 8: Secuencia de ADNc completa (SEQ ID NO: 1) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) del clon de MEPE más grande aislado (pHO11.1). Los otros cinco clones aislados los abarca este clon más grande y todos los clones están en marco con el vehículo de clonación pBSCPT SK II-. Los cebadores usados para la PCR están destacados, y el número total de residuos es 430 y 1655 pb respectivamente. El vector de expresión procariota pCaln-EK contenía todos los residuos en marco desde el residuo V de MEPE, hasta el codón de parada (TAG) de MEPE, en 1291-93 pb. La secuencia de poliadenilación única AA{T/U}AAA está doblemente subrayada. La región de homología localizada compartida con DMA-1, DSSP, y OPN está subrayada en formato de línea ondulada (motivo MEPE C-terminal), los residuos RGD están encerrados en un elipsoide, el sitio de unión de glucosaminoglucano está encerrado en una caja (formato de línea completa), el sitio de tirosina cinasa está subrayado una vez, y los motivos de N-glucosilación están encerrados en cajas en formato de línea de puntos. Para una lista completa de motivos incluyendo caseína cinasa II, proteína cinasa C, etc. referirse por favor a la Tabla 1 de selección de prositos.

Figura 9: Predicción de la estructura secundaria de la estructura del péptido GCG para MEPE. La estructura principal de aminoácidos primaria se muestra como la línea central con curvas que indican regiones de giro predicho. Las regiones de hidrofiliidad/hidrofobicidad se representan como elipsoides y diamantes respectivamente y se indica el motivo RGD. Los sitios de N-glucosilación se representan como elipsoides sobre tallos (C-terminal), y la alfa hélice mediante regiones ondulantes sobre la estructura principal primaria.

Figura 10: Gráficos de barra que muestran la captación de fosfato en presencia de cantidades de MEPE que difieren: A. 92 ng/ml, B. 300 ng/ml, C. 500 ng/ml, y D. 1000 ng/ml. Las cajas de colina se refieren a resultados independientes de Na control con NaCl reemplazado por cloruro de colina. Las barras de error son EEM, y los valores P para la diferencia entre MEPE y control en C y D son <0,001. En el experimento A (92 ng/ml) P<0,05, y en B (300 ng/ml) P, 0,01. Los valores de N para A y B son 4, y para C y D 5 y 6 respectivamente. Se usó ANOVA seguido por la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Figura 11: Curva de dosis de la administración de MEPE y captación de fosfato con barras de error del EEM.

Figura 12: Análisis de semejanza de secuencia usando "sim" y herramientas lalnview matemáticas y de software (Duret, Comput. Appl. Biosci. 12 (1996), 507-510). En cada cálculo, la penalización por abertura de hueco se ajustó a 12, y la penalización por extensión de hueco a 4. La matriz de comparación para A fue "PAM40", y BLOSUM62 para B y C respectivamente (véase Duret, Comput. Appl. Biosci. 12 (1996), 507-510; Huang, Comput. Appl. Biosci. 8 (1992), 155-165; Huang, Comput. Appl. Biosci. (1990) 6, 373-381). El umbral de puntuación de semejanza fue el 70% en A, y el 40% en B y C respectivamente. Los bloques resaltados mostrados en cada esquema de proteína representan homología de secuencia de >80% en A, y >62% en B y C. Obsérvese que en MEPE frente DSSP (A), hay cinco bloques de homología en DSSP de >80% de semejanza de secuencia respecto a un motivo único en MEPE (DSSESDSGSSSES). Una homología de secuencia similar es también evidente para DMA-1 y OPN frente a MEPE (B y C) y MEPE es una característica de todas las tres proteínas.

Figura 13: Comparación de matriz de puntos de DSSP frente a MEPE usando análisis estadístico Anthepont (Deleage, G. Software for protein analysis: Antherplot V2.5e. Microsoft group. (7 Passage du Vercours 69-367 Vercors Lyon Cedex 07, 1997)). En (A) se usa una comparación de rigurosidad inferior con un ajuste de ventana a 13 como parámetros de selección y en (B) se usa una ventana más ancha de 15. Los colores indican puntuaciones de la matriz unidad tal como se indica en el diagrama. Los residuos C-terminales del motivo MEPE tienen homología de secuencia >80% y la naturaleza de repetición del motivo se ilustra mediante el patrón de tiras.

Figura 14: Plásmidos recombinantes p1BL21 y también p6XL1 que contienen un constructo de fusión de fosfatonina. LacI: (promotor lac); LIC: (secuencia de clonación independiente de ligación); EK: Sitio de escisión de la enterocinasa; trombina (secuencia diana de la trombina); Amp: Resistencia a ampicilina; Péptido Cal (secuencia peptídica de la calmodulina); fosfatonina (secuencia codificante de la fosfatonina).

Descripción detallada de la presente invención

En vista de la necesidad de medios diagnósticos y terapéuticos para el tratamiento de enfermedades relacionados con trastornos del metabolismo del fosfato en el cuerpo humano, el problema técnico de la invención es proporcionar medios y métodos para la modulación del metabolismo del fosfato que sean particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades minerales óseas y renales.

El problema técnico definido anteriormente se resuelve por la presente invención proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por consiguiente, en un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de fosfatonina tal como se describió en el presente documento.

A menos que se declare lo contrario, los términos usados en el presente documento se definen tal como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W., Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basle, Suiza, ISBN 3-906 390-13-6. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de ciertos términos usados durante toda esta memoria descriptiva.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en el presente documento para que signifiquen generalmente que se obtiene un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de impedir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) impedir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad; es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad; es decir, provocar la regresión de la enfermedad. La presente invención se dirige hacia pacientes en tratamiento con estados médicos relacionados con un trastorno del metabolismo del fosfato. Por consiguiente, un tratamiento de la invención implicará impedir, inhibir o aliviar cualquier estado médico relacionado con trastornos del metabolismo del fosfato.

En la presente invención, "aislado" se refiere a material eliminado de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si se produce de manera natural), y por tanto está alterado "por la mano del hombre" de su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede ser parte de un vector o una composición de materia, o puede estar contenido dentro de una célula, y está todavía (aislado) debido a que el vector, composición de materia, o célula particular no es el ambiente original del polinucleótido.

El polipéptido de fosfatonina según la presente invención tiene normalmente un peso molecular aproximado de 53 a 60 kDa, más preferiblemente 58-60 kDa, tal como se midió sobre SDS-PAGE, particularmente sobre un gel al 12,5% a pH 8,6 en tampón SDS de TRIS-Glicina, véase el ejemplo 1. Puede medirse un peso molecular aproximado de 200 kDa sobre bis-tris-SDS-PAGE a pH 7 usando un gel en gradiente al 4-12% con tampón de procesamiento MOPS. Es posible ver también sobre tal gel bandas de peso molecular inferior de 53 a 60 kDa. El polipéptido está generalmente glucosilado, y comprende preferiblemente fosfatonina en forma sustancialmente pura.

De manera sorprendente, se ha descubierto que la fosfatonina se puede obtener, tras la purificación según el protocolo dado en el ejemplo 1 a partir de células Saos-2, que están disponibles de la Colección europea de cultivos celulares bajo el número de depósito ECACC 89050205. Por consiguiente, se proporciona en el presente documento un uso de células Saos-2 o células HTB-96 para la producción de fosfatonina. Otras líneas de células transformadas o inmortalizadas pueden ser capaces de sobreexpresión de fosfatonina, tales como líneas de células óseas u osteoblastos transformados.

La presente invención describe también la caracterización y clonación de un gen que es un candidato para el factor fosfatúrico derivado de tumor descrito anteriormente y que se llama fosfatonina o MEPE (elemento fosfatúrico excretado por tumor metastásico). Para resumir, se usó la selección por expresión de una biblioteca de λ ZAPII-ADNc construida a partir de ARNm extraído de un tumor OHO usando antisuero específico frente al factor fosfatúrico del medio acondicionado del tumor (TCM). La proteína está glucosilada y se resuelve como dos bandas sobre la electroforesis de SDS-PAGE (58-60 kDa), lo que evidencia corte y empalme o escisión post traduccional posibles. El ADNc clonado codifica para una proteína de 430 residuos (SEQ ID NO: 2) y de 1655 pb de longitud (SEQ ID NO: 1). Está presente el extremo 3' completo del gen, faltando parte del extremo 5'. La proteína de fusión que contiene 10 residuos de β -galactosidasa es altamente potente en la inhibición del cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺ en una línea de células renales humanas (CL8). La predicción de la estructura secundaria confirma que la proteína es altamente hidrófila con pequeñas regiones de hidrofobicidad localizadas y sin residuos de cisteína. Están presentes varias regiones helicoidales, con dos motivos de N-glucosilación distintos en el extremo carboxilo. Una característica clave es la presencia de una secuencia de unión a la célula en el mismo contexto estructural encontrado en la osteopontina. Los sitios proteolíticos adyacentes a este motivo pueden dar como resultado una especificidad de receptor alterada para integrinas específicas tal como se encontró en la osteopontina. La selección de la base de datos trembl con la secuencia MEPE demostró también homología de secuencia con la fosforina dentinaria (DPP). En particular hay una homología de residuos localizados asombrosa en el extremo C' de MEPE con DPP, la proteína 1 de la matriz de dentina (DMA-1) y la osteopontina (OPN). Esta región de MEPE contiene una serie recurrente de residuos de aspartato y serina (DDSSSESDSGSSSESD), con el 80%, el 65% y el 62% de homología con DSP, DMA-1 y OPN

respectivamente. Además, cuando se considera el carácter fisicoquímico del residuo, esta homología asciende al 93%, sugiriendo una funcionalidad biológica compartida o relacionada. Es también de resaltar que este motivo estructural se superpone con un motivo de fosforilación de caseína cinasa II en MEPE. La actividad de la caseína cinasa II esquelética es defectuosa en raquitismo, y da como resultado infrafosforilación de osteopontina (Rifas, *Calcif. Tissue Int.* 61 (1997), 256-259). Se ha propuesto por tanto que el defecto en caseína cinasa II desempeña un papel en la inframineralización de la matriz ósea (Rifas, loc. cit.).

La fosforina dentinaria (DPP) es una parte de un producto de escisión derivado de la sialofosfoproteína dentinaria (DSSP), con la otra parte conocida como sialoproteína dentinaria (DSP) (MacDougall, *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 835-842). Es de particular interés DSSP, DMA-1, OPN y MEPE son RGD que contienen fosfoglicoproteínas con semejanzas estructurales distintas y papeles principales en la mineralización ósea del diente (Linde, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4 (1993), 679-728).

El nuevo factor fosfatúrico derivado de tumor OHO llamado fosfatónina o MEPE descrito en la presente invención, efectúa homeostasis mineral ósea regulando el cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺, el metabolismo de la vitamina D y la mineralización ósea.

Como se expone en más detalle a continuación, se ha aislado un polinucleótido que codifica para polipéptidos según la presente invención; véase el ejemplo 2. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de fosfatónina se exponen en la figura 8 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). Por consiguiente, el polipéptido de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de la figura 8, incluyendo opcionalmente mutaciones o deleciones que no afectan sustancialmente a la actividad de la misma. Tales mutaciones incluyen la sustitución de uno o más aminoácidos, particularmente por homólogos de los mismos, así como adiciones de uno o más aminoácidos, especialmente en los extremos N o C. Las deleciones incluyen deleciones de los extremos N o C. Son posibles sustituciones tanto por aminoácidos que se producen de manera natural como sintéticos. También se incluyen polipéptidos modificados por modificación química o modificación enzimática. Además, se incluyen dentro del alcance de esta invención fragmentos de péptidos, ya sean sintetizados químicamente o producidos por un método biológico, ya sean modificados o no modificados.

Por consiguiente la presente invención se refiere a un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) polinucleótidos que codifican al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 (figura 8);

(b) polinucleótidos que comprenden la secuencia codificante tal como se describe en la SEQ ID NO: 1 (figura 8) que codifica al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido;

(c) polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido de (a) o (b) que codifican para un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;

(d) polinucleótidos que codifican para un polipéptido cuya secuencia tiene una identidad del 60% o más con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por un polinucleótido de (a) o (b), en los que el polipéptido regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;

(e) polinucleótidos que codifican para un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d), en los que dicho fragmento regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;

(f) polinucleótidos que codifican para una parte que lleva un epítipo de un polipéptido de fosfatónina que comprende los residuos de aminoácidos desde 1 hasta 40, desde 141 hasta 180 y/o desde 401 hasta 429 en la SEQ ID NO: 2 (figura 8); y

(g) polinucleótidos cuya secuencia de nucleótidos está degenerada como resultado del código genético hasta una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de uno cualquiera de (a), (b), (e) o (f).

Tal como se usa en el presente documento, un “polinucleótido” de fosfatónina se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en la SEQ ID NO: 1 o que codifica para el polipéptido de fosfatónina de la presente invención. Por ejemplo, el polipéptido de fosfatónina puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de longitud completa, incluyendo las secuencias no traducidas en 5' y 3', la región codificante, así como fragmentos, epítopos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico.

Además, tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido” de fosfatónina se refiere a una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos traducida generada a partir del polinucleótido tal como se definió en líneas generales.

Un “polinucleótido” de fosfatónina incluye también aquéllos polinucleótidos que pueden hibridar, en condiciones de hibridación rigurosas, con secuencias contenidas en la SEQ ID NO: 1 o el complemento de la misma. “Condiciones

de hibridación rigurosas” se refiere a una incubación durante toda la noche a 42°C en una solución que comprende formamida al 50%, SSC 5X (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10%, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado, seguido por lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65°C. Se describen en los ejemplos condiciones de hibridación adecuadas adicionales.

Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de la señal se logran principalmente por la manipulación de la concentración de formamida (porcentajes inferiores de formamida dan como resultado rigurosidad disminuida); condiciones salinas, o temperatura. Por ejemplo, las condiciones de rigurosidad inferior incluyen una incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende SSPE 6X (SSPE 20X = NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), SDS al 0,5%, formamida al 30%, 100 µg/ml de ADN bloqueante de esperma de salmón; seguido por lavados a 50°C con SSPE 1X, SDS al 0,1%. Además, para lograr incluso una rigurosidad inferior, pueden hacerse lavados realizados tras la hibridación rigurosa a concentraciones salinas superiores (por ejemplo SSC 5X). Obsérvese que las variaciones en las condiciones anteriores pueden lograrse por la inclusión y/o sustitución de reactivos bloqueantes alternos usados para suprimir el fondo en experimentos de hibridación. Los reactivos bloqueantes normales incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas comercialmente disponibles. La inclusión de reactivos bloqueantes específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad. Por supuesto, un polinucleótido que hibride sólo con secuencias de poliA+ (tales como cualquier extensión de poliA+ 3' terminal de un ADNc mostrado en la lista de secuencias), o con un tramo complementario de residuos de T (o U), no estaría incluido en la definición de “polinucleótido”, ya que tal polinucleótido hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contuviese un tramo de poli (A) o el complemento del mismo (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc de doble cadena).

El polinucleótido de fosfatona puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificados o ARN o ADN modificados. Por ejemplo, los polinucleótidos de fosfatona pueden estar compuestos de ADN de cadena única y doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena única y doble, ARN de cadena única y doble, y ARN que es una mezcla de regiones de cadena única y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena única o, más normalmente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena única y doble. Además, los polinucleótidos de fosfatona pueden estar compuestos de regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos de fosfatona pueden contener también una o más bases modificadas o estructuras principales de ADN o ARN modificadas para estabilidad o para otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco comunes tales como inosina. Pueden hacerse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, “polinucleótido” abarca formas química, enzimática, o metabólicamente modificadas.

Los polipéptidos de fosfatona pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos de fosfatona pueden modificarse o bien mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o bien mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una bibliografía de investigación voluminosa. Pueden producirse modificaciones en cualquier lugar en el polipéptido de fosfatona, incluyendo la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en los mismos grados o variables en varios sitios en un polipéptido de fosfatona dado. También, un polipéptido de fosfatona dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos de fosfatona pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos de fosfatona cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales de postraducción o pueden prepararse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yoduración, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación; véase, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman y compañía, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York (1983), páginas 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62. Por ejemplo, es posible expresar la fosfatona como una preproteína y tras el procesamiento de la presecuencia y opcionalmente la prosecuencia, se escinde en dos o más fragmentos que se mantienen juntos debido a la formación de, por ejemplo, enlaces de hidrógeno. El procesamiento y/o escisión del prepolipéptido e incluso la forma madura del polipéptido de fosfatona pueden estar acompañados por la pérdida de uno o más aminoácidos en el sitio de escisión. Se entiende que todas las formas de ese tipo de la proteína fosfatona están abarcadas por el término “polipéptido de fosfatona”, “polipéptido” o “proteína”.

“SEQ ID NO: 1” se refiere a un polinucleótido de fosfatona mientras que “SEQ ID NO: 2” se refiere a una secuencia de polipéptido de fosfatona.

Un polipéptido de fosfatona "que tiene actividad biológica" se refiere a polipéptidos que muestran similar actividad, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido de fosfatona tal como se mide en un ensayo biológico particular tal como se describe a continuación con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que existe dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la del polipéptido de fosfatona, pero sustancialmente bastante similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada tal como en comparación con el polipéptido de fosfatona (es decir, el polipéptido candidato mostrará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menor y, preferiblemente, no más de aproximadamente una actividad 10 veces menor, y lo más preferiblemente, no más de aproximadamente una actividad tres veces menor en relación con el polipéptido de fosfatona).

El término "inmunológicamente activo" o "actividad inmunológica" se refiere a fragmentos, análogos y derivados del polipéptido de fosfatona de la invención cuyas propiedades inmunológicas características esenciales se mantienen no afectadas en el tipo, es decir, los polinucleótidos de la invención incluyen todas las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas o péptidos que tienen al menos una parte de la conformación estructural primaria y/o secundaria para uno o más epítopos capaz de reaccionar específicamente con anticuerpos únicos contra proteínas fosfatona que se pueden codificar por un polinucleótido tal como se expuso anteriormente. Preferiblemente, los péptidos y proteínas codificados por un polinucleótido de la invención son reconocidos por un anticuerpo que reacciona específicamente con un epítipo del polipéptido de fosfatona que comprende los residuos de aminoácidos aproximadamente de 20 a 30, de 100 a 130, de 145 a 160, de 300 a 310, de 320 a 340 o de 380 a 430 de la SEQ ID NO: 2 o con un epítipo de los polipéptidos de fosfatona descritos a continuación en el presente documento. Los residuos 380-430 de péptidos/anticuerpos son particularmente útiles para el estudio de los procesos de mineralización, los residuos 145-160 de péptidos/anticuerpos para el estudio de interacciones ligando-receptor (integrinas, etc.) y los residuos 20-30 y 100-130, son de particular interés para estudios de regulaciones de fosfato.

Preferiblemente, los fragmentos, análogos y derivados peptídicos de fosfatona inmunológicamente activos del polipéptido de fosfatona de la invención pueden provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, preferiblemente en un ratón o rata.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fosfatona es biológicamente activo porque puede regular o modular el metabolismo del fosfato, en particular, regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio.

Actividad de la fosfatona

El término "que puede regular o modular el metabolismo del fosfato" tal como se usa en el presente documento significa que la presencia o ausencia, es decir, el nivel del polipéptido de fosfatona de la invención en un sujeto modula el cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺, el metabolismo de la vitamina D y/o la mineralización ósea. En particular, el polipéptido de la presente invención regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺, regula por disminución la 25-hidroxi vitamina D 3-24 hidroxilasa y/o regula por incremento la 25 hidroxi-D-1- α -hidroxilasa. Dependiendo de si las actividades mencionadas están reguladas por incremento o disminución mediante el polipéptido de la invención, dicha "capacidad de regular o modular el metabolismo del fosfato" denominado en lo sucesivo "actividad de la fosfatona" y "actividad de anti-fosfatona", respectivamente.

La actividad de la fosfatona puede medirse mediante ensayo de rutina, particularmente tal como la capacidad de regular por disminución el cotransporte de fosfato dependiente de sodio y/o regular por incremento la 25-hidroxi vitamina D 3-24 hidroxilasa renal y/o regular por disminución la 25-hidroxi-D-1- α -hidroxilasa. En cada caso, la regulación de la actividad de la enzima relevante puede realizarse directa o indirectamente mediante la fosfatona; por ejemplo, mediante la medida de la captación de fosfato dependiente de Na radiactivo. Estas actividades pueden someterse a ensayo usando una línea de células renales adecuadas tal como CL8 u OK (depositada en la Colección europea de cultivos celulares bajo el número ECACC 91021202). Se encuentra una metodología de ensayo adecuada en Rowe *et al* (1996). La actividad de la fosfatona puede medirse además mediante la capacidad de estimular la mineralización mediada por osteoblastos en cultivos de tejido; véase, por ejemplo, Santibanez, Br. J. Cancer 74 (1996), 418-422; Stringa, Bone 16 (1995), 663-670; Aronow, J. Cell Physiol. 143 (1990), 213-221; o tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Habiendo dicho esto, el polipéptido de la presente invención tiene "actividad anti-fosfatona".

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un fragmento bioactivo del polipéptido descrito anteriormente. Sin pretender estar limitado por la teoría, se piensa que la fosfatona puede funcionar como una polihormona que puede escindirse *in vivo* para formar uno o más fragmentos al menos alguno de los cuales posee actividad biológica tal como actividad hormonal. Se piensa que la fosfatona puede escindirse proteolíticamente *in vivo*, por ejemplo mediante el producto del gen PHEX para producir al menos un fragmento funcional. En una realización preferida, el polipéptido que comprende el fragmento bioactivo puede regular el metabolismo del fosfato poseyendo la actividad opuesta de la fosfatona tal como se trata en más detalle a continuación. El fragmento bioactivo puede ser un fragmento N-terminal, C-terminal o interno. El polipéptido que comprende el fragmento bioactivo puede comprender además adicionalmente la secuencia de aminoácidos siempre que la actividad del fragmento bioactivo no se afecte sustancialmente.

Ventajosamente, el fragmento bioactivo tiene un motivo de unión a la célula que comprende preferiblemente RGD. Tal como se trata en más detalle a continuación, este motivo puede estar implicado en la interacción receptor y/o matriz

mineral ósea. Ventajosamente, el fragmento bioactivo tiene un motivo de unión a glucosaminoglucano, que comprende preferiblemente SGD (SEQ ID NO: 3). Se piensa que la unión de glucosaminoglucano permite al fragmento parecerse al proteoglucano. Se sabe que los proteoglucanos están implicados en la bioactividad ósea, particularmente en señalización celular. Estos motivos se analizan en mayor detalle a continuación.

La actividad de la fosfatona, sin pretender estar limitado por la teoría, se espera en fosfatona no escindida mediante metaloproteína PHEX y algunos fragmentos bioactivos que portan un sitio de escisión de metaloproteína PHEX tal como el sitio ADAVDVS (SEQ ID NO: 4) en el que se propone que la escisión se produce entre los residuos VD (residuos 235 y 236). El fragmento bioactivo puede comprender al menos los primeros 236 residuos de la secuencia de aminoácidos de la figura 8 de forma que este sitio de escisión de metaloproteína PHEX es parte del fragmento.

Proteínas relacionadas

Estudios adicionales realizados según la presente invención revelaron varias semejanzas distintas entre fosfatona (MEPE), proteína 1 de la matriz de dentina (DMP1), sialofosfoproteína dentinaria (DSSP; más específicamente el C-terminal de la fosforina dentinaria), sialoproteína ósea (BSP) y osteoproteína (OPN). En particular, todas las proteínas de la matriz mencionadas anteriormente tienen motivos RGD, están glucosiladas con contenidos de aspartato y serina anormalmente altos. Los motivos de fosforilación de la caseína cinasa II son una característica común y hay regiones localizadas de homología compartida entre cada una de las proteínas. Los análisis Lanview-sim con el software Swiss-prot (Duret, LALNVIEW: a graphical viewer for pairwise sequence alignments. Comput. Biosci. 12 (1996), 507-510) ilustran gráficamente las regiones de homología alta como comparaciones de matriz de puntos entre fosfatona y DSSP. El motivo se repite cinco veces en la parte de la fosforina dentinaria (DP) de DSSP (figura 12a), y este motivo tiene el 80% de homología con un resto C-terminal en la fosfatona. Basándose en parámetros fisicoquímicos, puede deducirse un 93% de homología y esta secuencia homóloga está presente en la otras moléculas óseas/dentinarias descritas con del 60% al 65% de semejanza de secuencia. Hay también en la misma región homología de secuencia extendida con una serie de residuos entre DMA-1 y fosfatona tal como se muestra en la tabla 2 y en la comparación de secuencia a continuación:

408 SSRRRDDSSSESDSGSSSESDG 429 MEPE (SEQ ID NO: 5)

443 SSRSKEDSN-STESKSSSEEDG 463 DMA-1 (SEQ ID NO: 6)

La sialofosfoproteína dentinaria (DSSP) es una glucoproteína grande que contiene RGD que se escinde *in vivo* para generar dos proteínas conocidas como sialoproteína dentinaria (DSP) y fosforina dentinaria (DP), respectivamente (MacDougall, J. Biol. Chem. 272 (1997), 835-842). DSP es el péptido N-terminal y DP el C-terminal y se pensaba originalmente que ambos eran derivados de genes diferentes. Se muestra en la figura 13 una comparación estadística de matriz de puntos de fosfatona frente a DSSP en comparación de rigurosidad alta y baja. La naturaleza repetida del "motivo homólogo" (DSSESDSGSSSE (SEQ ID NO: 7)) en DSSP y su asombrosa homología se presenta claramente en ambas presentaciones gráficas. El motivo está presente sólo una vez en MEPE en el C-terminal. Además, se presenta claramente el nivel bajo global de semejanza de secuencia con la parte C-terminal de DSSP (o el componente DP). Se cree por tanto que se ha descubierto ahora una característica "única" novedosa que es probable que desempeñe un papel en las interacciones hueso-mineral en clases de proteínas de la matriz ósea-del diente.

En conclusión, todas las proteínas analizadas parecen formar asociaciones integrales con la matriz extracelular mineral ósea o del diente y se piensa que las interacciones están mediadas por medio de asociaciones integrina/RGD. Además, el nuevo motivo regional (rico en serinas y aspartatos) sería ideal para interacciones calcio fosfato. Por lo tanto, esto apoya la hipótesis de que el C-terminal de la fosfatona desempeña un papel en la homeostasis mineral ósea, y el N-terminal en la regulación del fosfato renal. En resumen, las características compartidas de las proteínas comprenden:

1. Motivo RGD en contexto estructural similar.
2. Glucoproteínas.
3. Rico en aspartato y serina.
4. Motivos de caseína cinasa y proteína cinasa.
5. Motivo MEPE rico en aspartato-serina distinto (repetido en DPP).
6. Gran número de motivos de fosforilación y motivos de miristoilación.
7. Pruebas de escisión y/o corte y empalme alternativo.
8. Asociadas todas con la matriz extracelular ósea o del diente.

Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fosfatónina comprende el motivo mineral óseo descrito anteriormente, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 ó 7 o una secuencia de aminoácidos correspondiente a la misma tal como la de las mencionadas proteínas DMP1, DSSP, BSP, OPN o DMA-1.

Fragmentos bioactivos

El polipéptido de la presente invención que comprende el fragmento bioactivo tiene la inversa de la actividad de la fosfatónina y puede ser adecuado para tratar estados hipofosfatémicos. En esta realización, el polipéptido puede regular por incremento directa o indirectamente el cotransporte de fosfato dependiente de sodio y/o regular por disminución la 25-hidroxi vitamina D 3-24-hidroxilasa y/o regular por incremento la 25-hidroxi-D-1 α -hidroxilasa. Las actividades mencionadas se denominarán también en el presente documento actividad “antifosfatónina”. Sin embargo, el uso del término actividad “anti-fosfatónina” no excluye la posibilidad de que dicha actividad sea la predominante de la fosfatónina genuina en el metabolismo del fosfato. Estas actividades “antifosfatónina” se pueden medir también fácilmente usando la metodología de Rowe *et al* (1996) mediante ensayo usando una línea de células renales adecuada tal como CL8 u OK (depositadas en la Colección europea de cultivos celulares bajo el número ECACC 91021202); véanse también los métodos referidos anteriormente y los ejemplos adjuntos. Por tanto, los polipéptidos de fosfatónina de la invención pueden probarse fácilmente para detectar actividad de fosfatónina o “antifosfatónina” según los métodos referidos anteriormente o descritos adicionalmente en el presente documento, por ejemplo, en los ejemplos adjuntos. Preferiblemente, el fragmento se puede obtener mediante escisión proteolítica de fosfatónina por una metaloproteínasa PHEX. Se ha clonado un gen PHEX y se ha descubierto que codifica para una metaloproteínasa de zinc tal como se analizó en Rowe (1997). De nuevo, sin pretender estar limitado por la teoría, se piensa que los fragmentos estructuralmente bioactivos que tienen estas actividades carecen de al menos una parte de la parte N o C terminal de la secuencia de aminoácidos de la figura 8, preferiblemente que carecen de la parte C terminal hasta al menos el supuesto sitio de escisión de la metaloproteínasa PHEX en los residuos 235/236. Este polipéptido por lo tanto comprende preferiblemente no más de aproximadamente los primeros 235 residuos de la secuencia de aminoácidos de la figura 8.

Tal como se explica en el ejemplo 4, el polipéptido de fosfatónina de la invención se clonó por medio del uso de una biblioteca de expresión, en la que el ADNc diana se fusiona con una parte de la enzima β -galactosidasa. En los ADNc obtenidos de esta forma no se incluyó la metionina N-terminal. Sin embargo, es tentador predecir que la fosfatónina genuina tiene una metionina N-terminal presente en su secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, en una realización del polipéptido de fosfatónina de la invención la secuencia de aminoácidos del polipéptido incluye el aminoácido Met añadido al N-terminal.

En otra realización, el polipéptido de la invención puede ser parte de una proteína de fusión. Esta realización se analizará adicionalmente a continuación.

La presente invención proporciona además un polinucleótido que codifica para un polipéptido de fosfatónina tal como se describe en el presente documento. Tal polinucleótido puede ser un ADN tal como un ADNc, o un ARN tal como ARNm o cualquier otra forma de ácido nucleico incluyendo derivados sintéticos o modificados y puede codificar para el polipéptido en una secuencia continua o en varias secuencias interrumpidas por secuencias intermedias. En cualquier forma que esté presente, el polinucleótido es un polinucleótido aislado porque está eliminado de su estado en que se produce de manera natural. Este aspecto de la invención se basa en la clonación del gen de la fosfatónina humana. En una realización preferida, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la figura 8, incluyendo opcionalmente una o más mutaciones o deleciones que no afectan sustancialmente la actividad del polipéptido codificado por el mismo. Tales mutaciones incluyen aquellas que surgen de la degeneración del código genético, así como los que dan origen a cualquiera de las mutaciones o deleciones de aminoácidos analizados anteriormente. Por consiguiente, mediante el empleo de técnicas de rutina para los expertos en biología molecular, es posible el uso de la secuencia de nucleótidos de la figura 8 para generar secuencias polinucleotídicas adecuadas que codifican para polipéptidos útiles en la presente invención. Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, la presente invención abarca también polinucleótidos de fosfatónina, en los que la secuencia de nucleótidos comprende deleciones de nucleótidos secuenciales de o bien el C-terminal o bien el N-terminal tal como las descritas en más detalle a continuación.

Extensión de la secuencia polinucleotídica de la invención

Tal como se trata en el ejemplo 4, el polinucleótido de fosfatónina obtenido mediante la biblioteca de expresión puede no ser de longitud completa en el extremo 5'. Las secuencias de polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de fosfatónina pueden extenderse por tanto utilizando secuencias de nucleótidos parciales y diversos métodos conocidos en la técnica para detectar secuencias en sentido 5' tales como elementos promotores y reguladores. Gobinda, (PCR Methods Applic. 2 (1993), 318-322) describe la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de “sitio de restricción” como un método directo que usa cebadores universales para reparar una secuencia desconocida adyacente a un locus conocido. Primero, se amplifica el ADN genómico en presencia de un cebador para una secuencia de ligador y un cebador específico para la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de ligador y otro cebador específico interno para el primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencia usando transcriptasa inversa.

Puede usarse PCR inversa para amplificar o extender secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988), 8186). Los cebadores pueden diseñarse usando el software de análisis de cebadores OLIGO® 4.06 (1992; National Biosciences Inc, Plymouth MN), u otro programa apropiado para que sean de 22-30 nucleótidos de longitud, tengan un contenido en GC de preferiblemente el 50% o más, y para que hibriden con la secuencia diana a temperaturas preferiblemente de aproximadamente 68-72°C. El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza después mediante ligación intramolecular y se usa como un molde de PCR.

La PCR de captura (Lagerstrom, *PCR Methods Applic.* 1 (1991), 111-119) es un método para amplificación por PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en, por ejemplo, ADN cromosómico artificial de levaduras humano. La PCR de captura requiere también múltiples digestiones con enzimas de restricción y ligaciones para colocar una secuencia de doble cadena modificada por ingeniería genética dentro de una parte desconocida de la molécula de ADN antes de la PCR.

Otro método que puede usarse para reparar secuencias desconocidas es el de Parker, (*Nucleic Acids Res.* 19 (1991), 3055-3060). Adicionalmente, se puede usar PCR, cebadores anidados y bibliotecas PromoterFinder para pasar por el ADN genómico (PromoterFinder™ Clontech (Palo Alto CA)). Este procedimiento evita la necesidad de seleccionar bibliotecas y es útil para encontrar uniones de intrón/exón. Las bibliotecas preferidas para seleccionar ADNc de longitud completa son las que se han seleccionado por tamaño para incluir ADNc más grandes. También, se prefieren bibliotecas preparadas aleatoriamente porque contendrán más secuencias que contengan el extremo 5' y regiones en sentido 5' de los genes. Una biblioteca preparada aleatoriamente puede ser particularmente útil si una biblioteca de oligo d(T) no produce un ADNc de longitud completa. Además, puede emplearse secuenciación directa de los productos de extensión del cebador. Las bibliotecas genómicas son útiles para la extensión en la región reguladora no traducida 5'. Puede usarse electroforesis capilar para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de los productos de la secuenciación o PCR; véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente. Están disponibles sistemas para secuenciación rápida de Perkin Elmer, Beckmann Instruments (Fullerton CA) y otras compañías.

Identificación asistida por ordenador de polipéptidos de fosfatona y sus genes codificantes

BLAST2, que significa Basic Local Alignment Search Tool (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica) (Altschul, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), 3389-3402; Altschul, *J. Mol. Evol.* 36 (1993), 290-300; Altschul, *J. Mol. Biol.* 215 (1990), 403-410), puede usarse para buscar alineamientos de secuencias locales. BLAST produce alineamientos tanto de secuencias de nucleótidos como de aminoácidos para determinar la semejanza de secuencia. Debido a la naturaleza local de los alineamientos, BLAST es especialmente útil para determinar apareamientos exactos o para identificar homólogos. La unidad fundamental de salida del algoritmo BLAST es el par de segmento de puntuación alta (HSP). Un HSP consiste en dos fragmentos de secuencia de longitudes arbitrarias pero iguales cuyo alineamiento es localmente máximo y para los que la puntuación de alineamiento cumple o excede un umbral o puntuación de corte ajustada por el usuario. El enfoque de BLAST es buscar HSP entre una secuencia interrogante y una secuencia de la base de datos, para evaluar la significatividad estadística de cualquier apareamiento encontrado, y para notificar sólo aquellos apareamientos que satisfagan el umbral de significatividad seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativo para notificar apareamientos de la secuencia de la base de datos. E se interpreta como el límite superior de la frecuencia esperada de posibilidad de existencia de un HSP (o conjunto de HSP) dentro del contexto de la búsqueda en la base de datos completa. Cualquier secuencia de la base de datos cuyo apareamiento satisfaga E se notifica en la salida del programa.

Se usan técnicas informáticas análogas usando BLAST (Altschul, 1997, 1993 y 1990, citado anteriormente) para buscar moléculas idénticas o relacionadas en bases de datos de nucleótidos tales como GenBank o EMBL. Este análisis es mucho más rápido que las hibridaciones basadas en membranas múltiples. Además, la sensibilidad de la búsqueda informática puede modificarse para determinar si cualquier apareamiento particular se categoriza como exacto u homólogo. La base de la búsqueda en la puntuación del producto que se define como:

$$\frac{\% \text{ de identidad de secuencia} \times \% \text{ de puntuación BLAST máxima}}{100}$$

y toma en consideración tanto el grado de semejanza entre dos secuencias como la longitud del apareamiento de secuencia. Por ejemplo, con una puntuación de producto de 40, el apareamiento será exacto dentro de un error del 1-2%; y a 70, el apareamiento será exacto. Se identifican normalmente moléculas homólogas seleccionando aquellas que muestren puntuaciones de producto entre 15 y 40, aunque puntuaciones inferiores pueden identificar moléculas relacionadas.

Los ejemplos de las diferentes aplicaciones posibles de los polinucleótidos y polipéptidos de fosfatona según la invención así como moléculas derivadas de ellos se describirán en detalle en la parte siguiente.

Polinucleótidos y polipéptidos de fosfatona

La fosfatona se aisló de una biblioteca de ADNc construida a partir de ARNm extraído de un tumor mesenquimal fosfatúrico meníngeo resecado de un paciente que padece osteomalacia hipofosfatémica oncogénica; véase el ejemplo 4.

La secuencia de nucleótidos de fosfatona identificada como SEQ ID NO: 1 se ensambló a partir de secuencias parcialmente homólogas ("solapantes") obtenidas de clones de ADN relacionados. Las secuencias solapantes se ensamblaron en una secuencia contigua única de redundancia alta (normalmente de tres a cinco secuencias solapantes en cada posición de nucleótido), dando como resultado una secuencia final identificada como SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 traducida son suficientemente exactas y de otra manera adecuadas para una variedad de usos bien conocidos en la técnica y descritos adicionalmente a continuación. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 es útil para diseñar sondas de hibridación de ácido nucleico que detectarán secuencias de ácido nucleico contenidas en la SEQ ID NO: 1. Estas sondas hibridarán también con moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, permitiendo de ese modo una variedad de métodos forenses y de diagnóstico de la invención. De manera similar, pueden usarse polipéptidos identificados a partir de la SEQ ID NO: 2 para generar anticuerpos que se unan específicamente a la fosfatona. No obstante, las secuencias de ADN generadas por reacciones de secuenciación pueden contener errores. Los errores existen como nucleótidos mal identificados, o como inserciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de ADN generada. Los nucleótidos insertados o deleccionados erróneamente provocan cambios de marco en los marcos de lectura de la secuencia de aminoácidos predicha. En estos casos, la secuencia de aminoácidos predicha diverge de la secuencia de aminoácidos real, incluso aunque la secuencia de ADN generada pueda ser superior al 99,9% idéntica a la secuencia de ADN real (por ejemplo, inserción o delección de una base en un marco de lectura abierto de más de 1.000 bases).

Por consiguiente, para aquellas aplicaciones que requieran precisión en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos, la presente invención proporciona no sólo la secuencia de nucleótidos generada identificada como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos traducida predicha identificada como SEQ ID NO: 2, sino que también puede significar la clonación del ADNc y ADN genómico correspondiente a la secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de los clones de fosfatona obtenidos de esta forma puede determinarse fácilmente secuenciando el clon según métodos conocidos. La secuencia de aminoácidos de la fosfatona predicha puede verificarse después a partir de tales clones de ADNc o genómicos. Además, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por los clones obtenidos puede determinarse también directamente mediante secuenciación peptídica o expresando la proteína en una célula huésped adecuada, recogiendo la proteína, y determinando su secuencia y función según los métodos descritos en el presente documento.

La presente invención se refiere también al gen de fosfatona correspondiente a la SEQ ID NO: 1. El gen de fosfatona puede aislarse según métodos conocidos usando la información de secuencia descrita en el presente documento. Tales métodos incluyen preparar sondas o cebadores de la secuencia descrita e identificar o amplificar el gen de fosfatona a partir de fuentes apropiadas de material genómico. También se proporciona en la presente invención homólogos de especie de la fosfatona. Pueden aislarse e identificarse homólogos de especie preparando sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en el presente documento y seleccionando una fuente de ácido nucleico adecuada para el homólogo deseado.

Por tanto, mediante la provisión de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 así como aquellas que codifican para la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, es posible aislar moléculas de ácido nucleico idénticas o similares que codifican para proteínas fosfatona de otras especies u organismos, en particular genes ortólogos de fosfatona de mamíferos diferentes del ser humano. El término "ortólogo" tal como se usa en el presente documento significa secuencias homólogas en especies diferentes que surgieron a partir de un gen antecesor común durante la especiación. Los genes ortólogos pueden ser o no responsables de una función similar; véase, por ejemplo, el glosario de "Trends Guide to Bioinformatics", Trends Supplement 1998, Elsevier Science.

Los polipéptidos de fosfatona pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos que se producen de manera natural aislados, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos de manera sintética, o polipéptidos producidos mediante una combinación de estos métodos. Los medios para la preparación de tales polipéptidos se entienden bien en la técnica.

Los polipéptidos de fosfatona se proporcionan preferiblemente en una forma aislada, y preferiblemente están sustancialmente purificados. Una versión producida de manera recombinante de un polipéptido de fosfatona, incluyendo el polipéptido secretado, puede purificarse sustancialmente mediante el método de una etapa descrito en Smith y Johnson, Gene 67 (1988), 31-40. Los polipéptidos de fosfatona pueden purificarse también a partir de fuentes naturales o recombinantes usando anticuerpos de la invención cultivados contra la proteína fosfatona en métodos que son bien conocidos en la técnica.

Variantes de polinucleótidos y polipéptidos

"Variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido de fosfatona, pero que conserva propiedades esenciales del mismo tales como la actividad inmunológica y preferiblemente la actividad biológica referida anteriormente. Generalmente, las variantes son globalmente estrechamente similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido de fosfatona.

Tales polinucleótidos comprenden aquéllos que codifican para fragmentos y en particular ortólogos de las proteínas fosfatona descritas anteriormente y difieren, por ejemplo, a modo de delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) y/o recombinación(es) o cualquier otra modificación(es) de aminoácidos y/o nucleótidos conocida en la técnica o bien solos o bien en combinación a partir de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente o su secuencia(s) de nucleótido subyacente. Los métodos para introducir tales modificaciones en las moléculas de ácido nucleico según la invención son bien conocidas por el experto en la técnica. Todos los fragmentos, análogos y derivados de ese tipo de la proteína de la invención se incluyen dentro del alcance de la presente invención, siempre que las propiedades inmunológicas y/o biológicas características esenciales tal como se definieron anteriormente se mantengan sin afectar en el tipo.

El término “variante” significa en este contexto que la secuencia de nucleótidos y su secuencia de aminoácidos codificada, respectivamente, de estos polinucleótidos difieren de las secuencias de los polinucleótidos y polipéptidos de fosfatona descritos anteriormente en una o más posiciones de nucleótidos y son altamente homólogos respecto a dichas moléculas de ácido nucleico. La homología se entiende que se refiere a una identidad de secuencia de al menos el 60%, aún más preferiblemente el 70%, particularmente una identidad de al menos el 80%, preferiblemente más del 90% y aún más preferiblemente más del 95%. Las desviaciones de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente pueden, por ejemplo, ser el resultado de sustitución(es), delección(es), adición(es), inserción(es) y/o recombinación(es) de nucleótidos; véase anteriormente. La homología puede implicar además que las moléculas de ácido nucleico respectivas o las proteínas codificadas sean funcional y/o estructuralmente equivalentes. Las moléculas de ácido nucleico que son homólogas respecto a las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y que son derivados de dichas moléculas de ácido nucleico son, por ejemplo, variaciones de dichas moléculas de ácido nucleico que representan modificaciones que tienen la misma función biológica, en particular proteínas codificantes con la misma o sustancialmente la misma función biológica. Puede haber variaciones que se producen de manera natural, tales como secuencias de otros mamíferos, o mutaciones. Estas mutaciones pueden producirse de manera natural o pueden obtenerse mediante técnicas de mutagénesis. Las variaciones alélicas pueden ser variantes alélicas que se producen de manera natural así como variantes producidas de manera sintética o modificadas por ingeniería genética; véase anteriormente.

Mediante un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, el 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia del polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica para el polipéptido de fosfatona. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos el 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, puede delecionarse o sustituirse con otro nucleótido hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia, o pueden insertarse en la secuencia de referencia varios nucleótidos hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. La secuencia interrogante puede ser una secuencia completa mostrada de la SEQ ID NO: 1, el ORF (marco de lectura abierto), o cualquier fragmento especificado tal como se describe en el presente documento.

Como una materia práctica, puede determinarse de manera convencional si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido es al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia de nucleótidos de la presente invención usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia interrogante (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominada alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245.) En un alineamiento de secuencia las secuencias interrogante y sujeto son ambas secuencias de ADN. Puede compararse una secuencia de ARN convirtiendo los U en T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tuple (múltiplo de orden k) = 4, penalización por apareamiento erróneo = 1, penalización por unión = 30, longitud del grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco 0,05, tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, la que sea más corta.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia interrogante debido a delecciones de 5' ó 3', no debido a delecciones internas, debe hacerse una corrección manual a estos resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' ó 3', en relación con la secuencia interrogante, se corrige el porcentaje de identidad calculando el número de bases de la secuencia interrogante que están en 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no están apareadas/alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia interrogante. Se determina si un nucleótido está apareado/alineado mediante los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB. Después, este porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente invención. Sólo las bases de los extremos 5' y 3' de la secuencia sujeto, tal como se muestran mediante el alineamiento FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia interrogante, se calculan para los fines de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia interrogante de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las delecciones se producen en el extremo 5' de la secuencia sujeto y por lo tanto, el

alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases desapareadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/número total de bases en la secuencia interrogante) así que se resta el 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes se aparearon perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia interrogante de 100 bases. Esta vez las deleciones son deleciones internas así que no hay bases en los extremos 5' ó 3' de la secuencia sujeto que no estén apareadas/alineadas con el interrogante. En este caso, el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, sólo las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia interrogante se corrigen manualmente. No se han de hacer otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Mediante un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, el 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos interrogante de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia interrogante excepto que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos interrogante. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos interrogante, puede insertarse, deleccionarse, añadirse o sustituirse hasta el 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia sujeto con otros aminoácidos. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una materia práctica, puede determinarse de manera convencional si cualquier molécula de polipéptido particular es al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia interrogante (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominada alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245.) En un alineamiento de secuencia las secuencias interrogante y sujeto son o bien ambas secuencias de nucleótidos o bien ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = PAM0, k-tuple (múltiplo de orden k) = 2, penalización por desapareamiento = 1, penalización por unión = 20, longitud del grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, tamaño de ventana = longitud de la secuencia, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco = 0,05, tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, la que sea más corta.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia interrogante debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, debe hacerse una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia sujeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias sujeto truncadas en los extremos N y C, en relación con la secuencia interrogante, se corrige el porcentaje de identidad calculando el número de residuos de la secuencia interrogante que son N- y C-terminales de la secuencia sujeto, que no están apareadas/alineadas con un residuo sujeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia interrogante. Se determina si un nucleótido está apareado/alineado mediante los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente invención. Sólo los residuos de los extremos N y C de la secuencia sujeto, que no están apareados/alineados con la secuencia interrogante, se consideran para los fines de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, sólo las posiciones de los residuos interrogantes fuera de los residuos N- y C-terminales más lejanos de la secuencia sujeto.

Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia interrogante de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones se producen en el extremo N de la secuencia sujeto y por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo N. Los 10 residuos desapareados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no apareados/número total de residuos en la secuencia interrogante) así que se resta el 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes se aparearon perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia interrogante de 100 bases. Esta vez las deleciones son deleciones internas así que no hay bases en los extremos N o C de la secuencia sujeto que no estén apareadas/alineadas con el interrogante. En este caso, el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, sólo las posiciones de los restos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia sujeto, tal como se muestra en el alineamiento FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia interrogante se corrigen manualmente. No se han de hacer otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Las variantes de fosfatonina pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Especialmente, se prefieren las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o deleciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido

codificado. Se prefieren variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, se prefieren también variantes en las que se sustituyen, delecionan, o añaden 5-10, 1-5, ó 1-2 aminoácidos en cualquier combinación. Pueden producirse variantes de polinucleótidos de fosfatona por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un huésped particular (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Las variantes de fosfatona que se producen de manera natural se llaman “variantes alélicas”, y se refieren a una de varias formas alternas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985) y versiones actualizadas). Estas variantes alélicas pueden variar en el nivel de plinucleótido y/o de polipéptido. Alternativamente, pueden producirse variantes que no se producen de forma natural mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Usando métodos conocidos de modificación de proteínas y tecnología de ADN recombinante, pueden generarse variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de fosfatona. Por ejemplo, pueden delecionarse uno o más aminoácidos del extremo N o extremo C de la proteína sin pérdida sustancial de la función biológica. Los autores de Ron, J. Biol. Chem. 268 (1993), 2984-2988, notificaron proteínas KGF variantes que tenían actividad de unión a heparina incluso después de delecionar 3, 8, o 27 residuos de aminoácidos amino-terminales. De manera similar, el interferón gamma mostraba actividad hasta 10 veces superior después de delecionar 8-10 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo de esta proteína. (Dobeli, J. Biotechnology 7 (1988), 199-216).

Además, pruebas abundantes demuestran que las variantes conservan a menudo una actividad biológica similar a la de la proteína que se produce de manera natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. Chem. 268 (1993); 22105-22111) realizaron análisis mutacional extenso de citocina humana IL-1a. Usaron mutagénesis aleatoria para generar por encima de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaban 2,5 cambios de aminoácidos por variante en toda la longitud completa de la molécula. Se examinaron mutaciones múltiples en cada posición de aminoácidos posible. Los investigadores descubrieron que “la mayoría de la molécula podía alterarse con poco efecto sobre o bien la actividad de unión o bien la actividad biológica”; véase el resumen. De hecho, sólo 23 secuencias de aminoácidos únicas, entre más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en actividad del tipo normal.

Además, incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N o extremo C de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, se conservarán todavía otras actividades biológicas. Por ejemplo, la capacidad de una variante de delección de inducir y/o unirse a anticuerpos que reconozcan la proteína se conservará probablemente cuando menos de la mayoría de los residuos de la proteína se eliminen del extremo N o del extremo C. Puede determinarse fácilmente si un polipéptido particular que carece de los residuos N- o C-terminales de una proteína mantiene tales actividades inmunogénicas mediante métodos convencionales descritos en el presente documento y conocidos de otra manera en la técnica. Además, usando el programa PESTFIND (Rogers, Science 234 (1986), 364-368), pueden identificarse secuencias PEST (ricas en prolina, ácido glutámico, serina, y treonina), que están presentes de manera característica en proteínas inestables. Tales secuencias pueden eliminarse de las proteínas de fosfatona con el fin de aumentar la estabilidad y opcionalmente la actividad de las proteínas. Los métodos para introducir tales modificaciones en las moléculas de ácido nucleico según la invención son bien conocidos por el experto en la técnica.

Por tanto, la invención incluye además variantes de polipéptidos de fosfatona que muestran actividad biológica sustancial. Tales variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas según normas generales conocidas en la técnica de manera que tengan poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, se proporciona orientación acerca de cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie, Science 247 (1990), 1306-1310, en el que los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia explota la tolerancia de sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso de evolución. Comparando secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. Por el contrario, las posiciones de aminoácidos en las que se han tolerado sustituciones por selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. Por tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos pueden modificarse mientras que se mantiene todavía la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia usa modificación por ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de selección de alanina (introducción de mutaciones de alanina únicas en cada resto de la molécula). (Cunningham and Wells, Science 244 (1989), 1081-1085) Las moléculas mutantes resultantes pueden probarse después para detectar actividad biológica.

Tal como declaran los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué es probable que los cambios de aminoácidos se permitan en ciertas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos más enterrados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que se conservan generalmente pocas características de cadenas laterales de superficie. Además, las sustituciones de aminoácidos conser-

vadoras toleradas implican reemplazamiento de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; reemplazamiento de los residuos hidroxilo Ser y Thr; reemplazamiento de los residuos ácidos Asp y Glu; reemplazamiento de los residuos amida Asn y Gln, reemplazamiento de los residuos básicos Lys, Arg, e His; reemplazamiento de los residuos aromáticos Phe, Tyr, y Trp, y reemplazamiento de los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly.

Además de la sustitución de aminoácidos conservadora, las variantes de fosfatona incluyen (i) sustituciones con uno o más de los residuos de aminoácidos no conservados, en los que los residuos de aminoácidos sustituidos pueden ser o no el codificado por el código genético, o (ii) sustitución por uno o más residuos de aminoácidos que tienen un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como un péptido de la región de fusión Fc de IgG, o secuencia líder o secretora, o una secuencia que facilita la purificación. Tales polipéptidos variantes se consideran que están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento. Por ejemplo, las variantes del polipéptido de fosfatona que contienen sustituciones de aminoácidos de aminoácidos cargados por otro aminoácido cargado o neutro, pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como menor agregación. La agregación de formulaciones farmacéuticas reduce tanto la actividad como aumenta el aclaramiento debido a la actividad inmunogénica del agregado: véase, por ejemplo, Pinckard, Clin. [0040] Exp. Immunol. 2 (1967), 331-340; Robbins, Diabetes 36 (1987), 838-845; Cleland, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10 (1993), 307-377.

Fragmentos de polinucleótidos y polipéptidos

En la presente invención, un “fragmento de polinucleótido” se refiere a un polinucleótido corto que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en la SEQ ID NO: 1. Los fragmentos de nucleótidos cortos son preferiblemente al menos de aproximadamente 15 nt, y más preferiblemente al menos de aproximadamente 20 nt, y aún más preferiblemente al menos de aproximadamente 30 nt, e incluso aún más preferiblemente, al menos de aproximadamente 40 nt de longitud. Un fragmento de “al menos 20 nt de longitud”, por ejemplo, se propone incluir 20 o más bases contiguas de la secuencia de ADNc contenida en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Estos fragmentos de nucleótidos son útiles como sondas y cebadores de diagnóstico tal como se trata en el presente documento. Por supuesto, se prefieren fragmentos mayores (por ejemplo, de 50, 150, 500, 600, 1000 nucleótidos).

Además, los ejemplos representativos de fragmentos de polinucleótido de fosfatona incluyen, por ejemplo, fragmentos que tienen una secuencia de aproximadamente un número de nucleótidos de 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300 ó 1301-1350 de la SEQ ID NO 1. En este contexto, “aproximadamente” incluye los intervalos particularmente enumerados, mayores o menores por varios (5, 4, 3, 2, ó 1) nucleótidos, en cualquier extremo o en ambos extremos. Preferiblemente, estos fragmentos codifican para un polipéptido que tiene actividad biológica. Más preferiblemente, estos polinucleótidos pueden usarse como sondas o cebadores tal como se trata en el presente documento.

En la presente invención, un “fragmento de polipéptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos corta contenida en la SEQ ID NO: 2. Los fragmentos de proteína pueden ser “independientes” o estar comprendidos dentro de un polipéptido mayor del cual el fragmento forma una parte o región, lo más preferiblemente como una región continua única. Los ejemplos representativos de fragmentos de polipéptido de la invención incluyen, por ejemplo, fragmentos de aproximadamente un número de aminoácidos de 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 102-120, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-320, o 321-340, 341-360, 361-380, 381-400 y 401-421 respecto al extremo de la región codificante. Además, los fragmentos de polipéptido pueden ser de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, ó 150 aminoácidos de longitud. En este contexto “aproximadamente” incluye los intervalos particularmente enumerados, mayores o menores de varios (5, 4, 3, 2, ó 1) aminoácido, en cualquier extremo o en ambos extremos.

Los fragmentos de polipéptido preferidos incluyen la proteína fosfatona que tiene una serie continua de residuos delecionados del extremo amino o carboxilo, o ambos. Por ejemplo, cualquiera de varios aminoácidos, que varían desde 1 hasta 60, pueden delecionarse del extremo amino del polipéptido de fosfatona. Similarmente, cualquiera de varios aminoácidos, que varían desde 1 hasta 30, pueden delecionarse del extremo carboxilo de la proteína fosfatona. Además, se prefiere cualquier combinación de las deleciones del extremo amino y carboxilo anteriores. Similarmente, se prefieren también fragmentos de polinucleótido que codifican para estos fragmentos de polipéptido de fosfatona.

Particularmente, las deleciones N-terminales del polipéptido de fosfatona pueden describirse por la fórmula general m-430, en la que m es un número entero desde 2 hasta 416 en la que m corresponde a la posición del resto de aminoácido identificado en la SEQ ID NO: 2.

Se prefieren también fragmentos de polipéptidos y polinucleótidos de fosfatona caracterizados por dominios estructurales o funcionales. Las realizaciones preferidas de la invención incluyen fragmentos que comprenden alfa-hélices y regiones que forman alfa-hélices (“regiones alfa”), láminas beta y regiones que forman láminas beta (“regiones beta”), giros y regiones que forman giros (“regiones de giro”), espirales y regiones que forman espirales (“regiones espirales”), regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones anfipáticas alfa, regiones anfipáticas beta, regiones flexibles, regiones que forman superficies, regiones de unión a sustrato, y regiones de alto índice antigénico. Tal como se expone en las figuras, tales regiones preferidas incluyen regiones alfa, regiones beta, regiones de giro de Garnier-

Robson, regiones alfa, regiones beta y regiones de giro de Chou-Fasman, regiones hidrófilas y regiones hidrófobas de Kyte-Doolittle, regiones anfipáticas alfa y beta de Eisenberg, regiones flexibles de Karplus-Schulz, regiones que forman superficies de Emini, y regiones de alto índice antigénico de Jameson-Wolf. Los fragmentos de polipéptido de la SEQ ID NO: 2 que están dentro dominios conservados se contemplan específicamente por la presente invención y se muestran en las figuras. Además, se contemplan también fragmentos de polinucleótido que codifican para estos dominios.

Otros fragmentos preferidos son fragmentos de fosfatona biológicamente activos. Son fragmentos biológicamente activos aquellos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido de fosfatona. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad deseada mejorada, o una actividad no deseada disminuida.

Sin embargo, muchas secuencias de polinucleótidos, tales como secuencias EST, están públicamente disponibles y son accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias pueden estar relacionadas con la SEQ ID NO: 1 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados se excluyen específicamente del alcance de la presente invención. Enumerar cada secuencia relacionada sería pesado e incómodo.

Por consiguiente, se excluyen preferiblemente de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita mediante la fórmula general de a-b, en la que a es cualquier número entero desde 1 hasta 1655 de la SEQ ID NO: 1, b es un número entero desde 15 hasta 1655, en la que tanto a como b corresponden a las posiciones de residuos de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 1, y en la que b es mayor de o igual a +14.

Epítopos y anticuerpos

En la presente invención, "epítopos" se refiere a fragmentos de polipéptido de fosfatona que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un animal, por ejemplo, una rata, un conejo, un ser humano, un ratón (incluyendo un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana y produce moléculas de anticuerpo humana), etc. Una realización preferida de la presente invención se refiere a un fragmento de polipéptido de fosfatona que comprende un epítipo, así como el polinucleótido que codifica para este fragmento. Una región de una molécula de proteína a la cual puede unirse un anticuerpo se define como un "epítipo antigénico". Por el contrario, un "epítipo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpo; véase, por ejemplo Geysen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1983); 3998-4002. Pueden producirse fragmentos que funcionen como epítopos mediante cualquier medio convencional; véase, por ejemplo, Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 5131-5135 descrito adicionalmente en la patente de EE.UU. número 4.631.211.

En la presente invención, los epítopos antigénicos contienen preferiblemente una secuencia de al menos siete, más preferiblemente al menos nueve, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos. Los epítopos antigénicos son útiles para producir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al epítipo; véase, por ejemplo, Wilson, Cell 37 (1984), 767-778; Sutcliffe, Science 219 (1983), 660-666.).

Similarmente, pueden usarse epítopos inmunogénicos que pueden usarse para inducir anticuerpos según métodos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Sutcliffe, citado anteriormente; Wilson, citado anteriormente; Chow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 910-914; y Bittle, J. Gen. Virol. 66 (1985); 2347-2354. Un epítipo inmunogénico preferido incluye la proteína soluble. Los epítopos inmunogénicos pueden presentarse juntos con una proteína portadora, tal como una albúmina, con un sistema animal (tal como conejo o ratón) o, si son suficientemente largos (al menos aproximadamente 25 aminoácidos), sin un portador. Sin embargo, se ha mostrado que los epítopos inmunogénicos que comprenden tan pocos como de 8 a 10 aminoácidos son suficientes para producir anticuerpos que pueden unirse, como mínimo, a epítopos lineales en un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, en transferencia de Western).

Usando el programa de ordenador GCG-Peptide-structure (Rice, Programme Manual for the EGCG package, Cambridge, CB10 1RQ Inglaterra: Hinxton Hall; 1995) disponible del Human Genome Resource Centre (Centro de recursos del genoma humano (http://www.hgmp.mrc.ac.uk/_homeoage.html), se descubrió que la SEQ ID NO: 2 era antigénica en las regiones de aminoácidos mostradas en la figura 4. Por tanto, estas regiones podrían usarse como epítopos para producir anticuerpos contra la proteína codificada por la SEQ ID NO: 1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) quiere decir que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que se pueden unir específicamente a proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto, véase, por ejemplo, Wahl, J. Nucl. Med. 24 (1983), 316-325. Por tanto, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una FAB u otra biblioteca de expresión de inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena única, humanizados, anticuerpos humanos que se pueden obtener mediante o a partir de presentación de fagos, un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana y/o cromosomas humanos, células inmunitarias aisladas del cuerpo humano, inmunización *in vitro* o *ex vivo* de células inmunitarias humanas, o cualquier otro método disponible.

Tal como se describe en el presente documento, existe una molécula de ácido nucleico que hibrida con la cadena complementaria del polinucleótido de fosfatona de la invención y que codifica para una versión mutada de la proteína tal como se definió anteriormente que ha perdido su actividad inmunológica, preferiblemente actividad biológica. Tal molécula de ácido nucleico puede probarse útil para, por ejemplo, generar alelos mutantes dominantes de las proteínas fosfatona descritas anteriormente. Dicha versión mutada se genera preferiblemente mediante sustitución, delección y/o adición de 1 a 5 o de 5 a 10 residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de tipo normal descritas anteriormente.

Vectores, células huésped y producción de proteína

La presente invención se refiere también a vectores que contienen el polinucleótido de fosfatona, a células huésped y a la producción de polipéptidos mediante técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, viral, o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o replicación defectuosa. En el último caso, ocurrirá generalmente propagación viral sólo en células huésped que complementan.

Los polinucleótidos de fosfatona pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular de empaquetado apropiada y transducirse después en células huésped.

El inserto de polinucleótido de fosfatona debe estar unido funcionalmente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. Otros promotores adecuados serán conocidos para los expertos en la técnica. Los constructos de expresión contendrán además sitios para el inicio de la transcripción, iniciación, terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados mediante los constructos incluirá preferiblemente un codón de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) colocado apropiadamente al final del polipéptido que se ha de traducir.

Tal como se indica, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de huésped apropiados incluyen, pero no están limitados a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levaduras; células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y células Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como células CHO, COS, 293, y de melanoma de Bowes; y células de plantas. Los medios de cultivo y condiciones apropiadas para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica. Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

Además, se puede usar, por ejemplo, una célula de mamífero que comprende ya en su genoma una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fosfatona tal como se describió anteriormente, pero que no expresa el mismo o no de una manera apropiada debido a, por ejemplo, un promotor débil, y se introduce en la célula de mamífero una secuencia control de la expresión tal como un promotor fuerte en proximidad estrecha con la molécula de ácido nucleico endógena que codifica dicho polipéptido de fosfatona de manera que se induce la expresión de la misma.

En este contexto, el término "secuencia control de la expresión" indica una molécula de ácido nucleico que puede usarse para aumentar la expresión del polipéptido de fosfatona, debido a su integración en el genoma de una célula en proximidad estrecha con el gen que codifica para la fosfatona. Tales secuencias reguladoras comprenden promotores, potenciadores, secuencias de intrón silenciador inactivadas, regiones codificantes 3'UTR y/o 5'UTR, elementos estabilizadores de proteína y/o ARN, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína reguladora, por ejemplo, un factor de transcripción, que puede inducir o desencadenar la expresión del gen de fosfatona u otros elementos de control de la expresión del gen que se conocen por activar la expresión del gen y/o aumentar la cantidad del producto del gen. La introducción de dicha secuencia control de la expresión conduce al aumento y/o inducción de la expresión de polipéptidos de fosfatona, dando como resultado al final una cantidad aumentada de polipéptidos de fosfatona en la célula. Por tanto, la presente invención aspira a proporcionar expresión de *novi* y/o aumentada de polipéptidos de fosfatona.

La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección por fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis, Basic Methods In Molecular Biology (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos de fosfatona puedan de hecho expresarse mediante una célula huésped que carece de un vector recombinante.

Los polipéptidos de fosfatona pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. Lo más preferiblemente, se emplea para purificación cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC").

Pueden recuperarse también polipéptidos de fosfatona a partir de: productos purificados de fuentes naturales, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células, ya sea directamente aislados o cultivados; productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas superiores, insectos y células de mamífero. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de fosfatona pueden estar glucosilados o pueden estar no glucosilados. Además, los polipéptidos de fosfatona pueden incluir también un resto de metionina inicial (modificado), en algunos casos como resultados de procesos mediados por el huésped. Por tanto, se conoce bien en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de inicio de la traducción generalmente se elimina con alta eficacia de cualquier proteína después de la traducción en células eucariotas. Mientras que la metionina N-terminal en la mayoría de proteínas se elimina también eficazmente en la mayoría de los procariotas, para algunas proteínas, este proceso de eliminación procariota es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al cual la metionina N-terminal está covalentemente unida.

Por consiguiente, se describe en el presente documento un procedimiento para aislar un polipéptido de fosfatona que comprende las etapas de:

(a) cultivar medio condicionado tumoral o células de osteosarcoma hasta la confluencia en medio complementado con suero (DMEM Eagles/FCS al 10%/glutamina/antimicótico (DMFCS);

(b) incubar las células en días alternos en medio DMEM Eagles/glutamina/antibiótico antimicótico (DM) libre de suero hasta cinco horas;

(c) recoger medio libre de suero acondicionado de las células y equilibrar el medio acondicionado con fosfato de sodio 0,06 M pH 7,2 y NaCl 0,5 M (PBS);

(d) someter el medio de (c) a una columna de equilibrado de concanavalina A sefarosa;

(e) lavar la columna exhaustivamente con PBS;

(f) eluir la columna de concanavalina A con PBS complementado con α -metil-D-glucopiranosido 0,5 M;

(g) someter el material eluido de (f) a cromatografía de intercambio catiónico y

(h) eluir las fracciones que contienen polipéptido de fosfatona con NaCl 0,5 M.

El método descrito anteriormente se ilustra en el ejemplo 1.

Otro objeto de la invención es un método para la preparación de polipéptidos de fosfatona que comprende el cultivo de células huésped según la invención que, debido a la presencia de un vector o un polinucleótido según la invención o una secuencia control de la expresión exógena, pueden expresar tal polipéptido, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido y la recuperación del polipéptido así producido del cultivo. Se ha de entender también que las proteínas pueden expresarse en un sistema libre de células usando por ejemplo ensayos de traducción *in vitro* conocidos en la técnica.

Por tanto, en una realización adicional más, la presente invención se refiere a un polipéptido de fosfatona o un fragmento inmunológica y/o biológicamente activo del mismo codificado por el polinucleótido de la invención o producido mediante un método tal como se describió anteriormente. Asimismo, están dentro del alcance de la presente invención polipéptidos de fosfatona que se puedan obtener mediante escisión proteolítica de los polipéptidos de fosfatona descritos anteriormente mediante una metalopeptidasa PHEX.

Será evidente para los expertos en la técnica que la proteína de la invención puede acoplarse además a otros residuos tal como se describió anteriormente para, por ejemplo, aplicaciones de selección de fármacos como diana y toma de imágenes. Tal acoplamiento puede realizarse químicamente después de la expresión de la proteína en el sitio de unión o el producto de acoplamiento puede modificarse dentro de la proteína de la invención a nivel del ADN. Los ADN se expresan después en un sistema huésped adecuado, y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

Regulación del metabolismo del fosfato

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, el polipéptido de fosfatona de la presente invención puede regular el metabolismo del fosfato.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un polipéptido de fosfatona que tiene actividad anti-fosfatona porque tiene al menos una de las siguientes actividades:

(a) puede regular por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;

(b) puede regular por disminución la 25-hidroxi-vitamina D3-24-hidroxilasa renal; y/o

(c) puede regular por incremento la 25-hidroxi-D-1- α -hidroxilasa renal.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el polipéptido de fosfatona comprende un motivo mineral óseo tal como se describió anteriormente y regula positivamente la mineralización ósea.

También se describen en el presente documento polipéptidos que han perdido al menos una de las actividades descritas anteriormente. Tales polipéptidos pueden ser formas mutantes del polipéptido de fosfatona de la presente invención y pueden usarse, por ejemplo, para estudiar el efecto de mutaciones en el gen que codifica para la fosfatona. En particular, tales mutantes pueden demostrar ser útiles para el desarrollo de fármacos que pueden compensar una deficiencia producida por la pérdida de una de las actividades biológicas de la fosfatona de tipo natural. Tales formas mutantes de polipéptidos de fosfatona pueden estudiarse mejor en los métodos de selección descritos en más detalle a continuación en el presente documento.

Anticuerpos de fosfatona

Además, tal como se describió anteriormente, la provisión del polipéptido de fosfatona de la presente invención permite la producción de anticuerpos específicos de fosfatona. A este respecto, la tecnología del hibridoma permite la producción de líneas celulares que secretan anticuerpos frente a esencialmente cualquier sustancia deseada que produzca una respuesta inmunitaria. Puede obtenerse el ARN que codifica para las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina a partir del citoplasma del hibridoma. Puede usarse la parte del extremo 5' del ARNm para preparar ADNc que ha de insertarse en un vector de expresión. El ADN que codifica para el anticuerpo o sus cadenas de inmunoglobulina puede expresarse posteriormente en células, preferiblemente células de mamífero. Dependiendo de la célula huésped, pueden requerirse técnicas de renaturalización para conseguir la conformación apropiada del anticuerpo. Si es necesario, pueden realizarse sustituciones puntuales en el ADN que buscan optimizar la unión usando mutagénesis con casete convencional u otra metodología de modificación por ingeniería de proteínas tal como se describe en el presente documento.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido de fosfatona de la invención.

En una realización preferida de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo humano o humanizado, primatizado, quimerizado o un fragmento de los mismos que se une específicamente a dicho péptido o polipéptido, incluyendo también un anticuerpo biespecífico, anticuerpo sintético, fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fab, Fv o scFv, etc., o un derivado químicamente modificado de cualquiera de éstos. La metodología general para producir anticuerpos es bien conocida y se ha descrito en, por ejemplo, Köhler y Milstein, *Nature* 256 (1975), 494 y revisado en J.G.R. Hurrell, ed., "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982), así como lo enseñado por L. T. Mimms *et al.*, *Virology* 176 (1990), 604-619. Además, pueden obtenerse anticuerpos o fragmentos de los mismos frente a los péptidos mencionados anteriormente usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988.

Para la producción de anticuerpos en animales de experimentación, pueden inmunizarse diversos huéspedes incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, y otros, mediante inyección con polipéptidos de la presente invención o cualquier fragmento u oligopéptido o derivado de los mismos que tenga propiedades inmunogénicas. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos policlonales se conocen en la técnica y se describen en, entre otros, Mayer y Walker, eds., "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology", Academic Press, Londres (1987). Pueden obtenerse también anticuerpos policlonales a partir de un animal, preferiblemente un mamífero. Los métodos para purificar anticuerpos se conocen en la técnica y comprenden, por ejemplo, cromatografía de inunoafinidad. Dependiendo de la especie del huésped, pueden usarse diversos adyuvantes o vehículos inmunológicos para aumentar las respuestas inmunológicas. Tales adyuvantes incluyen, pero no están limitados a adyuvantes completo o incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas y dinitrofenol. Un ejemplo de vehículo, al cual, por ejemplo, puede acoplarse un péptido de la invención, es hemocianina de lapa californiana (KLH).

La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622. Se describen métodos para la producción de anticuerpos humanizados en, por ejemplo, los documentos EP-A1 0 239 400 y WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos que van a utilizarse según la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe en, por ejemplo, los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención tiene una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M, preferiblemente al menos aproximadamente 10^{-8} M más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{-9} M y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{-10} M. Por otra parte, el anticuerpo de fosfatona puede tener una afinidad de unión de 10^5 M $^{-1}$, preferiblemente no superior a 10^7 M $^{-1}$ si se prevé la estimulación de la actividad de la fosfatona y ventajosamente hasta 10^{10} M $^{-1}$ o más en el caso de que deba suprimirse la actividad de la fosfatona.

Usos de los polinucleótidos de fosfatona

Los polinucleótidos de fosfatona identificados en el presente documento pueden usarse de numerosas formas como reactivos. La siguiente descripción debe considerarse a modo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

Existe una necesidad continua de identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente se dispone de pocos reactivos de marcaje de cromosomas, basados en datos de secuencia reales (polimorfismos de repetición). Pueden usarse polinucleótidos relacionados con fosfatona (genómicos y/o ADNc) para realizar análisis de restricción tal como se describe en detalle (Rowe, Hum. Genet. 94:5 (1994), 457-467; Benham, Genomics 12 (1992), 368-376; Gillett, Ann. Hum. Genet. 60(3) (1996), 201-211; Rowe, Nucleic Acids Res. 22(23) (1994), 5135-5136). En particular, el uso de microsatélites (Rowe, Hum. Genet. 94:5 (1994), 457-467; Rowe, Nucleic Acids Res. 22(23) (1994), 5135-5136; Rowe, Hum. Genet. 93 (1994), 291-294; Rowe, Hum. Genet. 91 (1993), 571-575; Rowe, Hum. Genet. 97 (1996), 345-352; Rowe, Hum. Genet. 89 (1992), 539-542), y el aislamiento de marcadores informativos usando híbridos de transferencia génica por fusión-irradiación y ALU-PCR (Benham, Genomics 12 (1992), 368-376) permitirán el aislamiento rápido de métodos altamente informativos para la selección de fosfatona y enfermedades heredadas derivadas. Las metodologías anteriores han sido particularmente satisfactorias en el mapeo y localización del gen PHEX (se propone MEPE con un sustrato de PHEX), y el análisis de mutaciones extensas ha revelado regiones estructurales y motivos que son un prerrequisito para la bioactividad de PHEX (Rowe, Hum. Mol. Genet. 6 (1997), 539-549; Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Rowe, Current Opinion in Nephrology & Hypertension 7(4) (1998), 367-376; Rowe, Clinical and Experimental Nephrology 2(3) (1998), 183-193), estos mismos enfoques pueden usarse para la fosfatona. Más recientemente, se han desarrollado potentes técnicas de ligamiento y selección de todo el genoma que se basan en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), y el uso de una combinación de secuenciación basada en gel y chips de ADN de detección de la variación de alta densidad (Wang, Science 280 (1998), 1077-1082). Recientemente se han hecho disponibles en Internet datos de SNP por el Center for Genome Research (Centro para la Investigación del Genoma) en el Whitehead Institute for Biomedical Research (Instituto Whitehead para Investigación Biomédica) en Cambridge, Massachusetts, USA (Whitehead-MIT) en <http://www-genome.wi.mit.edu/SNP/human/index.html>. Esta nueva y poderosa metodología basada en matrices de oligonucleótidos será la ruta futura para el análisis de la expresión molecular, polimorfismo y genotipado, y el tratamiento de enfermedades (Wang, Science 280 (1998), 1077-1082; Chee, Science 274 (1996), 610-614; Gentalen, Nucleic Acids Res. 27 (1999), 1485-1491; Hacia, Nucleic Acids Res. 26 (1998), 3865-3866; Lipshutz, Nat. Genet. 21 (1999), 20-24; Fan, Eur. J. Hum. Genet. 6 (1998), 134). Dada la información de secuencia para MEPE en esta solicitud, se usarán los nuevos enfoques y tecnología anteriores para tratar las áreas descritas. La secuencia puede mapearse en un cromosoma particular o en una región específica del cromosoma usando técnicas bien conocidas. Éstas incluyen hibridación *in situ* con extensiones cromosómicas, preparaciones cromosómicas clasificadas por citometría de flujo, o construcciones de cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones P1 bacterianas o bibliotecas de ADNc de cromosoma único tal como se revisa en Price (Blood Rev. 7 (1993), 127-134) y Trask (Trends Genet. 7 (1991), 149-154). Se ha descrito la técnica de hibridación *in situ* fluorescente de extensiones de cromosomas, entre otros sitios, en Verma, (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York NY. Pueden correlacionarse la hibridación *in situ* fluorescente de preparaciones cromosómicas y otras técnicas físicas de mapeo de cromosomas con datos de mapeo genético adicionales. Pueden encontrarse datos de mapeo extenso accesibles para la comunidad científica en Internet en sitios patrocinados por el Human-Genome-Mapping-Project United Kingdom (Proyecto de Mapeo del Genoma Humano del Reino Unido (HGMP-RC) <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/homepage.html>, la National Collection of biological information (Colección Nacional de información biológica) (NCBI) patrocinada por el National Institute of Health USA (Instituto Nacional de Salud de EE.UU) (NIH), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, también el Center for Genome Research (Centro para la Investigación del Genoma) en el Whitehead Institute for Biomedical Research (Instituto Whitehead para la Investigación Biomédica) en Cambridge, Massachusetts, USA (Whitehead-MIT) <http://www-genome.wi.mit.edu/>. Además, son accesibles mapas de microsatélites extensos y herramientas de mapeo relacionadas que cubren el genoma humano completo a través de Genethon (base de datos patrocinada por el gobierno francés) http://www.genethon.fr/genethon_en.html. Se han publicado también mapas fundamentales en Science y Nature (véase, por ejemplo, Dib, Nature 380 (1996), 152-154), pero para datos actualizados debe consultarse los sitios de Internet. La correlación entre la ubicación del gen que codifica para un polipéptido de fosfatona de la invención en un mapa cromosómico físico y una característica específica, por ejemplo una enfermedad hipo o hiperfosfatémica puede ayudar a delimitar la región de ADN asociada con esta característica. Las secuencias de nucleótidos de la invención objeto pueden usarse para detectar diferencias en secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados. Además, los medios y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para la cría de animales asistida por marcadores. La secuencia de nucleótidos de la invención objeto puede usarse también para detectar diferencias en la ubicación cromosómica debidas a translocación, inversión, etc. entre individuos normales, portadores o afectados.

Como mínimo, los polinucleótidos de fosfatona pueden usarse como marcadores del peso molecular en geles de tipo Southern, como sondas de diagnóstico para determinar la presencia de un ARNm específico en un tipo celular particular, como una sonda para "descartar" secuencias conocidas en el proceso de descubrir polinucleótidos novedo-

sos, para seleccionar y preparar oligómeros para su unión a un “chip génico” u otro soporte, para producir anticuerpos anti-ADN usando técnicas de inmunización de ADN, y como un antígeno para provocar una respuesta inmunitaria.

Usos de polipéptidos y anticuerpos de fosfatona

Pueden usarse polipéptidos de fosfatona y anticuerpos frente a los mismos de numerosas formas. La siguiente descripción debe considerarse a modo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

Pueden usarse polipéptidos de fosfatona para someter a ensayo los niveles de proteína en una muestra biológica usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, puede estudiarse la expresión de proteína en tejidos con métodos inmunohistológicos clásicos; véase, por ejemplo, Jalkanen, J. Cell. Biol. 101 (1985), 976-985; Jalkanen, J. Cell. Biol. 105 (1987), 3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión del gen de la proteína incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica marcas de ensayos de anticuerpos adecuadas, e incluyen marcas enzimáticas, tales como glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio (^{99}mTc), y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Además de someterse a ensayo los niveles de proteína en una muestra biológica, pueden detectarse también proteínas *in vivo* mediante obtención de imágenes. Las marcas de anticuerpo o marcadores para la obtención de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen aquéllos detectables por radiografía de rayos X, RMN o ESR. Para la radiografía de rayos X, las marcas adecuadas incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no abiertamente dañina para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquéllos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que pueden incorporarse en el anticuerpo mediante el marcaje de los nutrientes para el hibridoma relevante.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de proteína que se ha marcado con un resto de obtención de imágenes detectable apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{121}In , ^{99}mTc), una sustancia radiopaca, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal) en el mamífero. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la cantidad de resto de obtención de imágenes necesario para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada oscilará normalmente desde aproximadamente 5 hasta 20 milicurios de ^{99}mTc . El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumulará después preferentemente en la ubicación de las células que contienen la proteína específica. La obtención de imágenes de tumores *in vivo* se describe, por ejemplo, en Burchiel, “Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments”, capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel y Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Por tanto, la presente invención describe un método de diagnóstico de un trastorno, que implica (a) someter a ensayo la expresión del polipéptido de fosfatona en células o tejidos, o el nivel de fosfatona o sus fragmentos activos o epítomos en el fluido corporal de un individuo; (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen del polipéptido de fosfatona sometido a ensayo comparado con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno.

Además, pueden usarse polipéptidos de fosfatona para tratar enfermedades. Por ejemplo, puede administrarse a los pacientes polipéptidos de fosfatona en un esfuerzo por aumentar o disminuir el nivel de fosfato en suero y/o mejorar la formación ósea alterada (raquitismo hipofosfático ligado al cromosoma X, osteomalacia hipofosfática oncogénica, insuficiencia renal, osteoporosis, osteodistrofia renal, etcétera). Puede activar o inhibir sus receptores para regular por incremento o disminución la expresión de cotransportadores de fosfato dependientes de sodio. Además, puede usarse el elemento potenciador y/o promotor del gen de fosfatona en aplicaciones de terapia génica para tratar trastornos específicos del metabolismo del fosfato, particularmente raquitismo hipofosfático ligado al cromosoma X. También, posiblemente en trastornos de pérdida mineral ósea en los que se produce la regulación génica inapropiada y/o modificación postraduccional de MEPE debido a cambios secundarios o primarios no definidos (por ejemplo, mujeres posmenopáusicas, osteoporosis, relacionados con la edad), en los que la complementación de la hormona (y/o agonistas-antagonistas del receptor u hormona) quizá como un complemento a la terapia de sustitución hormonal restaurarían el equilibrio de fosfato y mineral óseo. Una característica clave de la bioactividad de MEPE y, por tanto, el tratamiento de enfermedades, es la predicción de que la secuencia N-terminal regula la captación de fosfato renal, y el extremo C-terminal (regiones notablemente asociadas con el motivo de MEPE descrito anteriormente) es un prerrequisito para la mineralización y crecimiento óseos normales.

Después de un trasplante renal, son características claves la hiperfosfatemia crónica o en algunos casos hipofosfatemia que dan como resultado complicaciones clínicas importantes. Por ejemplo, se notificó que el trasplante renal de un riñón normal en un paciente con HYP masculino dio como resultado cambios patofisiológicos en el riñón trasplantado normal tales como una pérdida de fosfato renal de “tipo raquitismo” desarrollada (Morgan, Arch. Intern. Med. 134 (1974), 549-552). El uso clínico de fragmentos de MEPE procesados escindidos en el extremo N-terminal podría dar como resultado una terapia antihipofosfática eficaz. Por el contrario, los casos de trasplante renal que dan como resultado hiperfosfatemia podrían tratarse con MEPE recombinante completo o péptidos derivados activos modelados sobre residuos N-terminales definidos. Otras enfermedades que podrían beneficiarse del tratamiento con MEPE,

péptidos derivados de MEPE, antagonistas-agonistas del receptor (podrían modificarse los péptidos para aumentar la potencia y especificidad de acción) incluyen osteodistrofia renal, toxicidad renal, enfermedad ósea de Paget, formas autosómicas de raquitismo, ciertas formas de síndrome de Fanconi renal. Además, si los receptores se expresan en una variedad de tejidos (intestino, etc.) así como el riñón, entonces existe el potencial de tratar pacientes con enfermedad renal en fase final (es decir, pérdida completa de la función renal).

De manera similar, pueden usarse también anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de fosfatona para tratar enfermedades. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de fosfatona puede unirse y reducir la sobreproducción del polipéptido. De manera similar, la administración de un anticuerpo puede activar el polipéptido, tal como uniéndolo a un polipéptido y escindiéndolo hasta una forma de actividad diferente.

Como mínimo, los polipéptidos de fosfatona pueden usarse como marcadores del peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración en gel de tamiz molecular usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Pueden usarse también polipéptidos de fosfatona para producir anticuerpos, que a su vez se usan para medir la expresión de proteína a partir de una célula recombinante, como una forma de evaluar la transformación de la célula huésped.

Además, pueden usarse polinucleótidos y polipéptidos de fosfatona en ensayos para someter a prueba una o más actividades biológicas. Si los polinucleótidos y polipéptidos de fosfatona sí que muestran actividad en un ensayo particular, es probable que la fosfatona esté implicada en las enfermedades asociadas con la actividad biológica. Por lo tanto, podría usarse fosfatona para tratar la enfermedad asociada.

Secuencias reguladoras de genes de fosfatona

Se describe además en el presente documento una secuencia reguladora de un promotor que regula de manera natural la expresión de un polinucleótido que codifica para el polipéptido de fosfatona de la invención descrito anteriormente o de un polinucleótido homólogo a un polinucleótido de la invención. Con métodos bien conocidos en la técnica es posible aislar las secuencias reguladoras de los promotores que regulan de manera natural la expresión de las secuencias de ADN descritas anteriormente. Por ejemplo, usando las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente como sondas, puede seleccionarse por un experto en la técnica una biblioteca genómica que consiste en ADN genómico humano clonado en vectores de fago o bacterianos. Tal biblioteca consiste en, por ejemplo, ADN genómico preparado a partir de células sanguíneas humanas, fraccionado en fragmentos que oscilan desde 5 kb hasta 50 kb, clonado en fagos lambda GEM11 (Promega). Pueden purificarse fagos que hibridan con las sondas. A partir de fagos purificados puede extraerse y secuenciarse ADN. Por ejemplo, se selecciona una biblioteca P1 genómica humana (Genomic Systems, Inc) mediante una sonda de ADNc marcada tal como se describe en el ejemplo 11. Habiendo aislado las secuencias genómicas que corresponden a los genes que codifican para las proteínas fosfatona descritas anteriormente, es posible fusionar secuencias de ADN heterólogas a estos promotores o sus secuencias reguladoras por medio de fusiones transcripcionales o traduccionales bien conocidas por el experto en la técnica. Con el fin de identificar las secuencias reguladoras y elementos específicos de estos genes de fosfatona, pueden clonarse fragmentos genómicos en sentido 5' delante de genes marcadores tales como *luc*, *gfp* o la región codificante GUS, y los genes quiméricos resultantes pueden transfectarse en células o animales para la expresión transitoria o estable. El patrón de expresión observado en los animales transgénicos o células de mamífero transfectadas que contienen el gen marcador bajo el control de las secuencias reguladoras de la invención, puede compararse con el del gen de fosfatona descrito en el ejemplo 10 y revela los límites del promotor y sus secuencias reguladoras. Normalmente, dicha secuencia reguladora es parte de una molécula de ADN recombinante, por ejemplo, un vector, véase anteriormente. La presente solicitud describe además células huésped transformadas con una secuencia reguladora o una molécula de ADN o vector que contiene la secuencia reguladora de la invención. Dicha célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota; véase anteriormente.

Diagnóstico de trastornos del metabolismo del fosfato

Otro aspecto descrito en el presente documento es la selección farmacogenómica de fármacos y profármacos para pacientes que padecen trastornos del metabolismo del fosfato (véase, por ejemplo, el ejemplo 6) y que son posibles candidatos para la terapia farmacológica. Por tanto, los hallazgos de la presente invención proporcionan las opciones de desarrollo de nuevos fármacos para la intervención farmacológica con el objetivo de restituir la función de las proteínas fosfatona modificadas genéticamente. También puede preverse un enfoque terapéutico génico con la ayuda de la presente invención. Por tanto, la presente solicitud describe un método de diagnóstico de un trastorno, que implica:

(a) someter a ensayo el nivel de expresión del gen de fosfatona en células o fluido corporal de un individuo; y

(b) comparar el nivel de expresión del gen de fosfatona con un nivel de expresión del gen de fosfatona convencional, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen de fosfatona sometido a prueba comparado con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno en el metabolismo del fosfato, por ejemplo, el riñón o sistema óseo, u otros tejidos.

Más particularmente, la presente solicitud describe un método de diagnóstico de un estado patológico o una propensión a un estado patológico en un sujeto relacionado con un trastorno del metabolismo del fosfato que comprende:

(a) determinar la presencia o ausencia de una mutación en el polinucleótido que codifica para la fosfatona; y

(b) diagnosticar un estado patológico o una propensión a un estado patológico basándose en la presencia o ausencia de dicha mutación.

Adicionalmente, la presente solicitud describe un método de diagnóstico de un estado patológico o una propensión a un estado patológico en un sujeto relacionado con un trastorno del metabolismo del fosfato que comprende:

(a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido de fosfatona o una forma mutante del mismo en una muestra biológica; y

(b) diagnosticar un estado patológico o una propensión a un estado patológico basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido.

Es evidente que las sondas de ácido nucleico y anticuerpos descritos anteriormente de la invención se usan preferiblemente para los métodos mencionados.

El método de diagnóstico descrito anteriormente puede emplearse también para determinar el estado de dichos trastornos. El término “estado patológico” incluye las opciones de que el gen, ARNm, proteína o un elemento control de la transcripción, por ejemplo una secuencia promotora/potenciadora puedan llevar una mutación, delección o cualquier otra modificación que afectaría a la actividad global del gen en comparación con el producto del gen normal de tipo natural. Se incluyen en este término modificaciones postraduccionales de la proteína.

En el método descrito anteriormente, dicho estado en dicho sujeto es indicativo de una cierta forma del trastorno en el metabolismo del fosfato. Además, puede ser ventajoso que en el método dicho estado se determine en dicho sujeto en el estado embrionario o en el estado de recién nacido, por ejemplo usando amniocentesis. El análisis específico del estado del trastorno (potencial) del metabolismo del fosfato en la fase embrionaria, de recién nacido o adulta proporcionará además percepciones, por ejemplo, de estados de enfermedad específicos asociados con las fases respectivas. Por ejemplo, se espera que la etiología de, por ejemplo, el raquitismo hipofosfémico ligado al cromosoma X (XHL) u osteomalacia hipofosfémica oncogénica (OHO) se esclarecerá aplicando los métodos de la presente invención. Basándose en este conocimiento, se desarrollarán y someterá a prueba nuevos fármacos activos farmacéuticos. El método descrito en el presente documento puede aplicarse también a una variedad de animales, dependiendo del fin de la investigación. Por tanto, preferiblemente el animal es un ratón. Este aspecto es particularmente útil en la investigación básica para entender más claramente la interrelación funcional de diferentes proteínas que regulan el metabolismo del fosfato.

El método descrito anteriormente puede comprender una etapa adicional que comprende tratar dicho recién nacido con un medicamento para suprimir o aliviar un trastorno en el metabolismo del fosfato. El diagnóstico temprano de un trastorno en el metabolismo del fosfato o una propensión a este trastorno es particularmente ventajoso y de considerable importancia médica. Además, el estado puede diagnosticarse con el método descrito anteriormente por medio de amniocentesis. El diagnóstico temprano de trastornos en la captación y/o reabsorción de fosfato según todas las aplicaciones del método descrito anteriormente permite el tratamiento directamente después del nacimiento antes de la aparición de síntomas clínicos.

Los pacientes con raquitismo ligado al cromosoma X y los pacientes con osteomalacia tumoral (antes de la resección del tumor, o si la resección no es posible), se tratan con dosis altas de calcitriol o 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ (también conocida comercialmente como Rocaltrol[®] y está disponible de Roche; véase el sitio web para información detallada sobre la http://www.rochecanada.com/rocaltrol_pml_e.html.) y complementos de fosfato oral (fosfato de sodio dibásico y/o ácido fosfórico). Se usan también ocasionalmente análogos de la vitamina D (por ejemplo, dihidrotaquisterol), y se notifica que se reducen adicionalmente las pérdidas urinarias de fósforo y calcio mediante el uso adicional de diuréticos de tipo tiazida tales como hidroclorotiazida y amilorida (Alon, Paediatrics 75 (1985), 754-763). Para una revisión extensa de los tratamientos actuales véase (Carpenter, Pediatric Clinics of North America 44 (1997), 443-466). En niños, los huesos necesitan recolocarse fracturando extremidades deformadas (osteotomía), y las medicaciones descritas anteriormente dan como resultado vómitos y diarrea intensos. Los defectos del crecimiento asociados con el raquitismo familiar no pueden abordarse satisfactoriamente usando los tratamientos actuales.

La sustitución de las medicaciones anteriores por fosfatona y/o derivados de péptido de fosfatona corregirían los síntomas clínicos y normalizarían los defectos del crecimiento sin los efectos secundarios desagradables y osteotomías quirúrgicas.

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además introducir el gen de fosfatona funcional y expresable en las células de un sujeto que tiene un trastorno o propensión a un trastorno en el metabolismo del fosfato. En este contexto y tal como se usa en toda esta memoria descriptiva, un gen de fosfatona “funcional” significa un gen en el que la proteína codificada tiene parte o toda la conformación estructural primaria del polipéptido de fosfatona que tiene la actividad biológica descrita anteriormente. La detección de una expresión de una forma

mutante de fosfatónina permitiría la conclusión de que dicha expresión está interrelacionada con la generación o mantenimiento de un trastorno en el metabolismo del fosfato. Por consiguiente, se aplicaría una etapa adicional o alternativa para reducir el nivel de expresión hasta niveles bajos de la fosfatónina mutante o para suprimir la misma. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante eliminación al menos parcial de la expresión del gen mutante mediante

5 medios biológicos, por ejemplo, mediante el uso de ribozimas, moléculas de ácido nucleico antisentido o anticuerpos intracelulares contra las formas mutantes de estas proteínas. Además, pueden desarrollarse productos farmacéuticos que reducen los niveles de expresión de los genes mutantes correspondientes.

Actividad de unión

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para identificar un componente de unión a un polipéptido de fosfatónina que comprende:

(a) poner en contacto un polipéptido de fosfatónina de la invención con un compuesto que va a seleccionarse; y

15 (b) determinar si el compuesto efectúa una actividad del polipéptido.

Pueden usarse polipéptidos de fosfatónina para seleccionar proteínas que se unen a fosfatónina o para proteínas a las que se une la fosfatónina. La unión de fosfatónina y la molécula pueden activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista), o disminuir la actividad de la fosfatónina o de la molécula unida. Los ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (por ejemplo receptores), o moléculas pequeñas.

Preferiblemente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural de la fosfatónina, por ejemplo, un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional; véase, por ejemplo

25 Coligan, *Current Protocols in Immunology* 1(2) (1991); capítulo 5. De manera similar, la molécula puede estar estrechamente relacionada con el receptor natural al que se une la fosfatónina, o al menos, un fragmento del receptor al que puede unirse la fosfatónina (por ejemplo, sitio activo). En cualquier caso, la molécula puede diseñarse racionalmente usando técnicas conocidas; véase también anteriormente.

Preferiblemente, la selección de estas moléculas implica producir células apropiadas que expresan fosfatónina, o bien como una proteína secretada o bien en la membrana celular. Las células preferidas incluyen células de mamíferos, levaduras, *Drosophila*, o *E. coli*. Las células que expresan fosfatónina (o la membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen después preferiblemente en contacto con un compuesto de prueba que contiene po-

30 tencialmente la molécula para observar la unión, estimulación, o inhibición de la actividad de o bien la fosfatónina o bien la molécula.

El ensayo puede someter a prueba simplemente la unión de un compuesto candidato a fosfatónina, en el que se detecta la unión mediante una marca, o en un ensayo que implica competencia con un competidor marcado. Además, el ensayo puede someter a prueba si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la unión a

40 fosfatónina.

Alternativamente, puede realizarse el ensayo usando preparaciones libres de células, polipéptidos/moléculas fijados a un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. El ensayo puede comprender también simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una disolución que contiene fosfatónina, medir la

45 actividad o unión de la fosfatónina/molécula, y comparar la actividad o unión de la fosfatónina/molécula a un patrón.

Preferiblemente, en ensayo de ELISA puede medir el nivel o actividad de fosfatónina en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) usando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o actividad de fosfatónina o bien uniéndose, directa o indirectamente a fosfatónina o bien compitiendo con la fosfatónina por un

50 sustrato.

Todos estos ensayos anteriores pueden usarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas usando estos ensayos pueden usarse para tratar enfermedades o para provocar un resultado particular en un paciente (por ejemplo, aumento del nivel de fosfato en la sangre) activando o inhibiendo la fosfatónina/molécula. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de fosfatónina a partir de

55 células o tejidos manipulados adecuadamente.

Por lo tanto, la invención incluye un método para identificar compuestos que se unen a la fosfatónina que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto de unión candidato con fosfatónina; y

(b) determinar si se ha producido la unión.

60 Además, la invención incluye un método para identificar agonistas/antagonistas que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato con fosfatónina;

(b) someter a ensayo una actividad biológica tal como se describió anteriormente; y

(c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de la fosfatona.

5 Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención proporcionan una base para el desarrollo de compuestos miméticos que pueden ser inhibidores o activadores de la fosfatona o los genes que codifican para ellos. Se apreciará que la presente invención proporciona también métodos de selección basados en células que permiten una selección de alto rendimiento (HTS) de compuestos que pueden ser candidatos para tales inhibidores y activadores.

10 Además, la presente solicitud describe un método para identificar y obtener un candidato a fármaco para la terapia de trastornos en el metabolismo del fosfato que comprende las etapas de

15 (a) poner en contacto el polipéptido de la presente invención o una célula que expresa dicho polipéptido en presencia de componentes que pueden proporcionar una señal detectable en respuesta a la captación de fosfato, estando dicho candidato a fármaco que va a seleccionarse en condiciones que permiten el metabolismo del fosfato, y

20 (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o aumento de la señal generada a partir del metabolismo del fosfato, en el que la presencia o aumento de la señal es indicativo de un supuesto fármaco.

Por ejemplo, pueden usarse la línea de células renales CL8, células renales primarias humanas, o células de osteoblastos humanos primarios para medir la captación de fosfato dependiente de Na^+ radiactivo y/o el metabolismo de la vitamina D usando métodos descritos por, por ejemplo, Rowe, 1996; citado anteriormente.

25 Además, pueden emplearse ARN poli A+ o ARN total extraído de células descritas en (a), y cebadores de oligonucleótido complementarios a la secuencia de los genes del transportador de fosfato (NPTII, etc.), 24-hidroxilasa renal, una α -hidroxilasa, PTH, u osteopontina para medir la expresión de estos genes usando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa.

30 Además, es posible la medición de la mineralización de células de osteoblastos primarios humanos usando tinción de von Kossa. Este método comprende, por ejemplo,

35 - hacer crecer osteoblastos primarios humanos (que pueden obtenerse de Clonetics-Biowhitaker) hasta confluencia usando medios, complementos y condiciones recomendados por Clonetics;

- para experimentos de mineralización, complementar las células con el donador de fosfato β -glicerofosfato, y para controles 11-hemisuccinato de hidrocortisona;

40 - complementar células experimentales con β -glicerofosfato y MEPE 25 ng/ml;

- después de 3 semanas en cultivo y cambios en serie de medios, teñir los osteoblastos para determinar la mineralización ósea usando la tinción de Von-Kossa tal como describe Clonetics (AgNO_3 ; precipitación con sal de plata).

45 - Además, pueden emplearse ensayos que comprenden las siguientes mediciones:

- Experimentos de perfusión en rata y medir los efectos de la fosfatona sobre la captación de fosfato renal;

- determinar la expresión de una variedad de genes relevantes en la línea de células renales humanas CL8 y los efectos de la complementación con MEPE, tales como:

50 • Transportadores de Na^+ -fosfato,

• 24 y 1- α -hidroxilasa,

55 • Osteopontina y osteocalcina;

- sistema de cotransfección en células COS con MEPE y PHEX;

60 - Estudios de bioensayo usando fragmentos de péptido que comprenden al menos uno de los motivos descritos anteriormente. Por lo tanto, otro método de detección comprende la medición de la proteína cinasa C, caseína cinasa II, tirosina cinasa u otras rutas de transducción de señales en células expuestas a fosfatona y péptidos derivados usando técnicas contemporáneas. Además, los métodos tal como se describen en los ejemplos adjuntos pueden adaptarse fácilmente a los métodos de selección descritos anteriormente.

65 El candidato a fármaco puede ser un compuesto único o una pluralidad de compuestos. El término "pluralidad de compuestos" en un método de la invención ha de entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden o no ser idénticas. Dicho compuesto o pluralidad de compuestos pueden sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o estar comprendidos en, por ejemplo, muestras, por ejemplo, extractos celulares de, por ejemplo, plantas,

animales o microorganismos. Además, dicho(s) compuesto(s) puede(n) conocerse en la técnica pero hasta la fecha no saberse que pueden suprimir o activar polipéptidos de fosfatona u otros componentes en el metabolismo del fosfato. La mezcla de reacción puede ser un extracto libre de células o puede comprender un cultivo celular o tisular. Los ajustes adecuados para el método descrito en el presente documento los conoce el experto en la técnica y, por ejemplo, se describen generalmente en Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, tercera edición (1994) y en los ejemplos adjuntos. La pluralidad de compuestos puede añadirse, por ejemplo, a la mezcla de reacción, medio de cultivo, inyectarse en una célula o aplicarse de otra manera al animal transgénico. La célula o tejido que puede emplearse en el método de la invención es preferiblemente una célula huésped, célula de mamífero o animal transgénico no humano de la invención descritos en las realizaciones anteriormente en el presente documento.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el método de la invención, entonces es posible o bien aislar el compuesto de la muestra original identificada como que contiene el compuesto que puede suprimir o activar la fosfatona, o bien puede subdividirse adicionalmente la muestra original, por ejemplo, si consiste en una pluralidad de compuestos diferentes, de modo que se reduce el número de sustancias diferentes por muestra y se repite el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente pueden realizarse varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada según el método de la invención comprenda sólo un número limitado de o sólo una sustancia(s). Preferiblemente, dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y lo más preferiblemente dichas sustancias son idénticas.

Los compuestos que pueden someterse a prueba e identificarse según un método de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, por ejemplo, bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNA o similares (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198 y referencias citadas anteriormente). Además, pueden identificarse genes que codifican para un supuesto regulador de la proteína fosfatona y/o que ejercen sus efectos en sentido 5' o en sentido 3' de la proteína fosfatona de la invención, usando, por ejemplo, mutagénesis de inserción usando, por ejemplo, vectores que seleccionan como objetivo genes conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, series de plásmidos pShooter que dirigen la expresión al núcleo, mitocondria, o citoplasma pEF/myc/nuc, pCMV/myc/nuc, pEF/myc/mito, pCMV/myc/mito, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, o el vector de expresión pDIS-PLAY que dirige proteínas recombinantes a la superficie de células de mamífero. Todos los vectores pueden obtenerse de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com/>).

Determinar si un compuesto puede suprimir o activar proteínas fosfatona puede hacerse, por ejemplo, monitorizando la captación de fosfato dependiente de Na⁺ o la mineralización ósea; véase anteriormente. Puede hacerse además monitorizando las características fenotípicas de la célula de la invención puesta en contacto con los compuestos y comparándolas con las de las células de tipo natural. En una realización adicional, dichas características pueden compararse con las de una célula puesta en contacto con un compuesto que se sabe que o bien puede o bien no puede suprimir o activar proteínas fosfatona.

Una vez que se ha identificado y obtenido el compuesto descrito, se proporciona preferiblemente en una forma terapéuticamente aceptable. Por tanto, se describe en el presente documento un método para producir un agente terapéutico que comprende las etapas de los métodos de la invención descritos anteriormente; y

(i) sintetizar el compuesto obtenido o identificado en la etapa (b) de un método de la invención o un análogo o derivado del mismo en una cantidad suficiente para proporcionar dicho agente en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente; y/o

(ii) combinar el compuesto obtenido o identificado en la etapa (b) de un método de la invención o un análogo o derivado del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los métodos para la preparación de derivados y análogos químicos se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, edición de Springer Nueva York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 U.S.A. y Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, USA. Además, dichos derivados y análogos pueden sintetizarse y someterse a prueba para determinar sus efectos según métodos conocidos en la técnica; véase también anteriormente y a continuación.

En resumen, la presente solicitud proporciona métodos para identificar compuestos que pueden modular el metabolismo del fosfato debido a su activación directa o indirecta de fosfatona. Por consiguiente, los compuestos identificados según el método de la presente solicitud como inhibidores y activadores, respectivamente, de la actividad de la fosfatona, están también dentro del alcance de la presente invención.

Tal como es evidente a partir de lo anterior, la presente invención se refiere generalmente a composiciones que comprenden al menos uno de los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico, vectores, proteínas, secuencias reguladoras, moléculas de ADN recombinantes, anticuerpos o compuestos mencionados anteriormente. Preferiblemente, dicha composición comprende componentes tales como tampones, crioprotectores, etc., que no están asociados de manera natural con los componentes mencionados de la invención y que hacen a la misma adecuada para un uso particular.

Ventajosamente, dicha composición es para su uso como un medicamento, un medio de diagnóstico o un kit. Se describen composiciones farmacéuticas en más detalle en los ejemplos 6 y 7. En particular, los fragmentos bioactivos tal como se describieron anteriormente pueden ser útiles como un medicamento en el tratamiento de un trastorno del metabolismo del fosfato tal como raquitismo ligado al cromosoma X y osteomalacia así como otras enfermedades del metabolismo mineral óseo. Se proporcionan además fosfatona y metalopeptidasa PHEX como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial como un medicamento. De esta forma, puede usarse la metalopeptidasa PHEX para escindir fosfatona de modo que se producen fragmentos activos de fosfatona que pueden usarse para el tratamiento de trastornos del metabolismo del fosfato tal como se trata en el presente documento. Mientras que todas estas enfermedades son particularmente importantes en seres humanos, pueden tratarse también otros mamíferos según la invención.

La presente invención ha proporcionado por primera vez fosfatona en una forma sustancialmente aislada o purificada que está adecuadamente libre de contaminantes. La fosfatona nativa y fragmentos nativos de fosfatona, que están libres de contaminantes tales como SDS y/u otras proteínas que interfieren, pueden regular el metabolismo del fosfato descrito en el presente documento y proporcionar principios activos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos del metabolismo del fosfato.

Por tanto, la presente solicitud describe el uso de un polipéptido de fosfatona de la presente invención o un ADN que codifica y puede expresar dicho polipéptido, el anticuerpo, el activador/agonista, inhibidor/antagonista/ o componente de unión de la presente invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del metabolismo del fosfato.

En particular, la presente solicitud describe el uso de un polipéptido de fosfatona que tiene actividad de fosfatona o un ADN que codifica y puede expresar dicho polipéptido, el anticuerpo, el activador/agonista o componente de unión de la invención cuya presencia en la célula conduce a la actividad de fosfatona, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hiperfosfatemia, preferiblemente para el tratamiento de osteodistrofia renal, hiperfosfatemia en diálisis/predialisis renal, hiperparatiroidismo secundario u osteítis fibrosa quística.

Además, la presente solicitud describe el uso de un polipéptido de fosfatona que tiene actividad anti-fosfatona o un ADN que codifica y puede expresar dicho polipéptido, el anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico o el inhibidor/antagonista de la presente invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hipofosfatemia, preferiblemente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, raquitismo hipofosfatémico hereditario con hipercalciuria (HHRH), lesiones óseas hipomineralizadas, crecimiento atrofiado en menores, osteomalacia hipofosfatémica oncogénica, pérdida de fosfato renal, osteodistrofia renal, osteoporosis, raquitismo resistente a la vitamina D, resistencia orgánica terminal, síndrome de Fanconi renal, raquitismo autosómico, insuficiencia renal, acidosis tubular renal, fibrosis quística o enfermedad celiaca.

Además, el polipéptido de fosfatona que tiene actividad anti-fosfatona o un ADN que codifica y puede expresar dicho polipéptido, el anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención o el inhibidor/antagonista se describen como útiles para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno por pérdida mineral ósea.

Además, la presente solicitud describe el uso de un polipéptido de fosfatona y metalopeptidasa PHEX para la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de un trastorno del metabolismo del fosfato.

Los usos y métodos mencionados anteriormente se describen en más detalle en el ejemplo 6.

También se describe en el presente documento el uso de una línea celular ósea o de osteoblastos transformados que puede sobreexpresar fosfatona para la producción y el aislamiento de fosfatona.

Los siguientes ejemplos se exponen de modo que se proporciona a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo llevar a cabo diversos aspectos de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni pretenden representar o implicar que los experimentos de a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deben tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso y la temperatura está en grados centígrados.

Ejemplo 1

Purificación de fosfatona a partir del tumor

Se extirpó un tumor mesenquimatoso con expresión fosfatúrica de un paciente y se tomaron las siguientes muestras:

A: Se puso una muestra de tejido tumoral puro, del tamaño de dos guisantes grandes, en un vial de 2 ml que contenía DMEM de Eagle/FCS al 10%/glutamina/antibiótico antimicótico Gibco-BRL.

ES 2 281 964 T3

B: Muestra de tumor subdural de aproximadamente el mismo tamaño, posiblemente más pequeña. Se puso en el mismo medio que A.

C: Muestra de duramadre anómala: material blanco resistente: Se puso en el mismo medio que A.

D: Muestra de fluido tumoral.

Procesamiento de las muestras

Día 1

Se cortó cada muestra en pequeños cubos de 0,5 cm usando un bisturí estéril. Se puso la mitad de cada muestra en un criotubo y se congeló inmediatamente en N₂(1). Se recogió también el fluido que rodeaba al tejido (DMEM/FCS al 10%, etc.), y se congeló. La otra mitad de cada muestra se añadió a DMEM de Eagle/FCS al 10%/glutamina/antibiótico antimicótico complementado con colagenasa A1 0,2 mg/ml (~ 15 ml), y se dejó a 37°C durante toda la noche.

Día 2

1. Después de la incubación durante toda la noche en DMEM complementado con suero, las células parecían ser predominantemente RBC y se observaron muy pocas células adherentes. Las células se centrifugaron a temperatura ambiente y se recogieron los sobrenadantes y se congelaron inmediatamente (~ 15 ml).

2. Se resuspendieron después los sedimentos en 10 ml de DMEM de Eagle complementado con antibiótico/antimicótico (matraces con medio), y se incubaron después durante unas 8 h y 10 min. adicionales.

3. Se recogieron los sobrenadantes libres de suero tal como se describió en 1 (~ 10 ml), y se resuspendieron las células en DMEM de Eagles con FCS al 10%, etc., (~ 15 ml), y se continuó la incubación. Se almacenaron los sobrenadantes a -80°C.

Día 6

1. Después de la incubación desde el día 2, se centrifugaron las células tal como se describió para 1 del día 2. Se recogieron muestras en FCS al 10% y se congelaron.

2. Se resuspendieron los sedimentos en DMEM libre de suero (10 ml), como para el día 2 y esta vez de dejaron durante cuatro horas.

3. Lo mismo que para 3 del día 2.

Día 7

1. El espacio subdural y el cultivo tumoral en particular, habían desarrollado innumerables focos que contenían grupos de células que parecían unidas al plástico de las placas de cultivo tisular. Por debajo de estas protuberancias similares a pólipos había una monocapa de células similares a fibroblastos que se extendían radialmente desde debajo de las estructuras similares a tumores. Esta capa de células parecía actuar como una matriz para anclar los tumores similares a pólipos. Nada de esto se vio en la muestra de duramadre, que parecía carecer de células en esta fase, y contenía estructuras enmarañadas similares a fibras.

2. Se centrifugaron los cultivos, y se recogieron los sobrenadantes (FCS al 10%). Se pusieron después los sedimentos a un lado.

3. Se incubaron después las placas con 10 ml de una dilución 1/10 en PBS de disolución de tripsina-EDTA Gibco/BRL durante ~ 15 min. Se agitaron después vigorosamente las placas y se añadieron 5 ml de FCS.

4. Se añadieron después las células resuspendidas a los sedimentos obtenidos en 2, se resuspendieron y centrifugaron. Se desechó el sobrenadante.

5. Se pusieron después las células en placas en 18 ml de medio DMEM de Eagle - FCS al 10% con complementación de glutamina y antibiótico antimicótico (se usaron matraces grandes).

6. Finalmente, se incubaron las células a 37°C en atmósfera de CO₂.

ES 2 281 964 T3

Día 9

1. Las células tumorales y en algún grado las células del espacio subdural aparecían como innumerables grupos de células, y parecían tener la misma morfología que las células antes del tratamiento con tripsina. Algunos de los grupos eran bastante grandes, y visibles a simple vista.

2. Se recogió el medio complementado con suero y se almacenó. Se usaron matraces grandes y se añadieron 18 ml de medio por matraz (DMEM - FCS al 10% antimicótico/antibiótico/glutamina).

Día 13

1. Se congelaron las células (~ 15 ml), y se almacenaron en tubos Falcon como medio condicionado de DMEM - FCS al 10%.

2. Se resuspendieron las células en DMEM de Eagle libre de suero (~ 11 ml) a las 11:10 a.m., y se dejaron durante 6 h a 37°C (incubador de CO₂).

3. Se centrifugaron después las células y se recogieron los sobrenadantes (medio control libre de suero). Se añadió después DMEM de EAGLE - FCS al 10% a las células restantes.

Día 16

Se repitieron los procesos anteriores y se recogió medio condicionado tumoral (TCM, "Tumor Conditioned Medium") durante varias semanas. Alternativamente, puede recogerse TCM de células Saos-2 (ECACC 89050205) o células U-2 OS (ATCC HTB-96).

Purificación de fosfatona

Cromatografía de afinidad de concanavalina A-Sepharose

1. Se ajustaron 3 ml de TCM con fosfato de sodio 1 M pH 7,2 y NaCl 5 M para dar una concentración final de fosfato de sodio 0,06 M pH 7,2 y NaCl 0,5 M más azida de sodio al 0,01%.

2. Se llevó Con A-Sepharose (nº de código de Pharmacia: 17-0440-01) a etanol al 20%, y esto se lavó en primer lugar con varios volúmenes de columna de agua, y después se equilibró con el tampón de desplazamiento. Se rellenó una columna C10/10 pequeña (nº de código de Pharmacia: C10/10 d.i. de 10 mm) con Con A hasta una altura de 5,5 cm (aproximadamente un volumen de 4,3 a 5,0 ml). Se llevó a cabo la equilibración con una velocidad de flujo máxima de 0,5 ml/min.

3. Se añadió después la muestra (ajustada a pH 7,2 con fosfato de sodio/NaCl 0,5 M/azida de sodio al 0,01%) mediante alimentación por gravedad, y se volvió a cargar tres veces. El color de la muestra permitió la visualización del paso a través de la columna. Se recogió después el material no unido y se almacenó para referencia futura.

4. Se conectó después un sistema Waters LC y la muestra se lavó con varios volúmenes de columna de tampón de carga.

5. Después de la carga y el lavado, se llevó a cabo la elución usando tampón de fosfato de sodio 60 mM pH 7,2/NaCl 0,5 M/ α -metil-D-glucopiranosido 0,5 M/azida al 0,01%. Véase la figura 1a. Se detectó un único pico y se recogió éste.

6. Se eluyó después la columna hasta la línea base con aproximadamente 40 ml como máximo, y después se dejó durante toda la noche.

7. Después de la incubación durante toda la noche en tampón de metilglucósido, eluyó un segundo pico (véase la figura 1b), que alcanzó su punto máximo a 5 ml.

8. Se recogió el segundo pico y se dializó frente a ácido acético 0,05 M, y después se liofilizó. Ambos picos de concanavalina A1 (baja afinidad) y concanavalina A2 (alta afinidad), son potentes en la inhibición del cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺ y el metabolismo de la vitamina D en una línea de células renales humanas (CL8). La fracción de alta afinidad, la línea de células renales humanas (CL8), y las condiciones usadas para el ensayo se describen en Rowe *et al* 1996. Una línea de células renales conocida adecuada adicional para el ensayo es la línea celular OK depositada como ECACC 91021202.

ES 2 281 964 T3

Cromatografía de intercambio catiónico usando la columna de 1 ml de intercambio catiónico HiTrap SP (nº de código 17-1151-01; Pharmacia)

1. Se redisolvió después la proteína liofilizada en acetato de amonio 0,05 M pH 5 y entonces se aplicó a una columna de intercambio catiónico HiTrap SP Sepharose de 1 ml equilibrada.

2. Se equilibró la columna antes de la adición de la muestra lavando con agua, y después con 5 volúmenes de tampón de inicio (acetato de amonio 0,02 M pH 5).

3. Se eluyó la muestra usando el siguiente protocolo;

Número	Tiempo min.	Velocidad de flujo (ml/min)	% de acetato de NH ⁴ pH5	% de acetato de NH ⁴ /NaCl 0,5 M pH 5
1		0,5	100	0
2	15	0,5	25	75
3	20	0,5	0	100
4	25	0,5	0	100
5	35	0,5	100	0
6	50	0,5	100	0

Se obtuvo un único pico agudo, y se dializó después la muestra frente a ácido acético 0,05 M y se liofilizó, véase la figura 2.

Después de resuspender en 20 µl de tampón fosfato 10 mM pH 7,2, se resuspendieron alícuotas en tampón de muestra de SDS-PAGE (hasta una concentración final = TRIS-HCL 125 mM pH 6; glicerol al 2,5%; SDS al 0,5% p/v; β-mercaptoetanol al 5%; azul de bromofenol al 0,01%), se llevaron a ebullición (5 min.), se enfriaron y después se aplicaron sobre un gel de SDS-PAGE al 12,5% (véase el cromatograma), y se resolvió una doble banda de 55 kD (véase Rowe *et al* 1996). Tanto la banda de concanavalina A como la catiónica tenían también una forma agregada. Todas las fracciones incluyendo el medio condicionado tumoral eran potentes en la inhibición del cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺ en una línea de células renales humanas (dilución 1/1000), y alteraban también el metabolismo de la vitamina D. Para una descripción completa de los métodos usados para medir el transporte de fosfato y el metabolismo de la vitamina D, véase Rowe *et al* 1996. Todas las modalidades de purificación se llevaron a cabo en un sistema de HPLC/FPLC Waters programado por el software informático Millennium. La fracción más activa fue la fracción de concanavalina A1 del tumor OHO. Se usaron antiseros previos a la operación para seleccionar la fracción purificada inmovilizada. La fracción es también potente en la inhibición de NaPi, y afecta al metabolismo de la vitamina D en una línea de células renales humanas (CL8).

Ejemplo 2

Selección de medio condicionado tumoral (TCM), y fracciones purificadas con antisuero previo y posterior a la operación: selección de glucoproteína positiva

Se han descrito previamente en Rowe *et al* 1996 antiseros previos a la operación y posteriores a la operación de un paciente. Sólo los antiseros previos a la operación detectaron las fracciones purificadas y la hormona en TCM en el que la detección de Western y de glucoproteína de TCM y fracciones purificadas se logró usando quimioluminiscencia potenciada. Se biotinilaron marcadores de proteína, y se señalizó con conjugados de estreptavidina-peroxidasa. Las flechas muestran el agregado y la glucoproteína activa. Los antiseros posteriores a la operación y los sueros pre-inmunitarios de conejo no detectaron ninguna de las fracciones. Además, sólo aquellos tumores que secretaban factor fosfatúrico fueron positivos. Los controles de piel y medios de fueron negativos. Una característica distinta de las muestras de Con A1, Con A2 y CA1 era su potente capacidad de inhibir NaPi, y alterar el metabolismo de la vitamina D en una línea de células renales humanas (CL8). Todas las fracciones purificadas tienen una tendencia a agregarse en una forma de movilidad inferior sobre SDS-PAGE. Además, las fracciones purificadas y las fracciones activas de TCM están fuertemente glucosiladas. Se confirmó el grado de glucosilación mediante oxidación por peryodato de proteínas inmovilizadas sobre membranas PVDF seguido por biotilación de restos de hidratos de carbono. Éstos se seleccionaron después con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano y se potenció la quimioluminiscencia.

ES 2 281 964 T3

La forma activa (inhibe NapI, etc.), está asociada con la fracción de 58 a 60 kDa. Una forma adicional y potente de purificar la proteína hasta homogeneidad es el uso de un sistema de SDS-PAGE pH 7 neutro usando un gel Bis-Tris al 4-12% con tampón de elución MOPS. Los geles prefabricados pueden adquirirse de Novex.

5 Ejemplo 3

SDS-PAGE a pH neutro usando gradiente de poliacrilamida del 4-12% y gel Bis-Tris con tampón de elución MOPS (sistema Nu-PAGE de NOVEX): Movilidad reducida de la hormona

- 10 En este sistema, una fracción de la hormona glucosilada tiene movilidad reducida, y eluye a ~200 kDa. La forma de peso molecular inferior es también visible a 58/60 kDa. La aparición de la proteína de ~200 kDa puede deberse al punto isoelectrico de la proteína (diferente carga a pH neutro), y a la interacción del resto de hidrato de carbono con la matriz del gel. Además, ocurre eficacia aumentada de la electrotransferencia de componentes de alto peso molecular debido al bajo % de acrilamida (gradiente del 4-12%), en la parte superior del gel de gradiente. Las fracciones que eluyen a través de este sistema aumentan la pureza y homogeneidad de la molécula. Una inmunotransferencia de tipo Western
- 15 que usa este sistema y que incluye las siguientes muestras (se usó antisuero previo a la operación para seleccionar las transferencias usando detección por quimioluminiscencia potenciada): 1. marcadores de proteína; 2. línea celular OHO de tumor intracraneal; 3. células del espacio subdural adyacentes al tumor; 4. células de la duramadre adyacentes al espacio subdural; 5. línea celular HTB6; 6. línea celular Saos-2; 7. control de medio definido; 8. control de fibroblastos de la piel; 9. tumor de pólipo de nevus sebáceo lineal, demostró que el tumor de pólipo de nevus mostraba una banda fosfatúrica específica a ~200 kDa sobre geles neutros de SDS-PAGE.
- 20

Ejemplo 4

25 *Clonación y secuenciación de fosfatona*

1. Construcción de bibliotecas

- Se seccionó un tumor derivado de un paciente descrito en una publicación anterior (BD, Rowe *et al.*, 1996), y se extrajo el ARNm usando técnicas convencionales. Se copió el ARNm usando transcriptasa inversa para generar una población de ADNc que se subclonó después posteriormente en un vector de bacteriófago λ -ZAP II uni (vector
- 30 adquirido de Stratagene Ltd. Unit 140, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 4GF Reino Unido). La clonación fue unidireccional y el extremo 5' del gen era adyacente al promotor T3 y contiguo a un sitio EcoRI. El extremo 3' de los ADNc colindaba un sitio Xho-I en sentido 5' de un promotor T7 bacteriano. En resumen, se cortó el tumor reseccionado del paciente BD en bloques de 1 mm y se extrajo el ARN poli A+ directamente usando
- 35 tecnología de partículas paramagnéticas Streptavidin-Magnosphere (sistema PolyAtract[®] de Promega). Se usó después el ARNm purificado para generar un molde de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de Stratagene. Se añadieron cebadores del enlace al ADNc para generar un extremo 5' del ADNc compatible con EcoRI, y un extremo 3' del ADNc compatible con XhoI, para facilitar la clonación de orientación forzada en el vector de bacteriófago λ -ZAP II uni. Se colocaron en placas los bacteriófagos recombinantes y se amplificaron sobre XL1-Blue mrf' de *E. coli*. Los clones primarios totales ascendían a 800.000 con una representación del tipo natural del 6%.
- 40

2. Selección con antisueros pre-operativos

- Se colocó en placas la biblioteca de ADNc de bacteriófago en placas de agar NZY y se indujo el operón de β -galactosidasa usando IPTG. Se transfirieron después las proteínas de fusión expresadas a membranas de Hybond-C (Amersham) y se seleccionaron después las membranas con antisueros pre-operativos del paciente. Se han descrito los antisueros usados (Rowe *et al.*, 1996). Antes de usar se preabsorbieron exhaustivamente los antisueros con lisado de *E. Coli*, y sangre completa para reducir la razón de señal con respecto al ruido. Se preabsorbieron exhaustivamente
- 50 antisueros de conejo cultivados frente a suero previo a la operación del paciente BD (Rowe, Bone 18 (1996), con suero humano normal y lisado de *E. coli* para eliminar los anticuerpos de *E. coli* y los anticuerpos de fondo derivados de suero humano. En resumen, se añadieron cinco filtros de nitrocelulosa de 80 mm de diámetro a lisado de *E. coli* completo (Stratagene), y se empapó un segundo conjunto de cinco filtros con suero humano normal (10 ml). Se incubó cada filtro impregnado durante 10 min a temperatura ambiente secuencialmente con 250 ml de antisueros previos a la operación anti-conejo diluidos 1:1000 en BSA al 1%; Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM (TBS); Na₂S₂O₃ al 0,02%.
- 55 Se usaron después los antisueros previos a la operación preabsorbidos (pre-Aanti-op) para seleccionar la biblioteca de ADNc. Se colocaron en placas los clones de ADNc de OHO λ -ZAP II uni de bacteriófago en XL1-Blue mrf' de *E. coli* y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Se colocaron después filtros hybond N⁺ preincubados con IPTG 10 mM sobre la parte superior de las placas reveladas y se incubaron unas 3 h adicionales a 42°C. Se eliminaron después los filtros
- 60 y se lavaron con TBS complementado con Tween 20 (TBST), y después se bloquearon con BSA al 1% en TBS con Na₂S₂O₃ al 0,02% durante la noche a 4°C. Se añadió después pre-Aanti-op a los filtros bloqueados y se dejaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los lavados posteriores de los filtros y la incubación con conjugado de fosfatasa alcalina-anticuerpo de cabra anti-conejo, seguido por la visualización usando fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/azul de nitrotetrazolio, fueron tales como se describen mediante el kit de inmunoselección Picoblue[™] de Stratagene. Después
- 65 de seleccionar ~600.000 clones, se seleccionaron, nueve positivos, y se purificaron mediante selección secundaria y terciaria. Se rescataron como fagémidos los clones de bacteriófago usando el fago cooperador ExAssist y se clonaron en células SOLR de *E. coli*. El fago cooperador ExAssist y las células SOLR se adquirieron de Stratagene Ltd., Suite 140, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 4GF, Reino Unido.

3. Secuenciación de clones

Se prepararon fagémidos y se secuenció el ADN. Se secuenciaron los nueve clones. Se eliminaron las placas de bacteriófago positivas de las placas de agarosa tras la selección terciaria con una pluma hueca estéril. Se añadieron después los tapones de agarosa que contenían las placas líticas a 0,5 ml de tampón SM complementado con cloroformo al 0,02%, y se dejaron a 4°C durante la noche. Se realizó el rescate y la transformación de clones de bacteriófago en fagémidos BSCPT SKII usando el fago ExAssist tal como describe Stratagene. Las células huésped para el fagémido purificado fueron células SOLR de *E. coli*. Se preparó después ADN de plásmido usando técnicas convencionales (Rowe, Nucleic Acids Res. 22 (1994), 5134-5136), y se secuenció usando secuenciación automatizada fluorescente ABI y cebadores específicos de vector convencionales. Seis de los clones estaban solapando y estaban en marco con el promotor de β -galactosidasa bacteriano para dar epítomos contiguos/solapantes y proteínas expresadas con secuencias de ADN solapantes idénticas. El clon secuenciado más largo abarcaba las secuencias de ADNc de los otros cinco y se muestra en la figura 8. Esta secuencia (aminoácidos/ADNc) es una secuencia completa para la fosfatona. Hay 430 residuos de aminoácidos clonados (SEQ ID NO: 2) y 1655 pb de la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 1). La predicción de la estructura secundaria indica una proteína altamente hidrófila con glucosilación en el extremo COOH, y la presencia de un tripeptido de unión a células en el extremo amino (RGD), véase figura 8. La proteína es también altamente antigénica con varios dominios de hélice principales (figura 10). La selección extensa de todas las bases de datos disponibles usando BLAST no ha revelado ninguna homología estadísticamente relevante con secuencias de genes o proteínas conocidas.

4. Purificación de fosfatona humana recombinante

Se representa el clon de ADNc aislado como fagémidos rescatados en el vector Bscpt SKII - (vector de Stratagene), y contenidos en células huésped SOLR de *E. coli*. Se ha logrado bajo nivel de expresión de proteína de fusión mediante la inducción del promotor de β -galactosidasa por IPTG. El producto de fusión del clon de fosfatona reacciona con antisueros previos a la operación en inmunotransferencias de tipo Western. Puede lograrse expresión y bioactividad aumentadas de las proteínas de fusión subclonando en el vector pCAL-n-EK (vector de Stratagene) (véase a continuación). El constructo que contiene fosfatona humana está contenido en células de *E. coli* (BL21 (DE3) pLysS) (adquiridas de Stratagene). La inducción con IPTG de la proteína de fusión es mucho más alta, y puede obtenerse proteína esencialmente pura mediante cromatografía de afinidad de calmodulina de lisados celulares. La fosfatona recombinante con señal de fusión se une a la resina de calmodulina en presencia de Ca^{2+} . Se libera después la proteína de fusión de fosfatona tras lavar con EGTA. Se elimina la etiqueta de fusión microbiana pequeña mediante tratamiento con enterocinasa, dejando pura la fosfatona humana.

4a. Subclonación de fosfatona en el vector pCAL-n-EK

Se subclonó la secuencia codificante de ADNc deducida completa (deducida a partir del clon pOH011.1 de ADNc más grande), de fosfatona (MEPE) en el vector de expresión procariota de plásmido pCAL-n-EK (vector de Stratagene), y se transformó el constructo en BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* y XL1-Blue mrf' de *E. coli* respectivamente (cepas obtenidas de Stratagene). Se usó el método de clonación independiente de ligación (LIC) tal como se describe por el kit de clonación y purificación de proteínas Stratagene Affinity™ (Nº de cat.: Nº 214405 y Nº 214407). Se diseñaron dos cebadores a partir de los extremos 5' y 3' de la secuencia de fosfatona respectivamente con secuencias de ligador en proyección adicionales tal como sigue (la secuencia en negrita representa el ligador):

Directo 5' **GACGACGACAAG**.GTGAATAAAGAATATAGTATCAGTAA 3'

Ligador (SEQ ID NO: 8)

Inverso 5' **GGAACAAGACCCGT**.CTAGTCACCATCGCTCTCACT 3'

Ligador (SEQ ID NO: 9)

La amplificación por PCR de fosfatona incluye la secuencia de ADN que codifica para el primer residuo de valina del codón de parada de la fosfatona (véase figura 8), más una secuencia de ligador. Se genera después una proyección 5' de la secuencia de ligador tratando el fragmento de PCR con polimerasa Pfu y ATPd. Se realiza la inducción de la proteína de fusión haciendo crecer las células y añadiendo IPTG. Las condiciones de PCR fueron las siguientes. Predesnaturalización; 95°C 3 min, seguido por 20 ciclos de desnaturalización; 95°C 45 seg, hibridación 59°C 60 seg, 72°C 2 min, y después extensión final a 72°C 7 min; seguido por enfriamiento a 4°C. Se programó un termociclador Perkin Elmer 9600 para realizar la PCR, y se usó el siguiente tampón de PCR (PB): Tris-HCL 10 mM pH 8, KCl 50 mM, cebadores 1 μ M, NTPd 200 μ M. Se complementó el tampón PB con MgCl_2 2 mM. Para la clonación independiente de ligación (LIC), se trató después el producto amplificado con polimerasa pfu y ATPd tal

ES 2 281 964 T3

como describe Stratagene, y se hibridó directamente con el vector de plásmido pCAL-n-EK linearizado con salientes del ligador complementarios. Se transformó después el constructo en células XL1-blue mrf' de *E. coli* competentes, y BL21 (DE3) de *E. coli* competentes. Se seleccionaron después los clones en placas de ampicilina, y se prepararon y se secuenciaron plásmidos. Se muestra un esquema del vector y del constructo de fusión en la figura 14. Se logra un plásmido de alto número de copias con el huésped XL1-blue mrf' de *E. coli*, y se obtiene expresión de proteína altamente recombinante con BL21 (DE3) de *E. coli*.

4b. Purificación de fosfatónina mediante resina de afinidad de calmodulina

Puede usarse el método tal como describe Stratagene (cat~214405). La secuencia en sentido 5' de los residuos específicos de fosfatónina contendrá una secuencia de unión a calmodulina. Se añade resina de calmodulina al lisado celular en bruto en presencia de calcio, y se deja unir la proteína. Se lava después la suspensión con tampón que contiene calcio, y se eluye la proteína de fusión de fosfatónina mediante la adición de EGTA 2 mM en un tampón Tris (Tris-HCl 50 mM pH 8). Se logra después la eliminación de la señal de proteína de unión a calmodulina mediante digestión con proteasa EK específica de sitio, dejando pura la fosfatónina humana recombinante. Preferiblemente, puede realizarse el método como sigue (véase la tabla a continuación para composiciones de tampón):

1. Se cultivan y se inducen las células tal como describe el protocolo de Stratagene para vectores pCAL-n-EK (Nº de cat.: Nº 214405), usando células BL23 (DE3) de *E. coli* que comprenden el plásmido p1BL21; véase figura 14.

2. Se prepara también el lisado de proteína tal como describe el protocolo de Stratagene pero usando CCB-B-II como tampón de resuspensión (sedimento celular resuspendido de 500 ml en 10 ml de CCB-B-II). Es esencial sonicar en pulsos de 30 seg seguidos por 4 min de enfriamiento con hielo. Se mantienen en hielo los tubos que contienen células durante la sonicación.

3. Tras la sonicación, se centrifugan las células a 10000 g y se decanta el sobrenadante. La mayoría de la MEPE recombinante se mantiene en el sobrenadante (lisado de proteína).

4. Se concentra después el lisado de proteína usando un concentrador VIVASCIENCE VIVASPIN (Nº de cat.: VS1521 denominado 30.000 MWCO PES) con un punto de corte de peso molecular de 30.000. Aproximadamente se concentran 8 ml de sobrenadante de los 500 ml de células hasta 3,2 ml (concentrado 2,5X). No es aconsejable concentración adicional.

5. Para lisados de proteína preparados a partir de 190-200 ml de células (~1,3 ml de lisado de proteína equivalente), se añade después 1 ml de resina de calmodulina equilibrada (equilibrado de resina tal como describe Stratagene usando tampón CCB-B-II).

6. Se rota la suspensión durante la noche a 4°C.

7. Se centrifuga la suspensión (~3000 rpm en centrífuga Eppendorf durante 2 min), se elimina el sobrenadante y se resuspende la resina en 1 ml de tampón CCB-B-II.

8. Se centrifuga la resina de nuevo y se elimina el primer lavado. Esto se repite dos veces más (total de tres lavados en CCB-B-II).

9. Se lava después una vez con WB-III; obsérvese que ninguno de los tampones incluyendo el tampón de lavado final contienen detergentes. Las células usadas para el bioensayo son extremadamente sensibles a los detergentes incluso en cantidades traza. WB-II es igual que CCB-B-II pero sin inhibidores de proteasa.

10. Se eluyen las proteínas no específicas lavando con tampón EB-I dos veces (1 ml).

11. Se eluye MEPE con EB-II 2-3 veces (1 ml).

12. Se concentra la proteína usando un concentrador Flowgen 10K microsep a 4°C. Generalmente, 3 ml de eluato de MEPE pueden concentrarse hasta ~170 µl en 2 horas.

13. Tras procesar las muestras en un gel de SDS-PAGE para evaluar la pureza y cantidad, se preparan alícuotas múltiples y se congelan a -80°C. Se evita la descongelación y congelación repetidas.

ES 2 281 964 T3

Tampones:

Componente	CCBB-II	WBIII	EBI	EBII
Tampón Tris pH 8	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	150 mM	1 M
Acetato de Mg	1 mM	0	0	0
Imidazol	1 mM	0	0	0
CaCl	2 mM	2 mM	0	0
Inhibidores de proteasas sin EDTA	Si	No	No	No
EGTA	0	0	4 mM	4 mM

Se añadieron 1 comprimidos de inhibidores de proteasas por cada 10 ml cuando se usaron (Boehringer Mannheim), inhibidor de proteasa sin EDTA (Nº de cat.: 1836 170). Una elución final con NaCl 1 M, tampón EGTA (4 mM) da como resultado >95% de pureza de fosfatonina.

Ejemplo 5

Estructura de la fosfatonina

1. Estructura primaria y motivos

Se muestran la estructura primaria de la proteína y la secuencia de ácido nucleico en la figura 8. El clon de ADNc más grande aislado para MEPE fue de 1655 pb y contenía el extremo 3' completo del gen con una cola de poli A+ y una secuencia de poliadenilación única (AA[T/U]AAA) (figura 8). Se descubrió un marco de lectura abierto de 430 residuos que solapaba y se extendía por los otros clones aislados de ADNc de MEPE más pequeños, con un peso molecular predicho de 47,3 kDa y un pI de 7,4. El mejor ajuste de codón de inicio consenso, (Kozak, Nucleic Acids. Res. 15 (1987), 8125-8148), ocurre a 255 pb, aunque otras dos metioninas preceden a éste. Es posible que falte la secuencia 5' adicional, y necesita caracterizarse un codón de inicio más temprano y/o una secuencia no traducida 5' extendida. La predicción de la estructura secundaria GCG indica que la proteína es muy hidrófila con tres áreas localizadas de baja hidrofobicidad (figura 9). La proteína tiene motivos de glucosilación en los residuos 382 y 385 (NNST) y en los residuos 383-386 (NSTR). Hay también un sitio de unión a glucosaminoglucano en los residuos 161-164 (SGDG). El peso molecular aproximado sin glucosilación es de 54 kDa, y está bastante de acuerdo con la forma glucosilada purificada de (58-60 kDa). Hay varios motivos de sitio de fosforilación (véase tabla 1), y se predice que éstos desempeñan un papel en la actividad biológica de la hormona o fragmentos de la misma.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 281 964 T3

TABLA I

5		Sitio (en la figura 8)	Motivo
	Fosforilación de proteína cinasa C	8-10	SNK
		77-79	TFR
10		118-120	THR
		203-205	TKK
		228-230	TAK
15		311-313	STR
		312-314	TRK
		319-321	SNR
20		384-386	STR
		403-405	SNR
		408-410	SSR
25		409-411	SRR
30	Fosforilación de caseína cinasa II	8-11	SNKE
		139-142	SDFE
		177-180	TGPD
35		194-197	SEAE
		199-202	THLD
		224-227	TRDE
40		228-231	TAKE
		238-241	SLVE
		325-328	TLNE
45		423-426	SSSE
		425-428	SESD
		427-430	SDGD
50			
	Fosforilación de proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc	405-408	RRFS
55			
	Fosforilación de tirosina cinasa	40-47	KLHDQEEY
60	Miristoilación	16-21	GLRMSI
		143-148	GSGYTD
		119-224	GNTIGT
65		266-271	GSQNAH
		291-296	GSSDAA

	315-320	GVDHSN
	389-394	GMPQ GK
Amidación	370-373	HGRK
RGD	152-154	RGD
Sitio de unión a glucosaminoglucano	161-165	SGDG
Asu-glucosilación	382-386	NNST
	383-387	NSTR

Una característica clave de la proteína es una secuencia de unión a células en los residuos 152-154 (RGD). La secuencia Arg-Gly-Asp desempeña un papel en las interacciones con el receptor en general, y es esencial en fibronectina para la unión del receptor de la superficie celular a una integrina específica. Más notable es la presencia de este motivo en algunas formas de colágenos (proteína de la matriz ósea), fibrinógeno, vitronectina, factor de von Willebrand (VWF), desintegrinas de serpiente, y discoidinas de molde esbelto. Es altamente probable que esta parte de la fosfatona esté implicada en interacciones del receptor y/o la matriz mineral ósea. Estas interacciones median también lo siguiente:

1. Mineralización del osteoide (osteoblastos).
2. Regulación de la expresión génica del cotransportador de fosfato dependiente de Na.
3. Regulación de la expresión génica de la 24-hidroxilasa y/o 1-alfa-hidroxilasa (riñón).
4. Interacciones de la matriz mineral ósea y dental y regulación de la deposición mineral mediante nucleación.

La presencia de una secuencia de unión a glucosaminoglucano en los residuos 161-164 (SGDG), tiene importantes implicaciones que se refieren a la unión y a las interacciones minerales óseas. El papel de los proteoglicanos en la señalización celular está bien documentado. Es altamente probable que esta parte de la molécula sea también esencial para las bioactividades anteriores (punto 1 a 4), y en particular en la mineralización del osteoide mediada por osteoblastos.

El motivo RGD está una región de giro predicha (Garnier prediction Antheprot), y está flanqueado por dos regiones de lámina β (residuos 134 a 141 y 172 a 178). La estructura de lámina predicha está flanqueada a su vez por dos regiones de hélice α extendida (121 a 132 y 196 a 201). El contexto estructural general, giro predicho y presencia de la secuencia de unión a células RGS es similar al encontrado en la osteopontina. La proteína tiene también varios motivos de fosforilación predichos para la proteína cinasa C, caseína cinasa II, tirosina cinasa, y proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc. Se descubrió también que MEPE tenía un gran número de sitios de N-miristoilación, y estos sitios parecen ser una característica de las fosfogliproteínas que contienen RGD (osteopontina, vitronectina, colágeno, proteína de unión a h-integrina, sialofosfoproteína dentinaria, proteína I de la matriz dentinaria, sialoproteína II ósea y fibronectina). Hay un contenido anormalmente alto de residuos de aspartato, serina y glutamato (26%), tal como en la osteopontina (37%). De particular interés es la ausencia completa de residuos de cisteína en la secuencia de MEPE, que indica que los puentes disulfuro cisteína-cisteína no desempeñan un papel en la estructura secundaria de esta molécula. Se descubrió homología de secuencia con la fosforina dentinaria (DPP) tras la selección de la base de datos trembl con MEPE. Una región en el extremo C terminal de MEPE tiene una secuencia de residuos de aspartato y serina (residuos 414-427) que son casi idénticos (homología del 80%), con un motivo recurrente encontrado en DPP (figura 26A y 26B). La comparación fisicoquímica del motivo de MEPE (DDSSSESDSGSSSESD) con el motivo de DSP (SDSSDSSDSSSSSDSS), aumenta la homología hasta el 93%. El motivo de MEPE se produce una vez en el extremo C terminal de MEPE (residuos 414 a 427), mientras que se repite el homólogo de DSP en las posiciones de residuos de DSP 686 a 699, 636 a 646, y 663 a 677. Además, se encuentran dos secuencias relacionadas DSSDSSDSSNSSSDS y DSSDSSDSSNSSSDS, también con el 80% de homología respecto al motivo de MEPE, en DSP en las posiciones 576 a 589 y 800 a 813 respectivamente. Se encuentra también un motivo similar con el 60% de homología (DDSHQS DESHHSDESD) en la osteopontina (residuos 101 a 116), y está contenido un sitio de fosforilación de caseína cinasa II dentro de la región de homología (figura 12). La actividad de la caseína cinasa II esquelética es defectuosa en raquitismo ligado al cromosoma X (Rifas, loc. cit.). Aunque el motivo de MEPE de osteopontina es central y no de extremo C terminal, se ha notificado la escisión de la osteopontina *in vivo* y esto generaría un péptido con el motivo de MEPE colocado en la posición de extremo C terminal (Smith, J. Biol. Chem. 271 (1996), 28485-28491). Se encuentra también homología de secuencia adicional con el motivo de MEPE del extremo C terminal en DMA-1 en los residuos 408 a 429 (SSRRRDDSSSESDSGSSSESDG). Se presenta en la figura 12 una presentación gráfica de la homología de secuencia regional del motivo de MEPE en DSSP, DMA-1 y OPN como un gráfico estadístico "lalnview", y la tabla 2 presenta las semejanzas de secuencia en el alineamiento.

ES 2 281 964 T3

TABLA 2

MEPE frente a DSSP

5	Secuencia superior de MEPE:		
	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	686 DSSDSSDSSSSSDS	699	(SEQ ID NO: 13)
10	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	633 DSSDSSDSSSSSDS	646	(SEQ ID NO: 13)
15	413 DDSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 10)
	551 DDSSDSSDSSDSSDS	565	(SEQ ID NO: 14)
20	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	576 DSSDSSDSNNSSDS	589	(SEQ ID NO: 15)
	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	663 DSSDSSDSSSSSDS	677	(SEQ ID NO: 13)
25	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	752 DSSESSDSSNNSDS	765	(SEQ ID NO: 16)
30	414 DSSESSDSGSSSES	427	(SEQ ID NO: 7)
	800 DSSDSSDSSNNSDS	813	(SEQ ID NO: 17)

MEPE frente a osteopontina:

35	Secuencia superior de MEPE		
	413 DDSSESSDSGSSSESD	428	(SEQ ID NO: 11)
40	101 DDSHQSDSHHSDESD	116	(SEQ ID NO: 18)

Osteopontina frente a DSSP

45	Secuencia superior de osteopontina		
	106 SDESHHSDESD	116	(SEQ ID NO: 19)
50	638 SDSSSSSDSSD	648	(SEQ ID NO: 20)
	106 SDESHHSDESD	116	(SEQ ID NO: 19)
	846 SDSSDSSDSSD	857	(SEQ ID NO: 21)
55	106 SDESHHSDESD	116	(SEQ ID NO: 19)
	857 SDSSDSSDSSN	878	(SEQ ID NO: 22)

MEPE frente a DMA-1

60	Secuencia de la parte superior de MEPE		
65	408 SSRRRDSSSESSDSGSSSESDG	429	(SEQ ID NO: 12)
	443 SSRSKEDSN-STESKSSSEEDG	463	(SEQ ID NO: 23)

Es de interés la existencia repetitiva del motivo en la región de extremo C terminal de DSSP o de la parte de fosforina dentinaria. En la figura 13 se muestra una comparación de secuencia de matriz de puntos de MEPE frente a DSSP a alta y baja rigurosidad, y esto ilustra la existencia repetitiva del motivo de MEPE rico en aspartato-serina en DSSP.

Se forma DPP mediante escisión tras la traducción de una proteína mucho más grande, la sialofosfoproteína dentinaria (DSSP), en dos proteínas distintas DPP y sialoproteína dentinaria (DSP). Hay considerable homología de secuencia de MEPE y osteopontina con la fosforina dentinaria (DPP), parte de la sialofosfoproteína dentinaria (DSSP), sin homología con la parte de sialoproteína dentinaria de la molécula (DSP) (figura 13). Es digno de mención el alineamiento estrecho del motivo RGD, los motivos de fosforilación de caseína cinasa II y los sitios de N-glucosilación tanto en DPP como MEPE (figura 13). También, todos los sitios de proteína cinasa C asociados con DSSP están agrupados en la región de solapamiento con MEPE (parte de fosforina dentinaria), no encontrándose ninguno en la parte DSP de la molécula.

2. Estructura secundaria

En las figuras 3 a 6 se muestran los perfiles de predicción de la estructura de péptido CGC de hidrofobicidad/hidrofilicidad, antigenicidad, flexibilidad y probabilidad de superficie celular. Estas figuras muestran el análisis de predicción de la estructura de péptido CGC de la secuencia de aminoácidos primaria. Los índices de hidrofobicidad e hidrofiliicidad están representados como triángulos y óvalos respectivamente. Los motivos de glucosilación están representados como círculos sobre tallos en los residuos 382-386. Pueden verse símbolos de glucosilación más claramente en la figura 6. Se indica el giro de la proteína por la forma de la línea que representa la secuencia de aminoácidos primaria. Se indican las regiones de hélice α , espirales y estructura de lámina mediante ondulaciones localizadas de la línea (para más detalle remítase a la figura 7). Se realizaron predicciones informáticas usando el software GCG derivado del centro de recursos HGMP de Cambridge (Rice, 1995) manual de programas para el paquete EGCG. (Cambridge. CB10 1RQ. England: Hinxton Hall). Una característica sorprendente es la falta de residuos de cisteína y el alto grado de hidrofiliicidad, con cuatro sitios secundarios con índices hidrófobos bajos (residuos 48-53, 59-70, 82-89, y 234-241). La proteína no tiene un perfil transmembranoso tal como se deduce a partir de la predicción de la estructura secundaria usando el software antheroplot. La proteína es también altamente antigénica y flexible (figuras 4 y 5). El perfil de estructura secundaria global es indicativo de una proteína secretada extracelular, y está de acuerdo con la función propuesta de la molécula. La figura 7 muestra las regiones de hélice, estructura de lámina, giro y espiral de la fosfatona. Ésta se basa en una predicción usando análisis Garnier del paquete antheroplot v2.5e. Las cuatro líneas de cada sección (desde la parte superior hasta la inferior) representan los índices de probabilidad de hélice, espiral, lámina y giro de la secuencia de aminoácidos primaria. El gráfico de la parte inferior presenta los mismos datos en forma de bloque. Es de destacar el alto contenido en hélice, particularmente en el extremo NH₂ terminal y también hacia el extremo C terminal, lo que puede tener un contexto funcional.

Ejemplo 6

Usos médicos de fosfatona y fragmentos de fosfatona

Se pueden tratar varios trastornos usando polipéptidos según la presente invención.

Raquitismo ligado al cromosoma X (hipofosfatemia) (HYP)

El raquitismo ligado al cromosoma X es una de las enfermedades hereditarias más comunes del metabolismo mineral óseo (Rowe, 1997). Los fragmentos bioactivos de fosfatona tales como los escindidos por PHEX y la hormona no escindida desempeñarán un papel principal en el tratamiento de la enfermedad. Se predice que la proteína clonada y descrita en el presente documento, interactúa con su receptor relacionado en el riñón y provoca una inhibición en la expresión de un cotransportador de fosfato dependiente de Na (NaPi), y una regulación por incremento o bien directa o bien indirectamente de una 24 hidroxilasa renal. Se predice también que regula por disminución la expresión de la 1 α hidroxilasa renal (directa/indirectamente). Tras la escisión con PHEX u otros modificadores tras la traducción, se predice que los fragmentos de péptido derivados de la hormona tienen la biofunción opuesta (regulación por incremento de NaPi, regulación por disminución de 24 hidroxilasa, regulación por incremento de 1 alfa hidroxilasa). Se prevé que el fragmento que contiene los residuos RGD de unión a células (152-154), desempeñe un papel en las interacciones con el receptor, aunque otros derivados de péptido pueden mediar también las interacciones ligando receptor para bioactividades dispares. También, los derivados de fosfatona desempeñarán una importante función en la normalización de las lesiones óseas hipomineralizadas. Se predice que esto se produce mediando cambios en la mineralización del osteoide mediada por osteoblastos, y corrigiendo la expresión/fosforilación aberrante de proteínas de la matriz mineral ósea (osteopontina/osteocalcina). La secuencia RGD de unión a células y también el motivo de unión a glucosaminoglucano podrían requerirse para la nucleación y cristalización funcional de hidroxiapatita y mineral óseo.

El deterioro en el crecimiento es una característica principal de HYP, y los tratamientos actuales no son adecuados. El tratamiento mediante administración de fragmentos derivados de fosfatona opuesto a la complementación con fosfato inorgánico y vitamina D, puede corregir esto.

Por consiguiente, entre los efectos útiles de los fragmentos peptídicos de fosfatonina están:

1. Corrección de la hipofosfatemia (NaPi, preferiblemente renal)
2. Normalización de la actividad de la 24-hidroxilasa, 1 alfa hidroxilasa (renal).
3. Mineralización del hueso y reparación ósea (corrección/prevencción del raquitismo).
4. Desaparición completa de síntomas de dolor óseo.
5. Corrección del crecimiento atrofiado.

Osteomalacia hipofosfática oncogénica (OHO)

El perfil clínico de OHO es similar a HYP. Hay una pérdida de fosfato renal, bajos niveles circulantes de 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol), fosfatasa alcalina elevada, hipomineralización ósea que en adultos se presenta como un ablandamiento óseo generalizado (osteomalacia) y fosfato bajo en suero. Las patofisiologías de HYP y OHO se solapan claramente. En el raquitismo, el defecto es un gen PHEX no funcional. Sin embargo, en OHO hay fosfatonina no procesada circulando. A menudo, los tumores son difíciles de encontrar, y pueden ser extremadamente difíciles y peligrosos de resectar. El control del metabolismo del fosfato y la mineralización ósea es esencial cuando la eliminación del tumor está contraindicada. Se predice que la administración de PHEX a pacientes para escindir la hormona es peligrosa ya que otras hormonas y proteínas circulantes pueden resultar afectadas también por la escisión promiscua. Los fragmentos de fosfatonina podrían diseñarse en su lugar para que tengan alta bioactividad y afinidad por el receptor, de modo que compitan eficazmente con la hormona circulante derivada de tumor no procesada.

Otros estados de raquitismo o hipofosfáticos

Hay muchas causas de raquitismo además de HYP y OHO, las más comunes implican anomalías de la vitamina D, pero hay causas tales como hipofosfatemia, acidosis tubular renal, uso de ciertas medicaciones, enfermedad celiaca, fibrosis quística, etc. El uso de fragmentos de fosfatonina, y la fosfatonina por sí misma pueden usarse para tratar estas enfermedades. Algunas de las enfermedades se analizan brevemente a continuación (las enfermedades que dan como resultado hiperfosfatemia pueden tratarse potencialmente mediante el uso de la hormona completa).

• *Trasplantes renales y osteodistrofia renal*

Una característica crónica del trasplante renal es el desarrollo de una pérdida de fosfato renal (hipofosfatemia), y mineralización ósea anómala. Los fragmentos de fosfatonina serían eficaces en el tratamiento de esto sin efectos secundarios asociados con medicaciones actuales.

La osteodistrofia (una combinación de trastornos óseos), está provocada normalmente por insuficiencia renal crónica (enfermedad renal). La insuficiencia renal da como resultado la muerte, a menos que se administre diálisis (enfermedad renal en fase final). Por lo tanto, los pacientes con osteodistrofia siguen normalmente un tratamiento de diálisis. Esta enfermedad ósea, que también se denomina "osteodistrofia renal", es común en pacientes en hemodiálisis crónica. Se desarrolla hiperparatiroidismo secundario en la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal crónica, y se asocia con el hallazgo histológico de osteitis fibrosa quística. La enfermedad se caracteriza por retraso del crecimiento y deformidades óseas graves en niños, especialmente en los muy jóvenes. La patogénesis de la osteodistrofia renal se relaciona con la retención de fosfato (hiperfosfatemia), y su efecto sobre el metabolismo del calcio y calcitriol, además de los papeles desempeñados por la acidosis metabólica, citocinas, y degradación de hormona paratiroidea. El tratamiento incluye la restricción de la ingesta de fósforo en la dieta, aglutinantes de fosfato, y uso de metabolitos activos de la vitamina D. En este contexto la adición de hormona no procesada sería un medio potente para controlar los niveles de fosfato, y conduciría a la curación ósea. Si los receptores para la fosfatonina se expresan en un intervalo de tejidos así como el riñón, entonces existe el potencial para tratar pacientes con enfermedad renal en fase final (es decir, pérdida completa de la función renal).

• *Osteoporosis/pérdida mineral ósea*

Las mujeres post-menopáusicas son propensas a la pérdida de mineral óseo con el daño consecuente a la integridad del esqueleto. Se desconoce la causa pero es probable que implique una interacción compleja de factores genéticos y ambientales. La investigación actual se enfoca en la refinación de modelos estadísticos para analizar enfermedades multifactoriales tales como osteoporosis.

El uso de fragmento(s) derivado(s) de fosfatonina ayudaría en el tratamiento de esta enfermedad invirtiendo potencialmente la pérdida mineral ósea. Además, podrían modificarse los péptidos bioactivos para aumentar la potencia y especificidad de la acción.

• *Enfermedad Pagets del hueso*

La enfermedad de Pagets se produce debido a remodelación ósea asincrónica. La mineralización ósea (mediada por osteoblastos), y la resorción ósea (mediada por osteoclastos), están fuera de paso. Se produce actividad resorptiva de osteoclastos excesiva (predominantemente en la fase resorptiva temprana), y se sustituye médula ósea por tejido fibroso y travéculas desorganizadas. Aunque se desconoce la causa, la administración de derivados peptídicos de fosfatona puede ayudar en el tratamiento de la enfermedad.

• *Enfermedades relacionadas con trastornos en NaPi y otros tejidos diferentes del riñón*

El cotransportador de fosfato dependiente de sodio (NaPi) se expresa no solo en el riñón sino también en muchos otros tejidos. Se han descrito tres tipos de NaPi, a saber tipo I, II y III hasta ahora y se dice que todos se expresan en el riñón. En tejidos diferentes del riñón, se dice que se expresa el tipo III de manera ubicua (Murer, Eur. J. Physiol. 433 (1997) 379-389; Kavanaugh, Kidney Int. 49 (1996) 956-963) y se ha confirmado que el tipo I se expresa en el hígado y cerebro además del riñón (Hilfiker, PNAS 95 (1998), 14564-14569). Por otra parte, se ha creído que el tipo II se expresa sólo en el túbulo proximal del riñón.

Aunque se sabe que el túbulo proximal del riñón expresa los tres tipos anteriores, se acepta ampliamente que el tipo II desempeña el papel más significativo en cuanto a la resorción de fosfato en este sitio. Esto se ha demostrado mediante un ratón deficiente en el que el gen (denominado Npt2) que codifica para NaPi de tipo II estaba inactivado. Los mutantes homocigóticos (Npt2^{-/-}) mostraban excreción urinaria de fosfato aumentada, hipofosfatemia, aumento en la concentración sérica de 1,25-dihidroxitamina D, y otros síntomas típicos con raquitismo hipofosfémico hereditario con hipercalcemia (HHRH) (Beck, PNAS 95 (1998), 5372-5377). Ya que la regulación de la homeostasis de fosfato en mamíferos se determina en gran parte por el riñón, se piensa que este resultado demuestra que NaPi de tipo II desempeña el papel más importante en la homeostasis de fosfato sistémica entre los tres tipos. Además, estos hechos, junto con el resultado del experimento con la línea celular CL8 en los ejemplos indican que el NaPi que se regula por la fosfatona en el riñón es predominantemente el tipo II.

Uno de los problemas clínicos principales con los pacientes con insuficiencia renal es la hiperfosfatemia. Hay un valor clínico significativo si se controla tal fosfato excesivo en suero. Por lo tanto, la fosfatona, sus fragmentos o derivados que pueden regular por disminución NaPi y reducir el nivel de fosfato en suero tienen un valor potencial principal. En pacientes con insuficiencia renal progresiva (denominada anteriormente enfermedad renal en fase final = ESRD), la regulación por disminución de NaPi que se expresa en el riñón por fosfatona será valiosa.

Sin embargo, una vez que estos pacientes se tienen ESRD y se pierde la mayoría de la función renal, la fosfatona perderá finalmente su sitio de acción en el riñón debido a que no se excretará más fosfato desde los glomérulos. En tal fase de la enfermedad, existe un valor potencial en el control de la absorción de fosfato de la dieta en el tracto digestivo. El tracto digestivo, particularmente el intestino, es el único lugar en el que se capta fosfato de la dieta dentro de la circulación. Por lo tanto, esta será la próxima diana principal para controlar la captación de fosfato dentro de la circulación después de que se pierda la función renal.

Se notificó que se clonó un subtipo de NaPi de tipo II a partir de intestino de ratón (Hilfiker, PNAS 95 (1998), 14564-14569). Aunque todavía falta saber si la fosfatona puede realizar su efecto sobre el NaPi de tipo IIb intestinal, se espera razonablemente que este NaPi de tipo IIb en el intestino desempeñe un papel principal en la absorción de fosfato a partir de la dieta y que la fosfatona pueda ser el factor más significativo para su regulación por incremento y por disminución.

Ejemplo 7

Composiciones farmacéuticas

Pueden formularse composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido según la presente invención que incorporan opcionalmente un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La naturaleza y las cantidades exactas de los componentes de tales composiciones pueden determinarse empíricamente y dependerán en parte de la vía de administración de la composición. Las vías de administración a los pacientes incluyen la vía oral, bucal, sublingual, tópica (incluyendo oftálmica), rectal, vaginal, nasal y parenteral (incluyendo intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea e intraarticular). Con el fin de evitar la proteólisis no deseada, se prefiere una vía parenteral.

Las dosis adecuadas de una molécula de la presente invención variarán, dependiendo de factores tales como la enfermedad o el trastorno que va a tratarse, la vía de administración y la edad y el peso del individuo que va a tratarse. Por ejemplo, para la administración parenteral puede ser adecuada una dosis diaria de desde 0,1 μ g hasta 1,5 mg/kg de una molécula de la invención para tratar a un adulto normal. Más adecuadamente, la dosis podría ser de 1 μ g a 150 μ g. En consecuencia, se prevé que el principio activo polipeptídico puede administrarse en un intervalo de dosis de desde 0,01 a 100 mg, normalmente de 0,1 a 10 mg, diariamente para un adulto humano.

Las composiciones para la administración parenteral, por ejemplo comprenderán normalmente una disolución de la molécula disuelta en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede utilizarse una variedad de vehículos acuosos, tales como agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, etc. Tales disoluciones

deben ser ventajosamente estériles y generalmente estar libres de agregados y otra materia particulada. Las composiciones pueden contener tampones farmacéuticamente aceptables para ajustar el pH, o alterar la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de la molécula en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo desde menos de aproximadamente el 0,5% hasta el 15 o el 20% en peso y podrían seleccionarse según fuera apropiado por la persona experta.

Las composiciones farmacéuticas típicas se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas para inyección podrían prepararse para que contengan 1 ml de agua tamponada estéril y 50 mg de molécula. Una composición típica para infusión podría prepararse para que contenga 250 ml de disolución estéril de Ringer y 150 mg de molécula. Los métodos reales para preparar las composiciones se conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica. Los enfoques a la formulación y la administración de las composiciones farmacéuticas de polipéptidos son bien conocidos por los expertos en esta técnica y se tratan, por ejemplo, por P. Goddard en Advanced Drug Delivery Reviews, 6 (1991) 103-131.

Ejemplo 8

Caracterización adicional de fosfatona (MEPE) y su gen codificante

Perfil clínico de pacientes (BD, ND, EM y DS) con osteomalacia oncogénica

Se ha descrito el paciente BD en una publicación anterior (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169), y también se ha publicado un informe del caso para paciente ND (David, J. Neurosurg. 84 (1996), 288-292). Ambos pacientes mostraron osteomalacia tumoral clásica y se presentaron con fosfato sérica bajo y osteomalacia radiológica, y 1,25-vitamina D3 sérica baja. El paciente BD (mujer de 44 años de edad), y el paciente ND (mujer de 66 años de edad), mostraron remisión completa de los síntomas tras la extirpación de los tumores de la cavidad nasal izquierda (hemangiopericitoma), y el espacio intracraneal (tumor de tipo hemangiopericitoma mesenquimatoso), respectivamente. El paciente ND tuvo tres de tales operaciones durante un periodo de veinte años, y se produjo remisión tras cada resección.

Medios condicionados tumorales

Se recogieron muestras de tumor tanto de BD, ND como de EM inmediatamente tras la resección. Las muestras se cortaron entonces en trozos de ~ 1 mm y algunas se congelaron en nitrógeno líquido. Los trozos restantes del tejido tumoral se procesaron para cultivo tisular tal como se describió anteriormente (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169). En resumen, las muestras se digirieron con colagenasa durante la noche, y después se sometieron a ciclos alternos de cultivo en presencia y ausencia de suero (medios DMEM). Con el paciente ND, también se recogieron muestras adicionales de espacio subdural circundante, y duramadre, y se trataron tal como se describió anteriormente. Además, se obtuvieron cultivos de fibroblastos cutáneos control del paciente BD en el mismo día de la resección del tumor, y se trataron de la misma forma que las muestras tumorales. Las muestras del paciente BD se etiquetaron tal como sigue: 1: medios condicionados tumorales (TCM-BD); 2: medios condicionados cutáneos (SCM-BD). Las muestras del paciente ND se etiquetaron tal como sigue: 1: Medios condicionados tumorales (TCM-ND); 2: medios condicionados del espacio subdural (SDCM-ND); 3: medios condicionados de duramadre (DCM-ND); 4: fluido que rodea al tumor intracraneal (FST-ND). Todas las muestras se recogieron de ciclos del cultivo en los que las células se hacían crecer en medios DMEM libres de suero, a menos que se indique en el texto mediante la adición de "complementado con suero" a las abreviaturas anteriores.

Cromatografía de afinidad en concanavalina A de TCM

La cromatografía de afinidad en concanavalina A de medio condicionado tumoral (TCM) del paciente ND, realizada según el ejemplo 1 dio como resultado el aislamiento de fracciones de alta y baja afinidad (HCA y LCA, respectivamente). Ambas fracciones HCA y LCA se eluyeron con el tampón de elución α -metil-D-glucopiranosido (0,5 M). En resumen, se llevó a cabo la purificación parcial de las proteínas TCM mediante cromatografía de afinidad en concanavalina A utilizando un método descrito por (Wagner, Gen. Comp. Endocrinol. 63 (1986), 481-491), con modificaciones. La concanavalina A - Sepharose (Pharmacia, número de código: 17-0440-01, 14 ml), en etanol al 20%, se lavó primero con varios volúmenes de columna de agua y después se equilibró en tampón de desplazamiento (CRB; fosfato de sodio 0,06 M, pH 7,2 y NaCl 0,5 M). Después se añadió la suspensión equilibrada a una columna con rosca superior de Pharmacia, de 12 mm X 115 mm, y se añadieron tres volúmenes de columna de tampón de desplazamiento CRB a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min (sistema de cromatografía de FPLC/HPLC millenium Waters). Entonces se añadieron a la columna medios condicionados equilibrados en tampón CRB (10 ml), y se dejó que se unieran. La columna se lavó entonces con varios volúmenes de columna de tampón de carga CRB, y después se llevaron a cabo eluciones de las proteínas unidas mediante la adición de tampón de elución fosfato de sodio (ERB; 60 mM pH 7,2 / NaCl 0,5 M / α -metil-D-glucopiranosido 0,5 M / azida al 0,01%), a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min (40 ml). Las proteínas de alta afinidad se eluyeron tras la incubación de la columna durante la noche en tampón ERB, seguido por un segundo paso de tampón ERB a 0,2 ml/min. Los perfiles de elución para las proteínas TCM con alta y baja afinidad por concanavalina A fueron idénticos y produjeron un único pico simétrico a volúmenes de columna ~1,6. El pico LCA representó 1/3 de la masa total del pico HCA, y se recuperó 1 μ g de material de HCA de 10 ml de medios condicionados tumorales (TCM), del paciente ND.

Fracciones de concanavalina A y SDS- PAGE de TCM

El medio condicionado tumoral, los medios condicionados y los picos de concanavalina A (HCA y LCA), se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron tras tinción con SYBR-Orange. Se llevó a cabo electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida utilizando el sistema de electroforesis Novex NuPAGE™ que consiste en geles en gradiente de Bis-Tris acrilamida al 4 - 12% (pH 6,4) y tampón de elución MOPS-SDS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico 50 mM; Tris-base 50 mM; SDS 3,5 mM; EDTA 1,0 mM; pH 7,7). Las series se llevaron a cabo a tensión constante de 200 durante 50 min. Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos en tampón de muestra NuPage (glicerol al 10%; Tris-base al 1,7%; Tris-HCl al 1,7%; dodecilsulfato de litio al 2%; ditiotreitól 50 mM; EDTA al 0,015%; Serva Blue G250 al 0,075%; rojo fenol al 0,025%; concentración final a pH 7,5). Se añadió el antioxidante NuPage a la cámara de electroforesis superior, tal como se recomienda por los fabricantes. Tras la electroforesis, se tiñeron las proteínas mediante la incubación de los geles en ácido acético al 7,5% complementado con SYPRO-Orange. La visualización de las proteínas se logró tras iluminación UV usando el sistema de obtención de imágenes en gel Fluorimager de Bio-Rad. Las fracciones HCA y LCA se tiñeron de forma positiva para dos proteínas a 56 kDa y 200 kDa, respectivamente y dieron perfiles idénticos. El material de los medios condicionados (paciente ND), del tumor intracraneal, del espacio subdural (inmediatamente adyacente al tumor en el paciente) y de la duramadre contenían varias bandas principales que abarcaban ~50-80 kDa. En todas las preparaciones estaba presente una banda destacada a ~ 66 kDa con un componente más débil de peso molecular muy alto a ~ 200 kDa presente en el tumor y el espacio subdural. La intensidad relativa de la banda de ~ 200 kDa fue superior en el material tumoral y estuvo ausente en la duramadre. Un conjunto difuso de bandas a ~55-60 kDa estaba presente en el tumor y en el espacio subdural, pero estaba ausente en el medio condicionado de duramadre (paciente ND). Los medios condicionados de la piel y el control de los medios no revelaron ninguna tinción para proteínas. Los medios condicionados del paciente BD y EM dieron perfiles similares, excepto por la ausencia de la proteína de alto peso molecular a 200 kDa. Los tejidos tumorales no fosfatúricos de los pacientes LA y SL, y también los controles de piel, contenían todos ellos la banda de 66 kDa y también una tinción difusa a 50-60 kDa. Los picos HCA y LCA de afinidad a concanavalina A estaban enriquecidos por la banda de alto peso molecular de 200 kDa y también contenían proteínas del intervalo de 50-66 kDa. Los medios condicionados de las líneas celulares óseas HTB96 y SaOs2 dieron perfiles de proteínas casi idénticos a los medios condicionados tumorales de OHO-paciente ND. La intensidad de la banda de 200 kDa en SaOS2 estaba reducida con relación a TCM del tumor cerebral (paciente ND), espacio subdural (paciente ND), y CM de HTB96.

Inmunotransferencia y tinción de glucoproteínas de las fracciones purificadas y de TCM

Para las inmunotransferencias de tipo Western, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham), utilizando electroforesis submarina. Tras la electroforesis en SDS-PAGE, los geles se equilibraron en tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM; glicina 0,38 M; SDS al 0,2% (TB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas de PVDF se cortaron al tamaño deseado, se enjuagaron brevemente en metanol, se lavaron en agua destilada y después se equilibraron en TB. El gel equilibrado y la membrana de PVDF se intercalaron entonces entre filtros y se colocaron en un portafiltros. El portafiltros se colocó entonces en un dispositivo de electrotransferencia submarina de sistema Hoeffer con tampón TB y refrigeración mantenida a 4°C mediante un termorefrigerador. La transferencia de las proteínas se llevó a cabo colocando el extremo de la membrana de PVDF de la intercalación hacia el ánodo, y se realizó la electroforesis a 0,4 A (45 V) constantes durante 45 minutos. Las inmunotransferencias se seleccionaron con dilución 1/1000 de antiseros pre-Anti-op, antiseros post-Anti-op, o calmodulina conjugada con fosfatasa alcalina utilizando los métodos descritos en el kit Enhanced-Chemiluminescence (Amersham; ECL+), o el kit de detección de afinidad a calmodulina (Stratagene), respectivamente. La quimioluminiscencia se detectó y se filmó utilizando el sistema FluorImaging de Bio-Rad, y la unión de afinidad a calmodulina se visualizó utilizando el sistema colorimétrico tratado anteriormente para la detección de clones (Stratagene). Se utilizaron marcadores de peso molecular biotinilados (Amersham) como controles internos para evaluar la transferencia y el peso molecular. Se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) al anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP), para facilitar la visualización de los marcadores biotinilados a través de quimioluminiscencia.

Las inmunotransferencias de tipo Western de los medios condicionados tumorales fosfatúricos (TCM), de pacientes con OHO dieron bandas quimioluminiscentes positivas cuando se seleccionaron con antiseros preabsorbidos previos a la operación. Los tumores no fosfatúricos, los controles titulares de piel y los controles de medios fueron todos negativos cuando se seleccionaron con antiseros preabsorbidos previos a la operación. Además, todas las muestras de TMC y medios condicionados fueron negativas cuando se seleccionaron con antiseros tras la operación.

La selección de las proteínas de TCM del paciente ND, y las líneas celulares de osteosarcoma HTB96 y SaOS2 con antisuero preabsorbido previo a la operación reveló dos bandas inmunopositivas diferenciadas a ~54-57 kDa y ~200 kDa. La muestra tumoral del paciente ND y el tejido subdural adyacente dieron señales mucho más fuertes de 54-57 kDa con respecto a los medios condicionados de la muestra de cerebro de duramadre, y no se encontró tinción para la banda de 200 kDa en los medios condicionados de duramadre. Ambas fracciones de concanavalina A HCA y LCA contenían una señal muy fuerte para la banda de 200 kDa, y una señal reducida pero visible a 54-57 kDa. Las líneas celulares SaOS2 y HTB96 también fueron positivas para las mismas bandas, pero los medios condicionados de SaOS2 tuvieron una señal reducida para la banda de 200 kDa con respecto a TCM y HTB96.

Los medios condicionados cutáneos (paciente ND y BD), y los controles de medios fueron negativos, ya que fueron selecciones con antiseros tras la operación (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169). MEPE recombinante (MEPE-

rec), tiñó positivamente con antisueros preabsorbidos tras la operación, y esto pudo competir con MEPE-rec añadido. Se obtuvo una banda positiva de 54-57 kDa con proteína teñida con Sybr-Orange y antisueros preabsorbidos previos a la operación seleccionaron MEPE-rec. Ésta fue del mismo tamaño que la banda de 55-57 kDa (seleccionada de inmunotransferencia de tipo Western preabsorbido previo a la operación), encontrada en los medios condicionados tumorales del paciente ND, y las líneas celulares de osteosarcoma HTB96 y SaOS2. MEPE recombinante contiene un etiqueta de CBP de 4,5 kDa en el extremo N-terminal que disminuye la movilidad y da como resultado un aumento evidente en el peso molecular en geles de SDS-PAGE. Por tanto, el tamaño equivalente de la proteína derivada del tumor y MEPE-rec puede deberse a la modificación tras la traducción de MEPE derivada del tumor (posiblemente mediante glucosilación).

Las inmunotransferencias de tipo Western de los pacientes con tumor OHO BD y EM contenían bandas principales positivas de antisueros preabsorbidos previos a la operación a peso molecular ligeramente inferior (48-52 kDa), así como una banda que migra conjuntamente a 55-57 kDa con MEPE-rec. Otras bandas de peso molecular superior también se observaron a 61, 75, 80 y 93 kDa (señales más débiles).

En todas las muestras, la banda principal de proteínas teñidas con SYBR-Orange a 66 kDa fue negativa cuando se seleccionó con antisueros preabsorbidos previos a la operación. La selección de glucoproteínas de las inmunotransferencias duplicadas dieron los mismos resultados que la selección con antisuero previo a la operación y ambas bandas de 54-57 kDa y 200 kDa se tiñeron de forma positiva, lo que confirma que estas proteínas están glucosiladas. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia en membranas de PVDF, tal como se describe en métodos anteriores. Se llevó a cabo una detección específica de glucoproteínas utilizando un kit de inmunotransferencia para la detección de glucoproteínas (Bio-Rad), y se añadieron marcadores biotinilados de Amersham como controles internos. En resumen, tras la transferencia, las membranas se trataron con peryodato de sodio 10 mM en tampón de acetato de sodio / EDTA para oxidar los restos de hidrato de carbono. Las inmunotransferencias se lavaron entonces en PBS y se incubaron con hidrazida en tampón acetato de sodio / EDTA durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los filtros se lavaron entonces tres veces (10 minutos) con TBS. Se llevaron a cabo el bloqueo y la detección posteriores, tal como se describió anteriormente, utilizando el kit de quimioluminiscencia mejorada (Amersham), y estreptavidina - peroxidasa de rábano picante. No se utilizaron anticuerpos primarios ni anticuerpos secundarios de cabra anti-HRP de conejo.

En conclusión los antisueros preabsorbidos previos a la operación detectan específicamente proteínas derivadas de TMC- osteomalacia hipofosfatémica oncogénica. Las principales proteínas detectadas caen en tres intervalos diferenciados de tamaño molecular de 48-52 kDa, 54-57 kDa y 200 kDa. Todas las muestras de OHO-TCM fueron positivas para la proteína de 54-57 kDa y todas las proteínas detectadas mediante antisueros preabsorbidos previos a la operación se tiñeron de manera positiva cuando se seleccionaron para determinar el estado de las glucoproteínas. Ningún tejido control de tumores OHO ni los medios fueron negativos cuando se seleccionaron con antisueros preabsorbidos previos a la operación.

Ejemplo 9

Expresión de proteína de fusión de MEPE a partir del vector pCAL-n-EK

La totalidad de la secuencia codificante del ADNc se subclonó en pCAL-n-EK, tal como se describe en el ejemplo 4a. La validación del constructo de fusión generado mediante la inducción por IPTG del huésped de *E. coli*, BL21 (DE3), se logró mediante la selección de inmunotransferencias tipo Western con antisueros previos a la operación, y también con calmodulina conjugados con fosfatasa alcalina, tal como se describió anteriormente. La proteína de fusión con etiqueta de CBP microbiano (péptido de unión a calmodulina de 4,5 kDa), que contiene el péptido calmodulina, el sitio de enterocinasa y el sitio de trombina fue de 56 kDa, tal como se dedujo mediante SDS-PAGE. Esto es una concordancia aproximada con el tamaño molecular esperado (~48 kDa). La purificación de la proteína se logró mediante cromatografía de afinidad a calmodulina, tal como se describió anteriormente. La preincubación de los antisueros previos a la operación con el constructo de fusión purificado dio como resultado una disminución de la señal de 55-57 kDa observada seleccionando con inmunotransferencias de tipo Western de TCM, pero no la banda de 200 kDa. Se supuso que el no reducir completamente la señal de 55-57 kDa se debe al reconocimiento específico del resto de glucosilación altamente antigénico presente en MEPE-proteína incipiente (TCM), pero ausente en el constructo de fusión microbiano de MEPE-rec. La proteína de fusión fue soluble en tampones Tris acuosos y no se requirió ninguna fase con detergentes el proceso de purificación.

Ejemplo 10

Expresión tisular (RT/PCR y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Northern)

Se seleccionaron inmunotransferencias de tipo Northern que contenían ARN poli A+ con ADNc de MEPE y no se detectó hibridación para estómago, tiroides, médula espinal, nódulo linfático, tráquea, glándula suprarrenal, médula ósea, corazón, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas (inmunotransferencias MTN de Clontech I y III). Para el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Northern, se seleccionaron dos inmunotransferencias de Clontech (MTNTM y MTNTMIII), que contenían los siguientes ARN poli A+: 1; corazón, 2; cerebro, 3; placenta, 4;

pulmón, 5; hígado, 6; músculo esquelético, 7; riñón, 8; páncreas, 9; estómago, 10; tiroides, 11; médula espinal, 12; nódulo linfático, 13; tráquea, 14; glándula suprarrenal, 15; médula ósea, con ADNc de MEPE amplificado con cebadores internos específicos (Pho433-111F y PHO877-111R). Las secuencias de cebador para Pho433-111F y PHO877-111R están resaltadas en la figura 8 (posiciones de nucleótidos 433 a 456 (SEQ ID NO: 24) y 877 a 900 (SEQ ID NO: 25), respectivamente), y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización previa; 95°C 3 min; seguida por treinta ciclos de desnaturalización; 95°C 45 s, hibridación; 65°C 30 s, polimerización; 72°C 45 s, y extensión final de 72°C 7 min, seguido por enfriamiento a 4°C. Se utilizó un tampón de PCR (PB), con una concentración final de MgCl₂ 2 mM. El producto de 444 pb de ADNc de MEPE amplificado se resolvió entonces mediante electroforesis submarina en agarosa, visualizada mediante tinción con bromuro de etidio, y se purificó utilizando perlas de vidrio (kit Gene-clean II: Bio 101 INC). El ADN purificado se radiomarcó entonces utilizando α -³²P-dCTP (3000 ci/mmol) junto con el kit de marcaje MegaPrime de Amersham. Se obtuvieron de manera rutinaria actividades específicas de 5 X 10⁹ cpm/ μ g. La hibridación (60°C), y la hibridación previa (60°C), de las inmunotransferencias se llevaron a cabo utilizando métodos publicados (Rowe, Hum. Genet. 97 (1996), 345-352), y se realizaron lavados en condiciones de rigurosidad, tal como sigue: 1; dos lavados a temperatura ambiente durante 30 min. con 2X SSC - SDS al 0,1%, dos lavados a 60°C durante 30 min. en 0,1 X SSC - SDS al 0,1%. Los filtros se expusieron entonces a película durante 7 días a -80°C y las películas se revelaron. El ARN humano total procedente de las glándulas suprarrenales, cerebro, duodeno, corazón, riñón, hígado, pulmón, piel, bazo, timo, tiroides, amígdalas, no se amplificó utilizando RT/PCR y los cebadores específicos de MEPE, aunque se encontró evidencia de expresión de bajo nivel usando un molde de ADNc para cerebro, riñón, hígado y páncreas. Para este experimento, se extrajo el ARN total de los siguientes tejidos humanos: 1; timo, 2; cerebro, 3; testículos, 4; duodeno, 5; corazón, 6; piel, 7; hígado, 8; amígdalas, 9; bazo, 10; tiroides, 11; glándulas suprarrenales, 12; pulmón, 13; riñón, 14; tejido tumoral de OHO, 15; osteoblastos primarios humanos. También se obtuvo ARN total de osteoblastos primarios de rata. Se utilizaron cebadores internos de MEPE tal como se describió anteriormente (Pho433-111F y PHO877-111R), para copiar el ARN total utilizando transcriptasa inversa-PCR y el kit de PCR para ARN de Perkin Elmer-Roche. En resumen se disolvió 1 μ g de ARN total en 20 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, dNTP 1 mM, inhibidor de ribonucleasa 1 unidad/ μ l, transcriptasa inversa de MULV 2,5 unidades/ μ l, cebador en el sentido de 3' 0,75 μ M (PHO877-111R). La mezcla se incubó entonces a 37°C durante 10 min. Entonces se añadieron el cebador en el sentido de 5' (Pho433-111F), dNTP, MgCl₂, y la ADN polimerasa AmpliTaq para dar concentraciones finales de 0,15 μ M, 200 μ M, 2 mM y 2,5 unidades/100 μ l, respectivamente, en un volumen total de 100 μ l. Se llevó a cabo una PCR utilizando un termociclador de Perkin Elmer (sistema 9700), ajustado al programa siguiente: desnaturalización previa; 95°C 3 min.; seguido por treinta y cinco ciclos de desnaturalización; 95°C 45 s, hibridación; 65°C 30 s, polimerización; 72°C 45 s y una extensión final de 72°C 7 min. seguido por enfriamiento hasta 4°C. Los productos amplificados se resolvieron utilizando electroforesis en gel de agarosa y se verificaron mediante inmunotransferencia de tipo Southern y se secuenciaron. Además, un panel de ADNc normalizado derivado de una variedad de tumores distintos a OHO (carcinoma de mama, carcinoma de pulmón I, adenocarcinoma de colon I, carcinoma de pulmón II, adenocarcinoma prostático, adenocarcinoma de colon II, carcinoma de ovario, carcinoma pancreático; panel de tumores humanos de Clontech número K1422-1) fueron todos negativos para PCR de MEPE, excepto por una expresión de nivel muy bajo en un caso de adenocarcinoma de colon, carcinoma de ovario y carcinoma prostático, respectivamente (detectados tras selección de tipo Southern de los productos amplificados por RT/PCR con ADNc de MEPE radiomarcado). En marcado contraste, la RT/PCR utilizando cebadores de MEPE amplificó ARN poli A+ de tumores de OHO, de cuatro pacientes diferentes BD, DM, EM y DS, lo que indicó altos niveles de expresión (normalizado frente a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada y transferrina). El ARN poli A+ de tumores no fosfatúricos y tejidos control de pacientes con OHO (piel y material adyacente a los tumores), línea de células renales humanas CL8, células de osteoblastos primarios humanos (adquiridos de Clonetics H-OST, véanse los materiales), y el ARN poli A+ extraído de un supuesto pólipo tumoral de un paciente con síndrome del nevus sebáceo lineal (TCM del pólipo no inhibió la captación de fosfato en la línea de células renales humanas CL8), no se amplificaron utilizando cebadores específicos de MEPE. Utilizando ADNc adquirido de Clontech derivado de corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas (panel humano I número K1420-1), como moldes para PCR con cebadores de MEPE, se detectó expresión de bajo nivel en cerebro, hígado, pulmón y páncreas. La secuenciación de las bandas amplificadas por los cebadores de MEPE reveló una homología completa con el ADNc de MEPE y la selección de tipo Southern de las bandas amplificadas con ADNc de MEPE confirmó los resultados de la secuenciación. El ARN poli A+ molde de OHO de todos los pacientes con OHO amplificó de manera sistemática una banda esperada de 480 pb y una banda inferior de 190 pb. La banda superior se confirmó mediante secuenciación y autorradiografía de tipo Southern, como completamente homóloga a la secuencia de MEPE, y la banda inferior se confirmó como una derivada de MEPE mediante análisis de tipo Southern. La banda inferior no apareció en los tejidos normales con expresión de bajo nivel ni en los tumores OHO. Esto indica que el corte y empalme alternativo puede desempeñar un papel en el MEPE derivado de tumor. Todos los experimentos de RT/PCR y PCR se normalizaron frente a G3PDH y transferrina.

En resumen, la expresión de alto nivel de MEPE (tal como se midió mediante los niveles de ARNm) sólo se encontró en las muestras de tumor OHO y se encontró evidencia de expresión de nivel muy bajo (posiblemente ectópico) en cerebro, hígado, riñón y tres de once tumores distintos de OHO. Ocho de once tumores fueron negativos para la expresión de ARNm de MEPE (RT/PCR), y todos los resultados se normalizaron frente a los cebadores de RT/PCR de GA3PDH y transferrina.

Ejemplo 11

Análisis de tipo Southern (inmunotransferencias genómicas)

5 Las inmunotransferencias genómicas que contienen ADN inmovilizado derivado de una familia con raquitismo autosómico (Rowe, Hum. Genet. 91 (1993), 571-575), y digeridas con PstI, EcoRI, PvuII y MspI, respectivamente se seleccionaron con ADNc de MEPE radiomarcado, tal como se describió anteriormente. Se llevó a cabo el análisis de tipo Southern utilizando digestos genómicos de ADN extraído de sangre, tal como se describió anteriormente (Rowe, Hum. Genet. 93 (1994), 291-294). La inmunotransferencia de PstI reveló la presencia de una banda de 11 kb y también
10 un polimorfismo de 4 kb en uno de los dieciséis miembros de la familia examinados. Las inmunotransferencias de EcoRI, PvuII y MspI fueron todas positivas para bandas únicas de 6 kb, 6,5 kb y 4 kb, respectivamente, y confirmaron la procedencia humana del gen. Debido a la falta de información genética no fue posible deducir si el gen se segregó con la enfermedad en esta familia con raquitismo autonómico.

15 Ejemplo 12

Captación de fosfato en una línea celular renal humana CL8: complementación con TCM y MEPE

Se realizaron experimentos de captación de fosfato y glucosa en una línea celular renal humana (CL8), tal como se describió anteriormente (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169). En resumen, las células se cultivaron en medio definido (DM), hasta confluencia o incubación durante la noche en placas de cultivo tisular de fondo plano de 24 pocillos (Falcon 3047). El DM se sustituyó entonces por DM reciente complementado con proteína de fusión purificada o TCM purificado mediante afinidad a concanavalina y se dejó durante toda la noche a 37°C. Se midió entonces la captación de metil-glucosa marcada con P³² y C¹⁴ (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169).
25

La adición de TCM (dilución 1/20) a líneas celulares renales humanas dio como resultado una reducción significativa de la captación de fosfato dependiente de Na⁺, tal como se notificó anteriormente (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169). Esta inhibición se evitó mediante la preincubación de TCM con antisueros previos a la operación y no con los posteriores a la operación, también se notificó anteriormente (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169). La adición de fracciones purificadas mediante concanavalina A de alta y baja afinidad (HCA y LCA, respectivamente), a concentraciones de 40 ng/ml también dio como resultado la inhibición de la captación de fosfato dependiente de Na⁺ (NaPi). Tanto las fracciones de TCM como las de concanavalina A fueron específicas para la captación de fosfato, y no afectaron a la captación de α -metil-D-glucosa dependiente de Na⁺. En todos los casos, los efectos fueron dependientes de la dosis.
30

Se llevaron a cabo experimentos similares con proteína de fusión de MEPE purificada mediante cromatografía de afinidad a calmodulina. Sorprendentemente, MEPE recombinante no inhibió el cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺, pero aumentó la captación de fosfato de una manera dependiente de la dosis (véase la figura 24). Se observó una duplicación de la captación de fosfato a 1000 ng/ml (p<0,001). Estos experimentos confirman que la proteína de fusión de MEPE aumenta específicamente el cotransporte de fosfato dependiente de Na⁺ en la línea celular renal humana CL8.
35
40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) polinucleótidos que codifican al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 (figura 8);
- (b) polinucleótidos que comprenden la secuencia codificante tal como se describe en la SEQ ID NO: 1 (figura 8) que codifica al menos para los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido;
- (c) polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido de (a) o (b) que codifican para un polipéptido que regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (d) polinucleótidos que codifican para un polipéptido cuya secuencia tiene una identidad del 60% o más con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por un polinucleótido de (a) o (b), en los que dicho polipéptido regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (e) polinucleótidos que codifican para un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d), en los que dicho fragmento regula por incremento el cotransporte de fosfato dependiente de sodio;
- (f) polinucleótidos que codifican para una parte que lleva un epítipo de un polipéptido de fosfatona que comprende los residuos de aminoácidos desde 1 hasta 40, desde 141 hasta 180 y/o desde 401 hasta 429 en la SEQ ID NO: 2 (figura 8); y
- (g) polinucleótidos cuya secuencia de nucleótidos está degenerada como resultado del código genético hasta una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de uno cualquiera de (a), (b), (e) o (f).
2. El polipéptido de la reivindicación 1, que tiene un peso molecular aproximado de 60 kDa tal como se midió sobre SDS-PAGE o que tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa tal como se midió sobre bis-tris SDS-PAGE a pH 7.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, que está glucosilado y/o fosforilado.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se puede obtener tras la purificación de células Saos-2 (Nº de depósito ECACC 89050205).
5. Un polinucleótido que codifica para un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El polinucleótido de la reivindicación 5, que comprende ARN o ADN.
7. Un vector que contiene el polinucleótido de la reivindicación 5 ó 6.
8. Una célula huésped modificada genéticamente con el polinucleótido de la reivindicación 5 ó 6, el vector de la reivindicación 7 o producida introduciendo una secuencia control de la expresión dentro de una célula huésped que medie la expresión de un gen que codifica para el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Un procedimiento para producir un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende: cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 y recuperar dicho polipéptido del cultivo.
10. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. Una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases contiguas de longitud de la secuencia codificante del polinucleótido tal como se describe en la SEQ ID NO: 1 (figura 8) o de una cadena complementaria de la misma.
12. Un método para identificar un componente de unión a un polipéptido de fosfatona que comprende:
- (a) poner en contacto un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con un compuesto que se ha de seleccionar; y
- (b) determinar si el compuesto afecta a una actividad del polipéptido.
13. Una composición que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5 ó 6, un vector de la reivindicación 7, un anticuerpo de la reivindicación 10 o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.

ES 2 281 964 T3

14. La composición de la reivindicación 13, que es una composición farmacéutica y comprende además un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 15. La composición de la reivindicación 13, que es una composición de diagnóstico y comprende además medios para detección.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Pico A2 de concanavalina

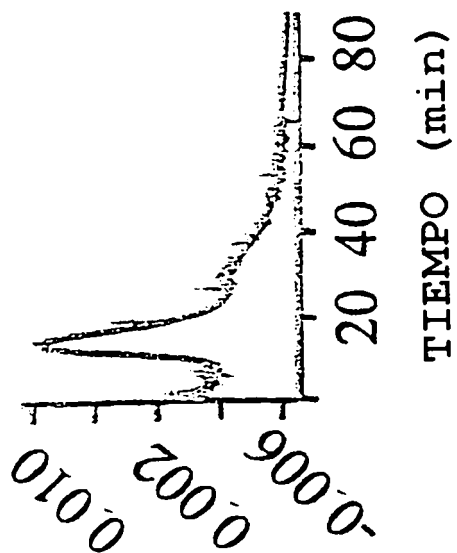


Figura 1b

Pico A1 de concanavalina

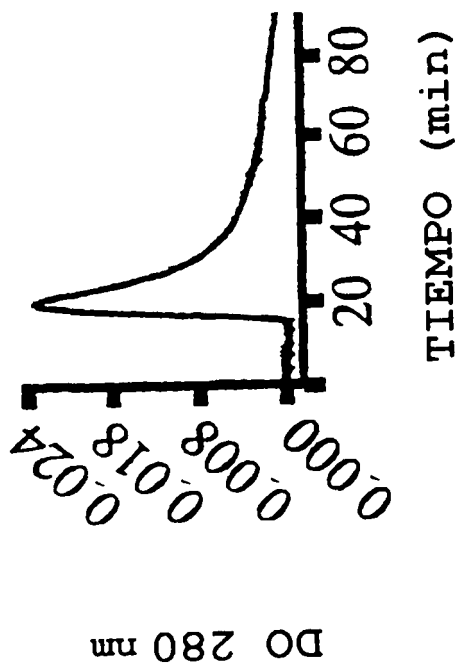


Figura 1a

Crotamotagria catiónica de SP-Sepharose

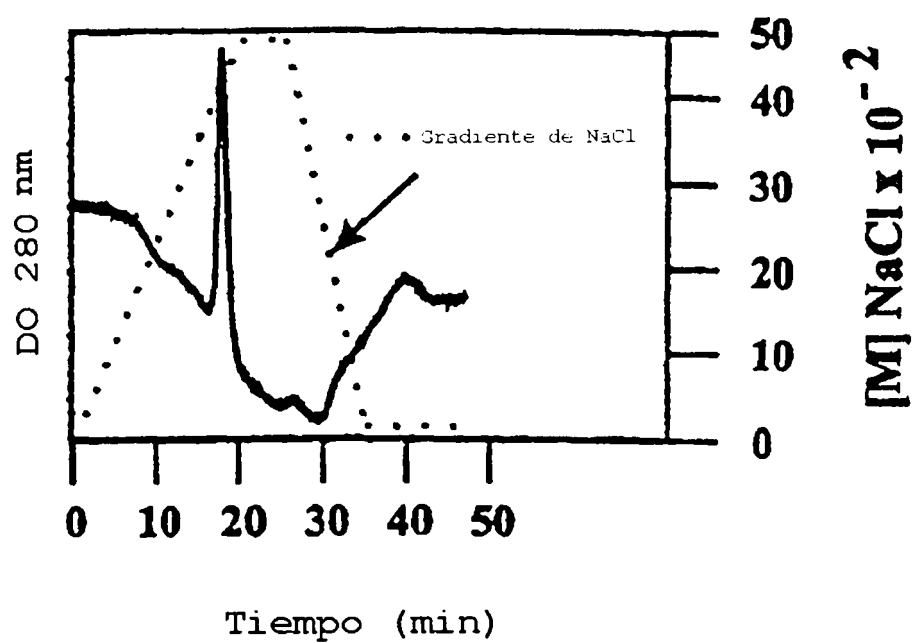


Figura 2

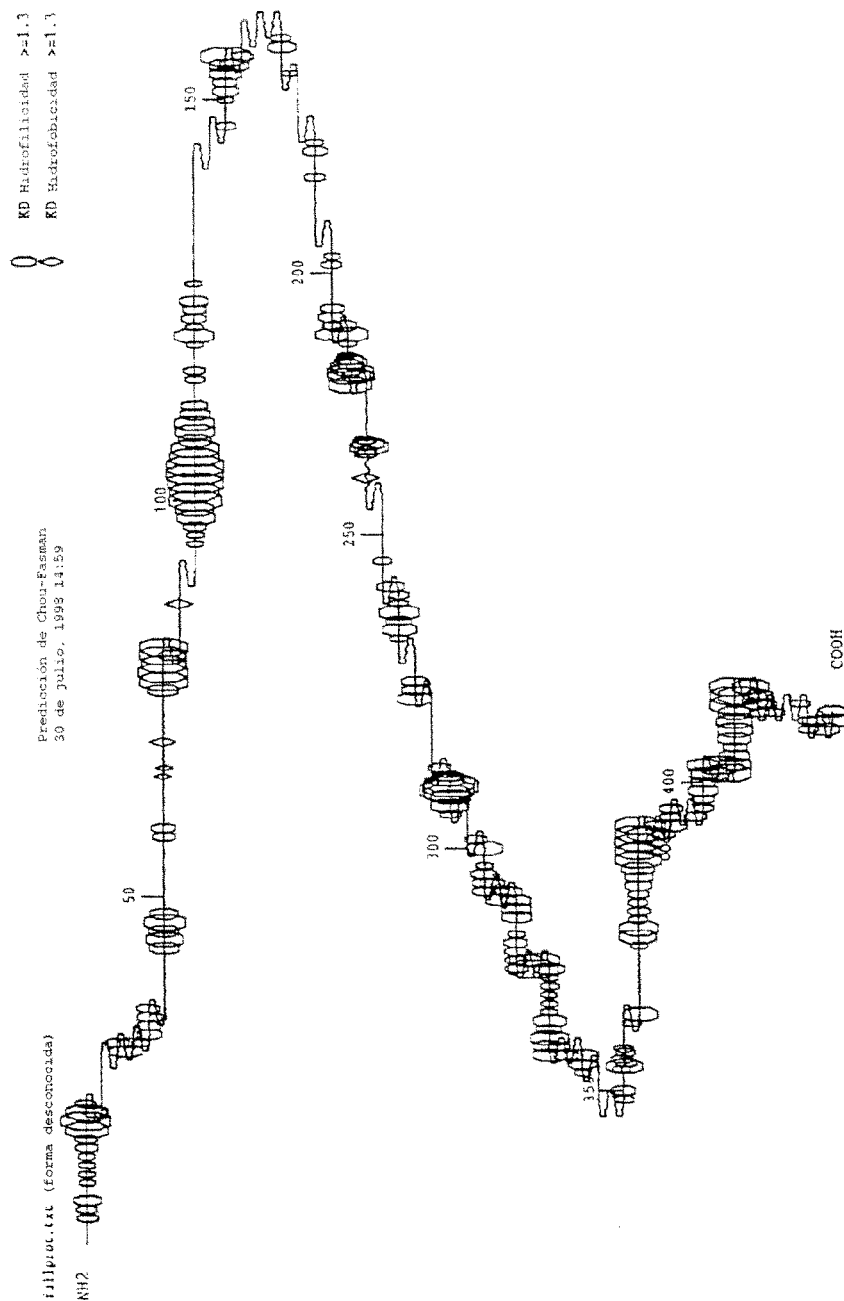


Figura 3

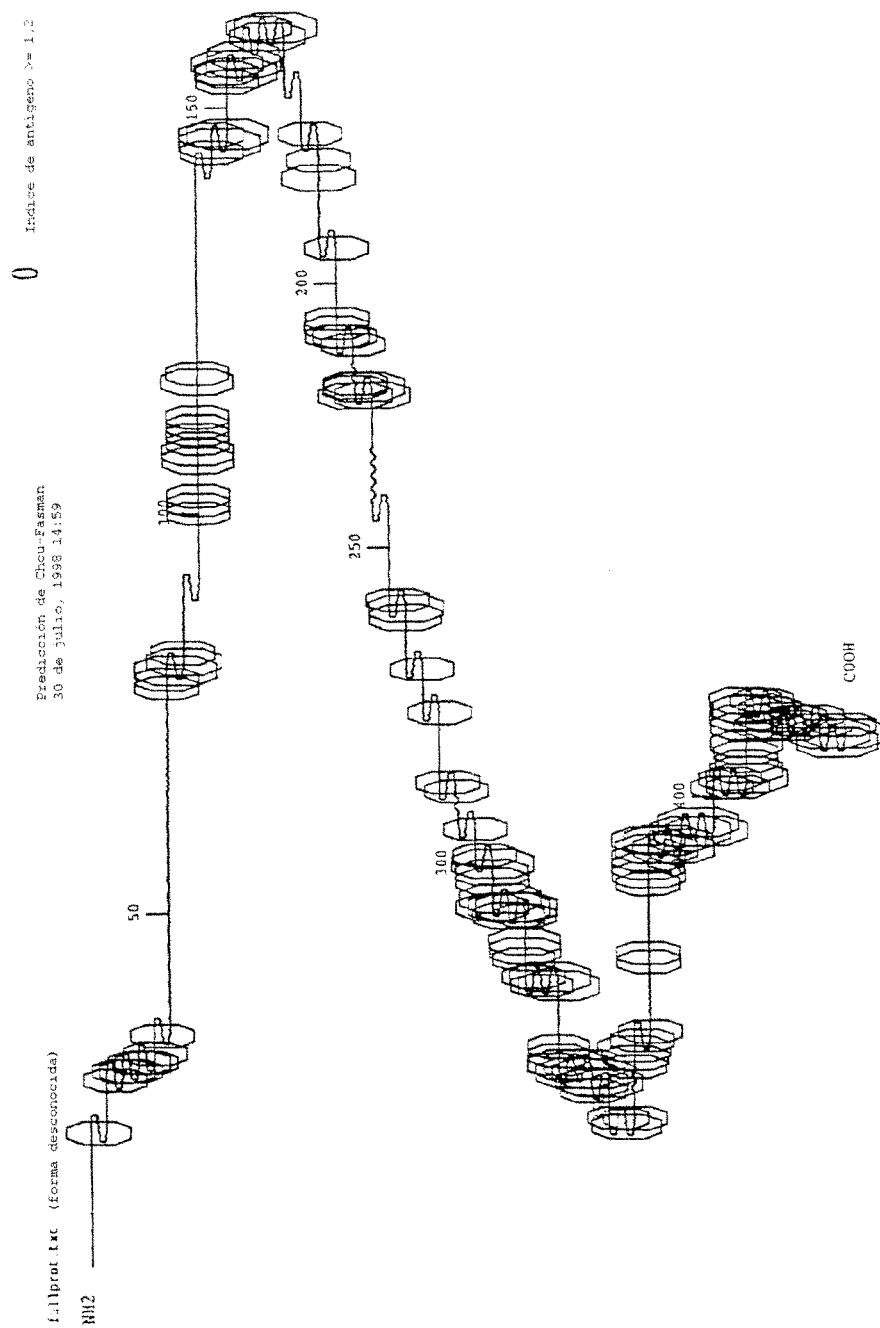


Figura 4

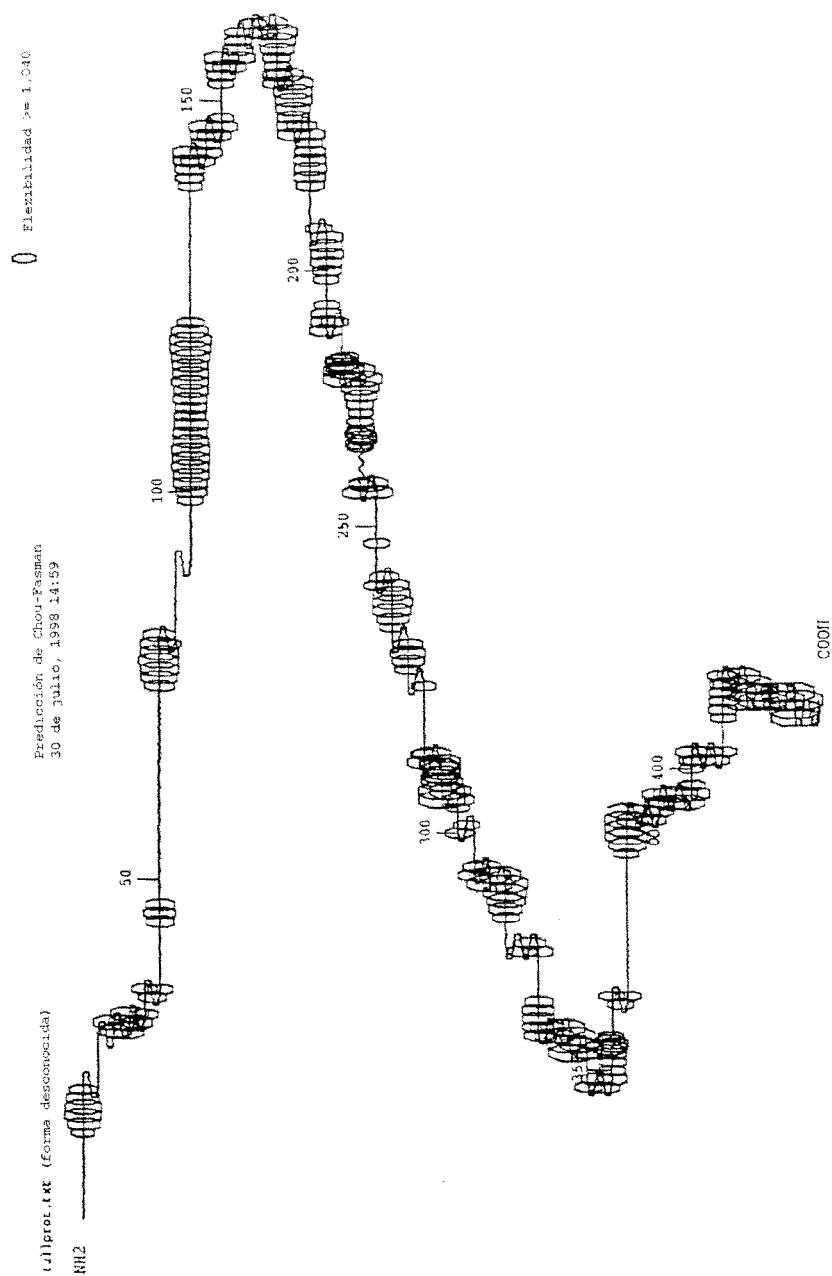


Figura 5

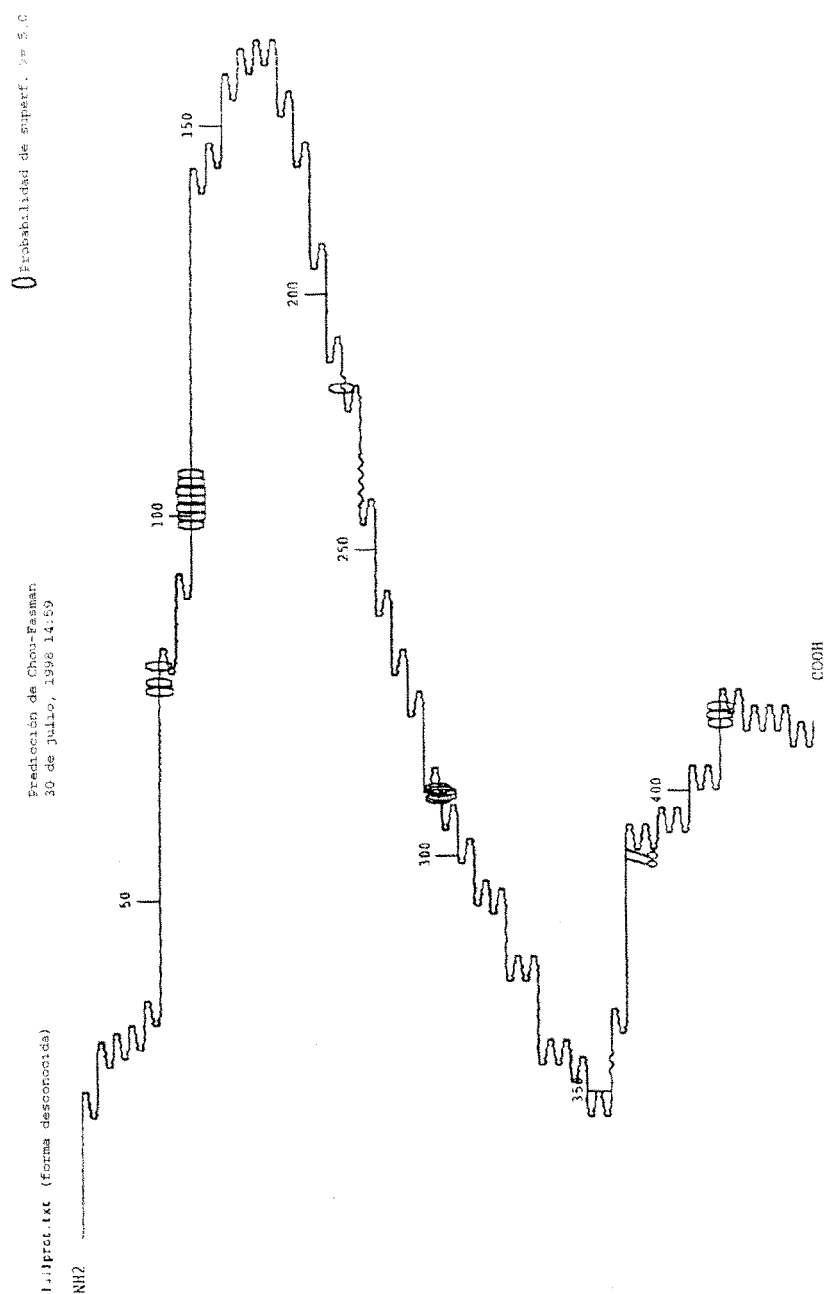


Figura 6

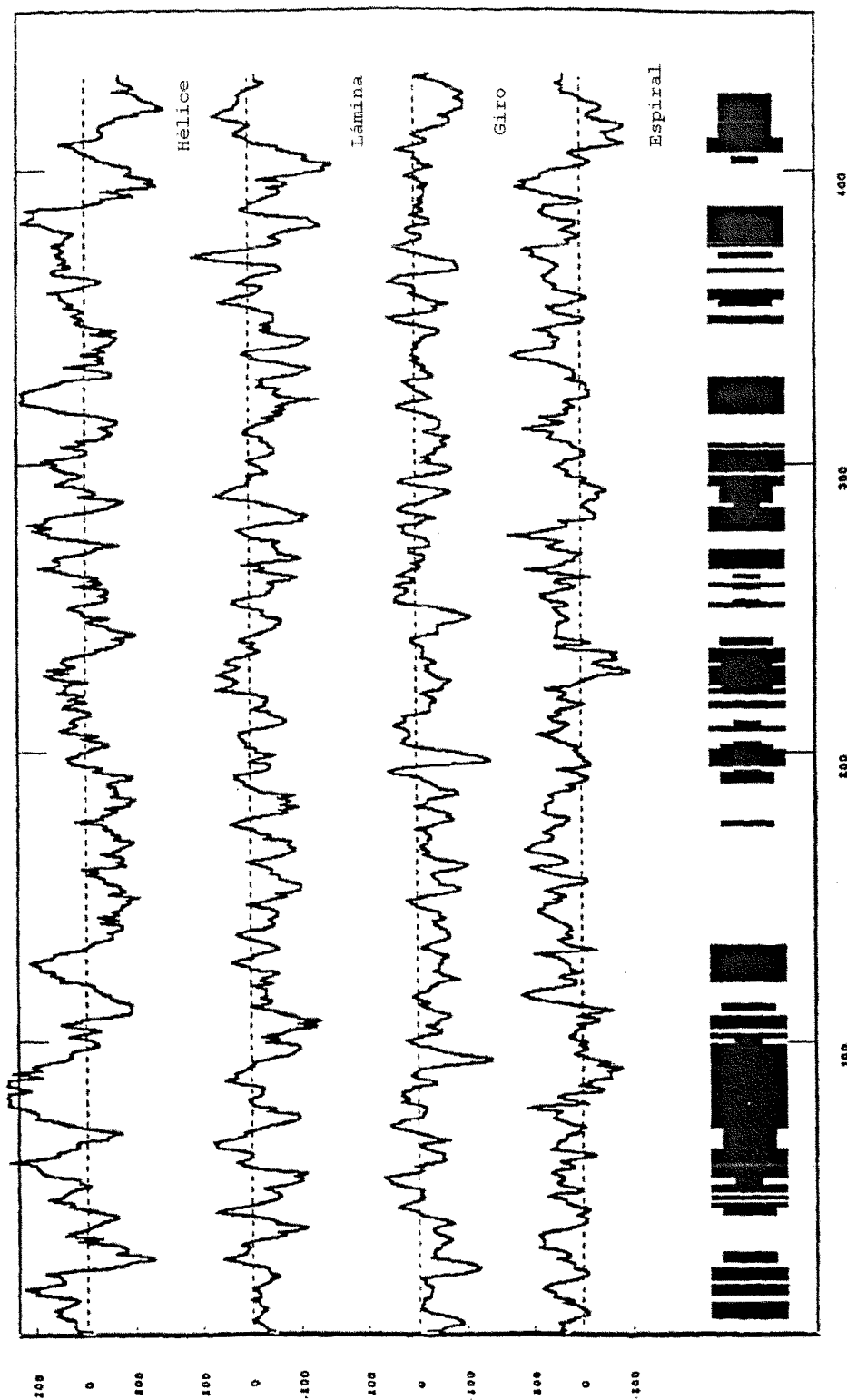


Figura 7

ES 2 281 964 T3

V N K E Y S I S N K E N T H N G L R M S 60
 GTGAATAAAGPATATAGTATCAGTAACAAAGAGAATACTCACAATGGCCTGAGGATGTCA
 I Y P K S T G N K G F E D G D D A I S K 120
 ATTTATCCTAAGTCAACTGGGAATAAAGGGTTTGAGGATGGAGATGATGCTATCAGCAAA
 L H D Q E E Y G A A L I R N N M Q H I M 180
 CTACATGACCAAGAAGAATATGGCGCAGCTCTCATCAGAAATAACATGCAACATATAATG
 G P V T A I K L L G E E N K E N T P R N 240
 GGGCCAGTGACTGCGATTAACTCCTGGGGGAAGAAAACAAAGAGAACACACCTAGGAAT
 V L N I I P A S M N Y A K A H S K D K K 300
 GTTCTAAACATAATCCCAGCAAGTATGAATTATGCTAAAGCACACTCGAAGGATAAAAAG
 K P Q R D S Q A Q K S P V K S K S T H R 360
 AAGCCTCAAAGAGATTCCCAAGCCCAGAAAAGTCCAGTAAAAAGCAAAGCACCCATCGT
 I Q H N I D Y L K H L S K V K K I P S D 420
 ATTCAACACAACATTGACTACCTAAACATCTCTCAAAAGTCAAAAAATCCCCAGTGAT
 F E G S G Y T D L Q E R G D N D I S P F 480
 TTTGAAGGCAGCGTTATACAGATCTTCAAGAGAGAGGGGACAATGATATATCTCCTTTC
 S G D G Q P F K D I P G K G E A T G P D 540
 AGTGGGGACGGCCAACTTTTAAGGACATTCTGGTAAAGGAGAAGCTACTGGTCCTGAC
 L E G K D I Q T G F A G P S E A E S T H 600
 CTAGAAGGCAAAGATATTCAAACAGGGTTTGCAGGCCCAAGTGAAGCTGAGAGTACTCAT
 L D T K K P G Y N E I P E R E E N G G N 660
 CTTGACACAAAAAGCCAGGTTATAATGAGATCCCAGAGAGAGAAGAAAATGGTGGAAAT
 T I G T R D E T A K E A D A V D V S L V 720
 ACCATTGGAAGTAGGGATGAAACTGCCAAGAGGCAGATGCTGTTGATGTCAGCCTTGTA
 E G S N D I M G S T N F K E L P G R E G 780
 GAGGGCAGCAACGATATCATGGGTAGTACCAATTTTAAGGAGCTCCCTGGAAGAGAAGGA
 N R V D A G S Q N A H Q G K V E F H Y P 840
 AACAGAGTGATGCTGGCAGCCAAAATGCTCACCAAGGAAGGTTGAGTTTCATTACCCT
 P A P S K E K R K E G S S D A A E S T N 900
 CCTGCACCCTCAAAGAGAAAAGAAAAGAGGCAGTAGTGATGCAGCTGAAAGTACCAAC
 Y N E I P K N G K G S T R K G V D H S N 960
 TATAATGAAATTCCTAAAAATGGCAAAGGCAGTACCAGAAAAGGTGTAGATCATTCTAAT
 R N Q A T L N E K Q R F P S K G K S Q G 1020
 AGGAACCAAGCAACCTTAAATGAAAAACAAAGGTTTCTAGTAAGGGCAAAGTCAGGGC
 L P I P S R G L D N E I K N E M D S F N 1080
 CTGCCCATTCTTCTCGTGGTCTTGATAATGAATCAAAAACGAAATGGATTCTTTAAT
 G P S H E N I I T H G R K Y H Y V P H R 1140
 GGCCCCAGTCATGAGAATATAATAACACATGGCAG AAATATCATTATGTACCCACAGA

Figura 8

Q N N S T R N K G M P Q G K G S W G R Q	
CAAAATAATTCTACACGGAATAAGGGTATGCCACAAGCGAAAGGCTCCTGGGGTAGACAA	1200
P H S N R R F S S R R R D D S S E S S D	
CCCCATTCCAACAGGAGGTTTAGTTCCCGTAGAAGGGATGACAGTAGTGAGTCATCTGAC	1260
S G S S S E S D G D *	
AGTGGCAGTCAAGTGAGAGCGATGGTGACTAGTCCACCAGGAGTCCCAGCGGGGTGAC	1320
AGTCTGAAGACCTCGTCACCTGTGAGTTGATGTAGAGGAGAGCCACCTGACAGCTGACCA	1380
GGTGAAGAGAGGATAGAGTGAAGAACTGAGTGAGCCAAGAATCCTGGTCTCCTTGGGGGA	1440
ATTTTGTCTATCTTAATAGTCACAGTATAAAATTCTATTAAAGGCTATAATGTTTTTAAG	1500
CAAAAAAAAAATCATTACAGATCTATGAAATAGGTAACATTTGAGTAGGTGTCATTTAAAA	1560
ATAGTTGGTGAATGTCACAAATGCCTTCTATGTTGTTGCTCTGTAGACATGAAATAAA	1620
CAATATCTCTCGATGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1655

Figura 8 (continuación)

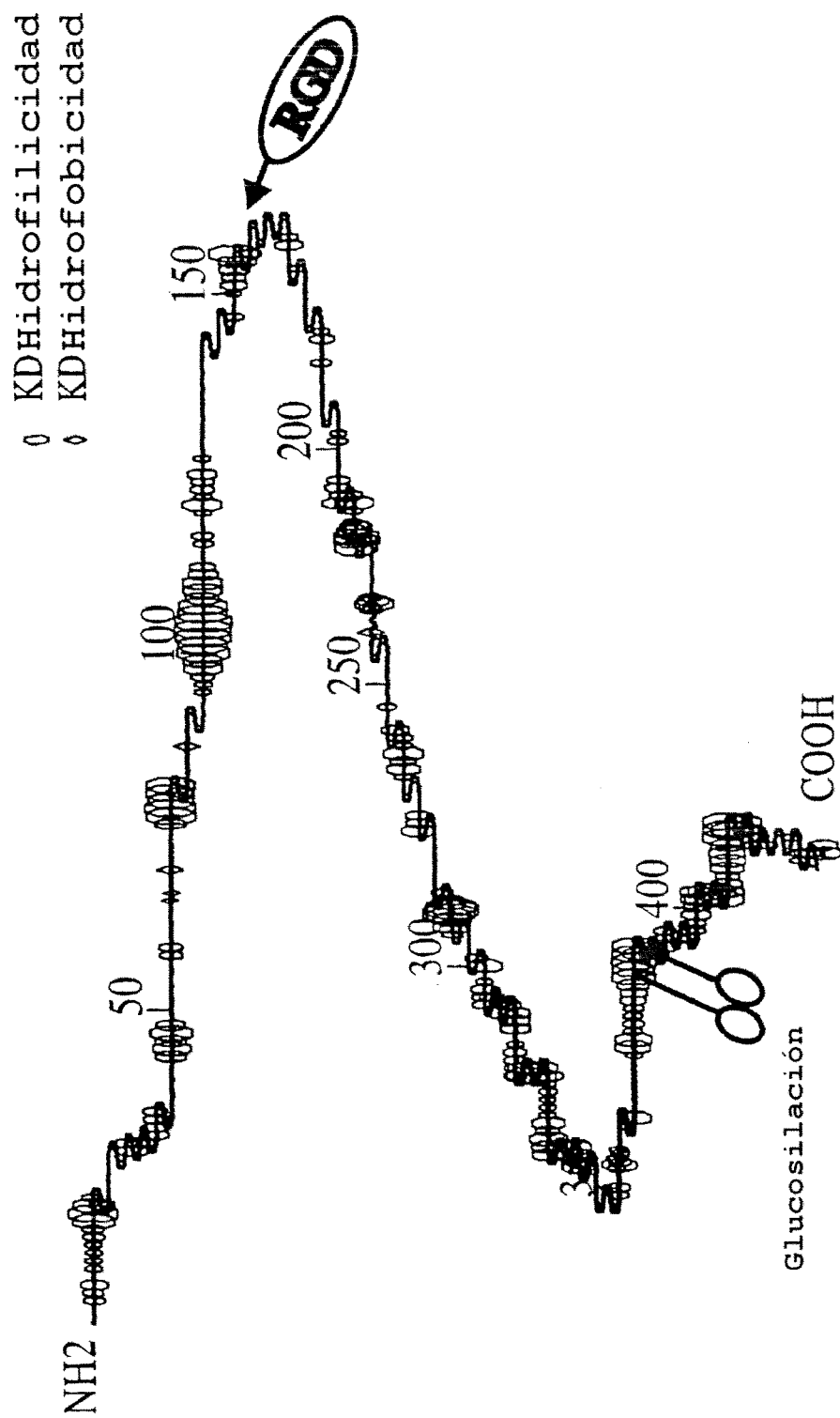


Figura 9

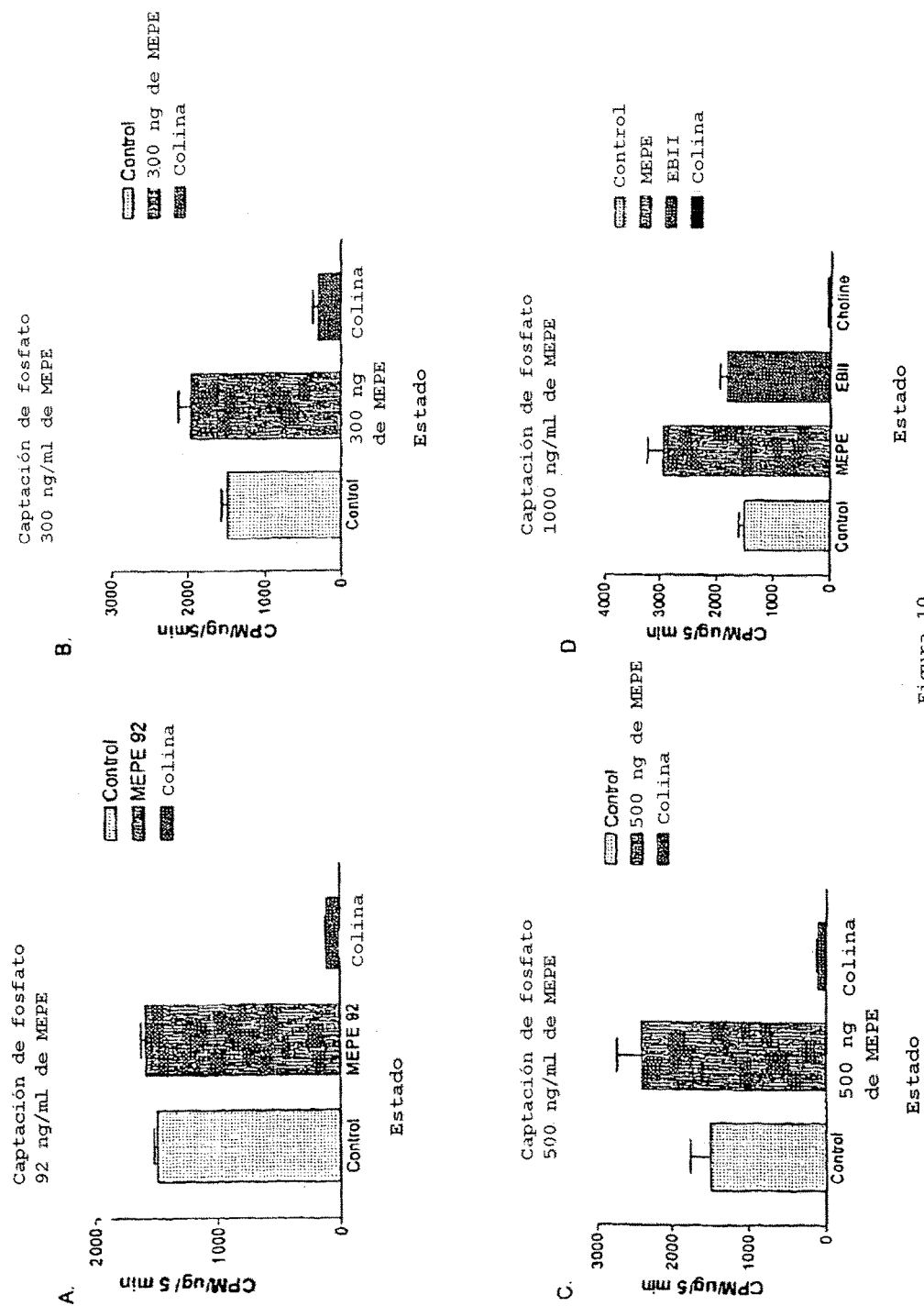


Figura 10

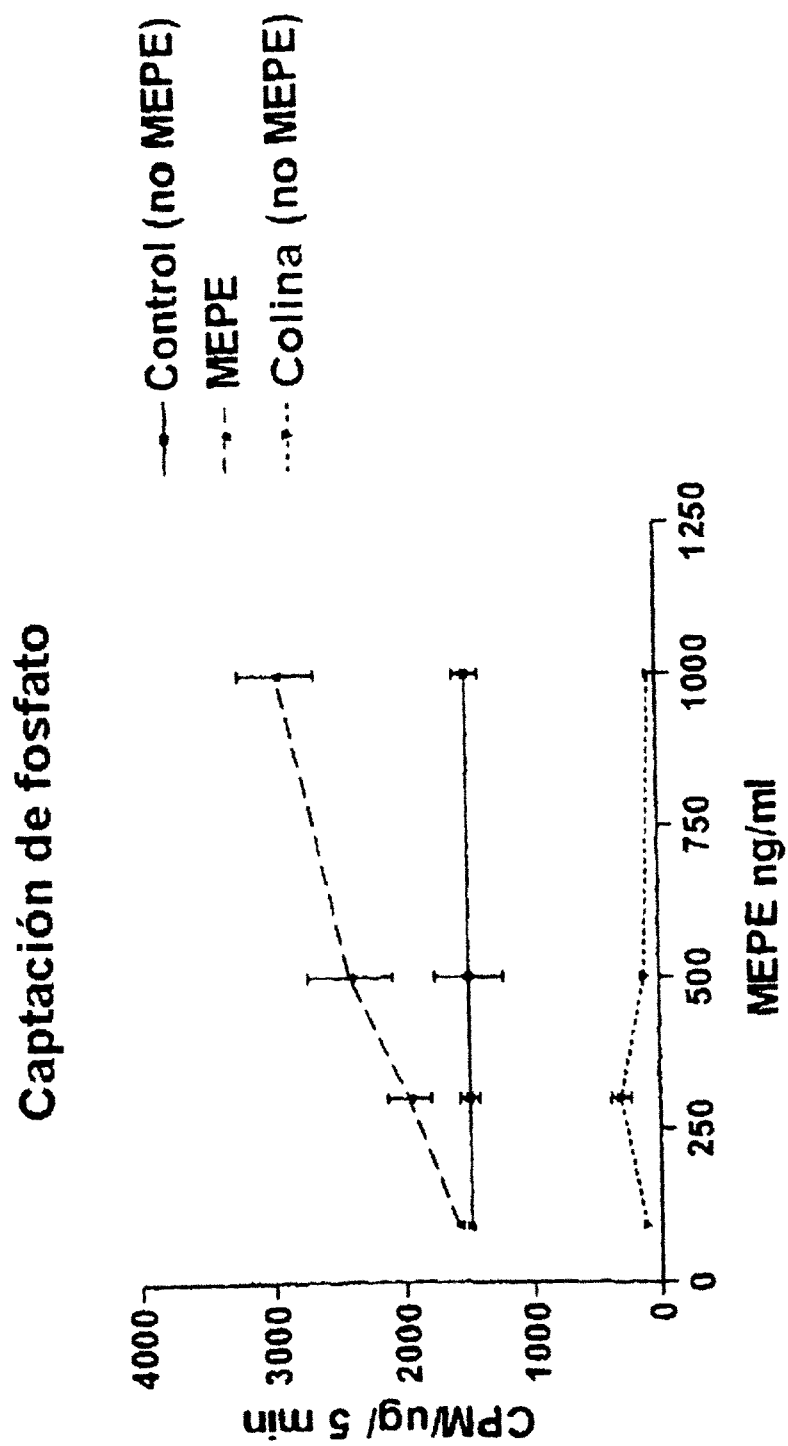


Figura 11

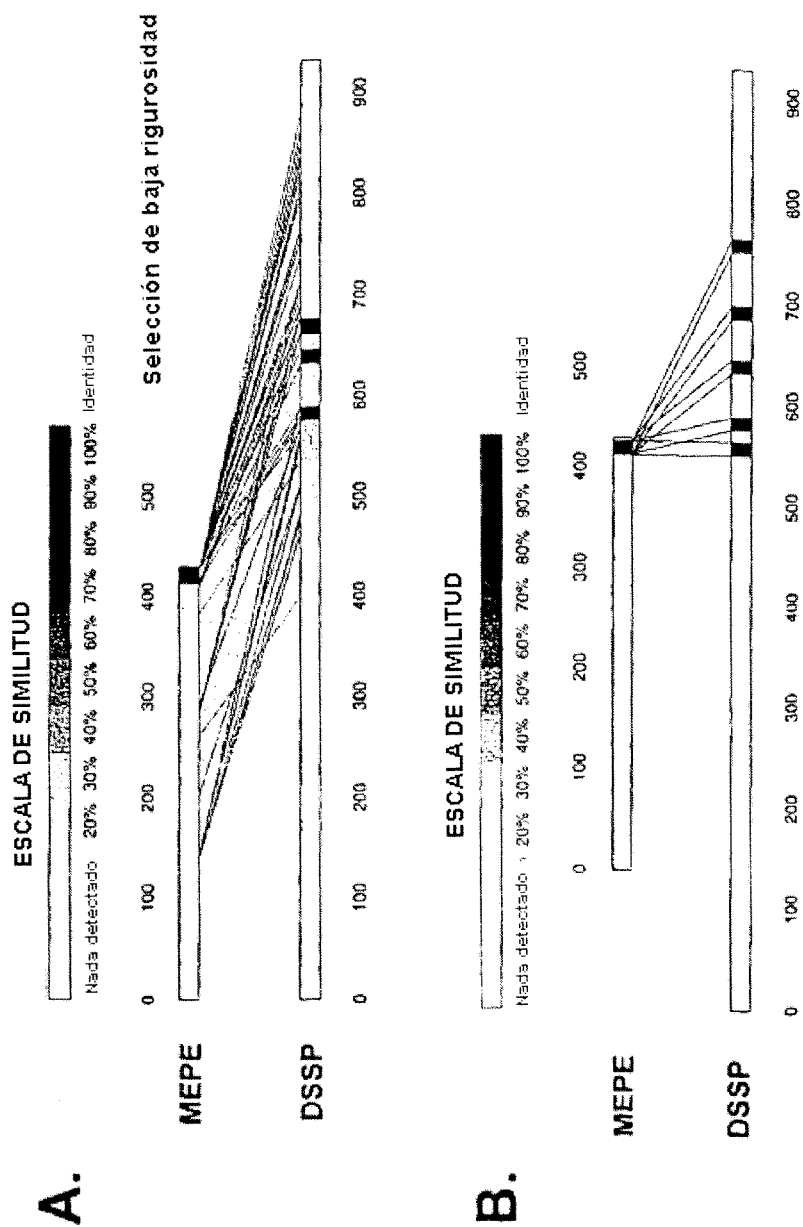


Figura 12

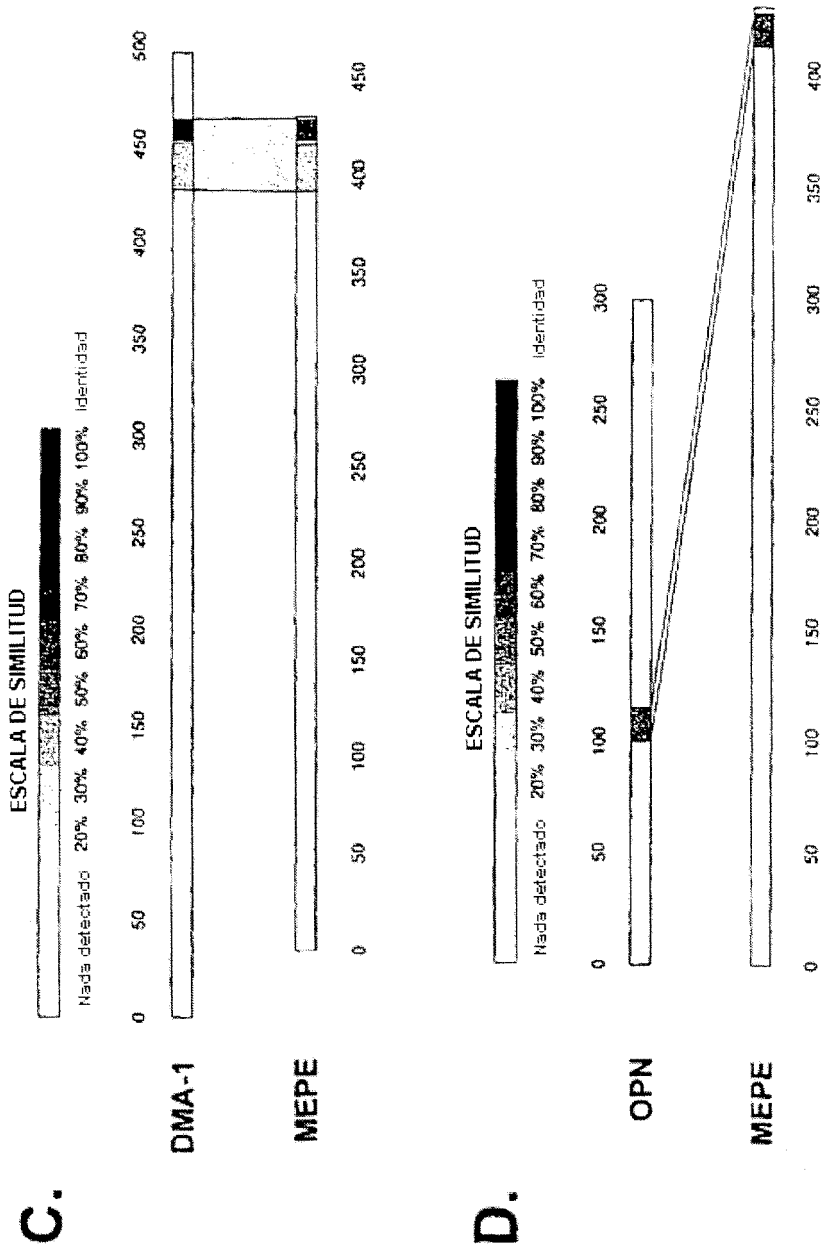
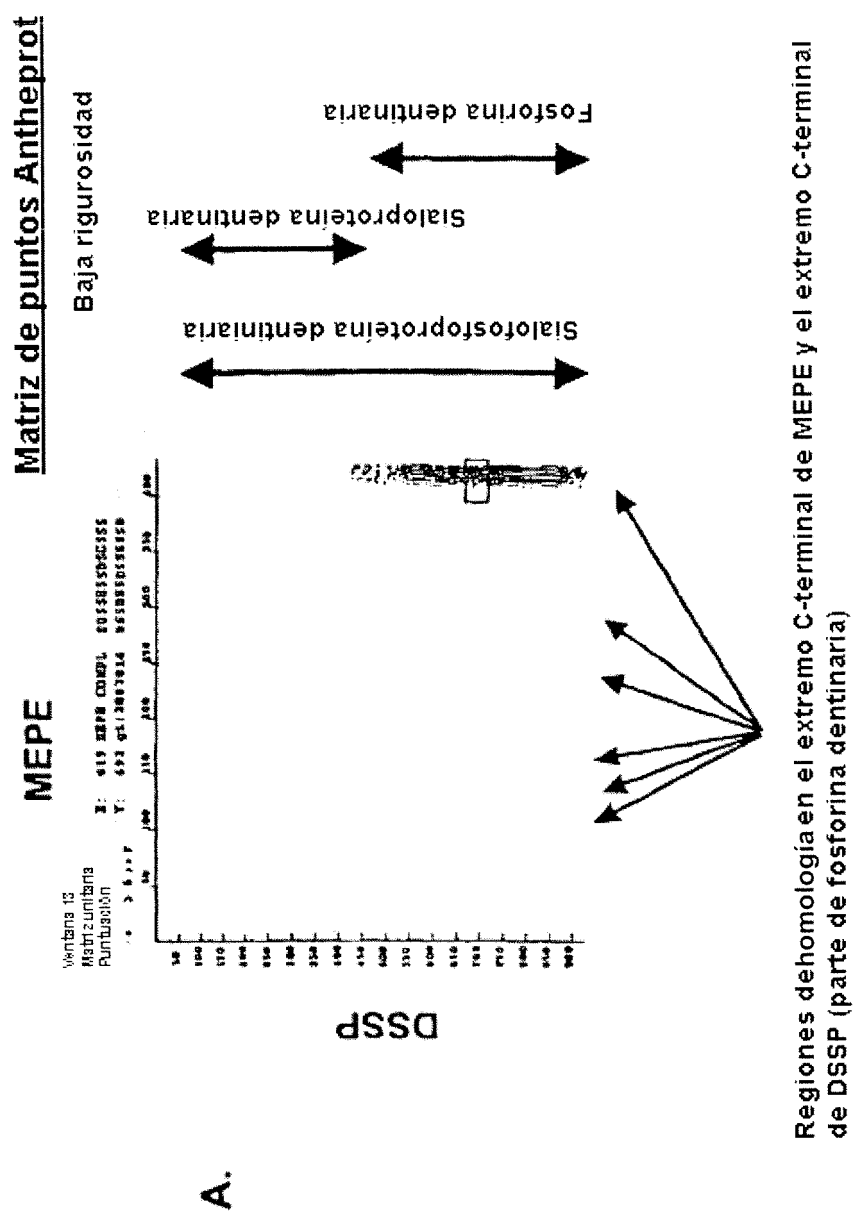


Figura 12 (continuación)



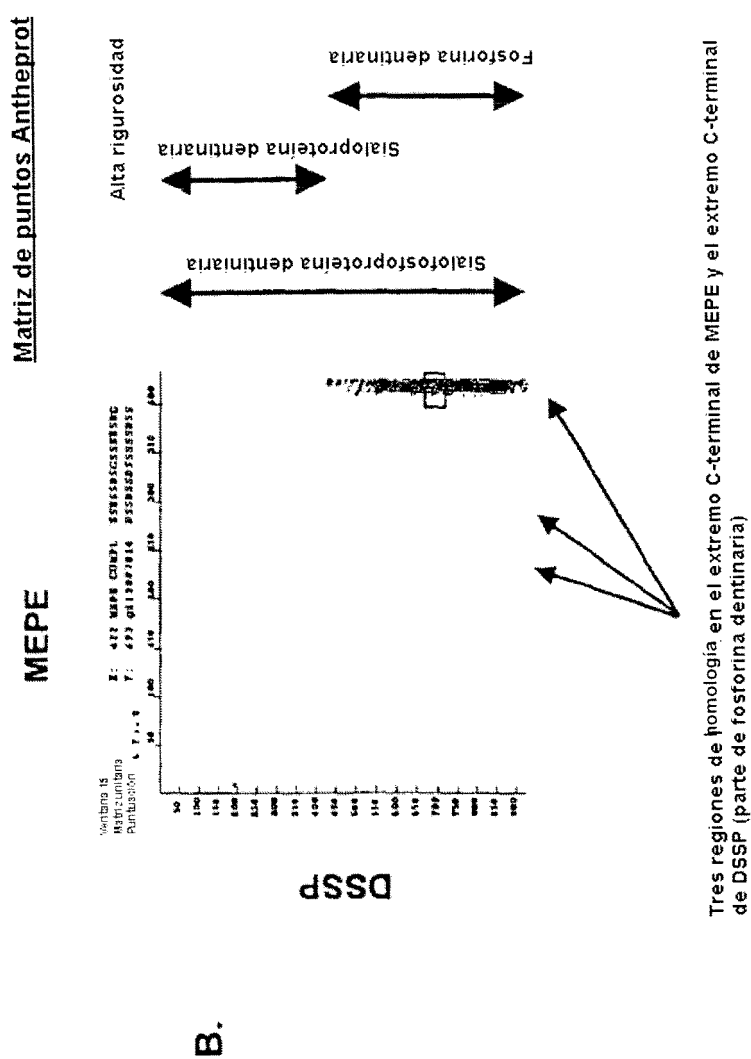


Figura 13 (continuación)

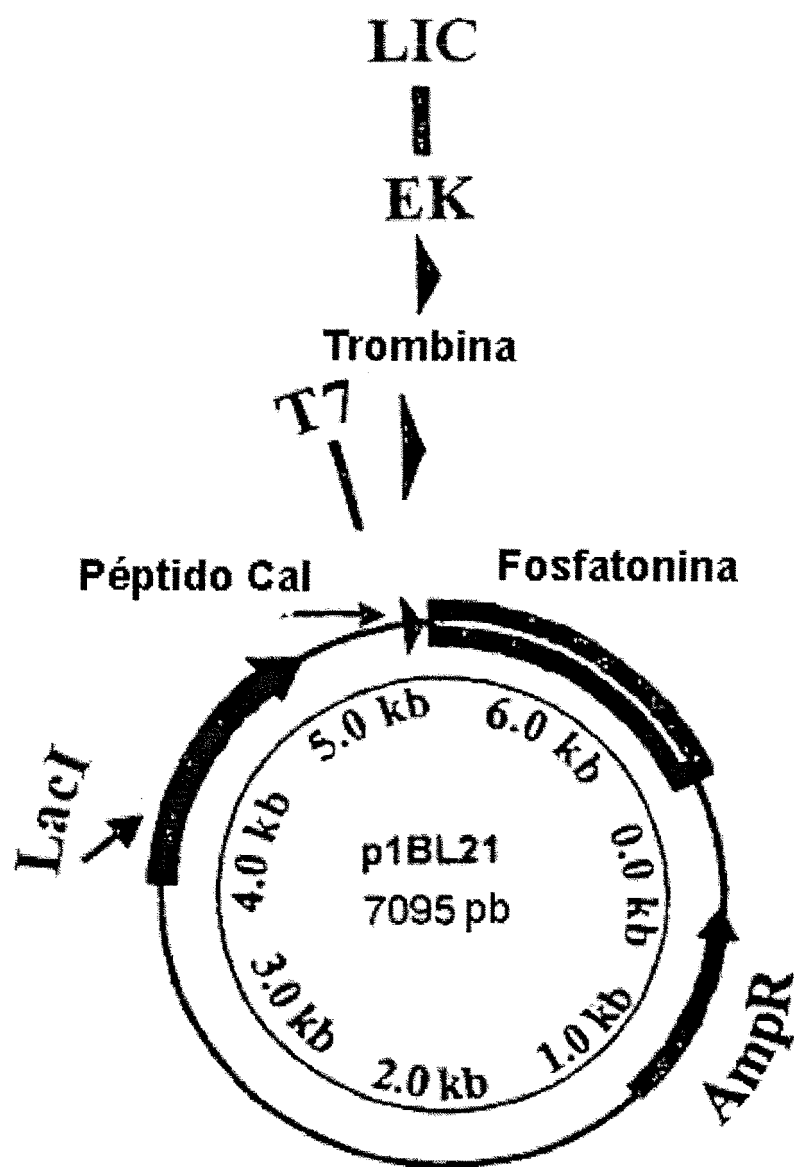


Figura 14

ES 2 281 964 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Colegio Universitario de Londres
- (B) CALLE: Rowland Hill Street
- (C) CIUDAD: Londres
- (D) ESTADO: ninguno
- (E) PAÍS: Reino Unido
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): NW3 2PF

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Hormona polipeptídica novedosa, fosfatonina

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 25

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1655 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 1...1290

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

30	GTG AAT AAA GAA TAT ACT ATC ACT AAC AAA GAG AAT ACT CAC AAT GGC	48
	Val Asn Lys Glu Tyr Ser Ile Ser Asn Lys Glu Asn Thr His Asn Gly	
	1 5 10 15	
50	CTG AGG ATG TCA ATT TAT CCT AAG TCA ACT GGG AAT AAA GGG TTT GAG	96
	Leu Arg Met Ser Ile Tyr Pro Lys Ser Thr Gly Asn Lys Gly Phe Glu	
	20 25 30	
55	GAT GGA GAT GAT GCT ATC AGC AAA CTA CAC GAC CAA GAA GAA TAT GGC	144
	Asp Gly Asp Asp Ala Ile Ser Lys Leu His Asp Gln Glu Glu Tyr Gly	
	35 40 45	
60	GCA GCT CTC ATC AGA AAT AAC ATG CAA CAT ATA ATG GGG CCA GTG ACT	192
	Ala Ala Leu Ile Arg Asn Asn Met Gln His Ile Met Gly Pro Val Thr	
	50 55 60	
65	GCG ATT AAA CTC CTC GGG GAA GAA AAC AAA GAG AAC ACA CCT AGG AAT	240
	Ala Ile Lys Leu Leu Gly Glu Glu Asn Lys Glu Asn Thr Pro Arg Asn	
	65 70 75 80	

ES 2 281 964 T3

5	GTT CTA AAC ATA ATC CCA GCA AGT ATG AAT TAT GCT AAA GCA CAC TCG Val Leu Asn Ile Ile Pro Ala Ser Met Asn Tyr Ala Lys Ala His Ser 85 90 95	288
10	AAG GAT AAA AAG AAG CCT CAA AGA GAT TCC CAA GCC CAG AAA AGT CCA Lys Asp Lys Lys Lys Pro Gln Arg Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro 100 105 110	336
15	GTA AAA AGC AAA AGC ACC CAT CGT ATT CAA CAC AAC ATT GAC TAC CTA Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu 115 120 125	384
20	AAA CAT CTC TCA AAA GTC AAA AAA ATC CCC AGT GAT TTT GAA GGC AGC Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser 130 135 140	432
25	GGT TAT ACA GAT CTT CAA GAG AGA GGG GAC AAT GAT ATA TCT CCT TTC Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe 145 150 155 160	480
30	AGT GGC GAC GGC CAA CCT TTT AAG GAC ATT CCT GGT AAA GGA GAA GCT Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala 165 170 175	528
35	ACT GGT CCT GAC CTA GAA GGC AAA GAT ATT CAA ACA GGG TTT GCA GGC Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly 180 185 190	576
40	CCA AGT GAA GCT GAG AGT ACT CAT CTT GAC ACA AAA AAG CCA GGT TAT Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu Asp Thr Lys Lys Pro Gly Tyr 195 200 205	624
45	AAT GAG ATC CCA GAG AGA GAA GAA AAT GGT GGA AAT ACC ATT GGA ACT Asn Glu Ile Pro Glu Arg Glu Glu Asn Gly Gly Asn Thr Ile Gly Thr 210 215 220	672
50	AGG GAT GAA ACT GCG AAA GAG GCA GAT GCT GTT GAT GTC AGC CTT GTA Arg Asp Glu Thr Ala Lys Glu Ala Asp Ala Val Asp Val Ser Leu Val 225 230 235 240	720
55	GAG GGC ACC AAC GAT ATC ATG GGT AGT ACC AAT TTT AAG GAG CTC CCT Glu Gly Ser Asn Asp Ile Met Gly Ser Thr Asn Phe Lys Glu Leu Pro 245 250 255	768
60	GGA AGA GAA GGA AAC AGA GTG GAT GCT GGC AGC CAA AAT GCT CAC CAA Gly Arg Glu Gly Asn Arg Val Asp Ala Gly Ser Gln Asn Ala His Gln 260 265 270	816
65	GGG AAG GTT GAG TTT CAT TAC CCT CCT GCA CCC TCA AAA GAG AAA AGA Gly Lys Val Glu Phe His Tyr Pro Pro Ala Pro Ser Lys Glu Lys Arg 275 280 285	864
70	AAA GAA GGC AGT AGT GAT GCA GCT GAA AGT ACC AAC TAT AAT GAA ATT Lys Glu Gly Ser Ser Asp Ala Ala Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Ile 290 295 300	912
75	CCT AAA AAT GGC AAA GGC AGT ACC AGA AAG GGT GTA GAT CAT TCT AAT Pro Lys Asn Gly Lys Gly Ser Thr Arg Lys Gly Val Asp His Ser Asn 305 310 315 320	960

ES 2 281 964 T3

5	AGG AAC CAA GCA ACC TTA AAT GAA AAA CAA AGG TTT CCT AGT AAG GGC Arg Asn Gln Ala Thr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Phe Pro Ser Lys Gly 325 330 335	1008
10	AAA AGT CAG GGC CTG CCC ATT CCT TCT CGT GGT CTT GAT AAT GAA ATC Lys Ser Gln Gly Leu Pro Ile Pro Ser Arg Gly Leu Asp Asn Glu Ile 340 345 350	1056
15	AAA AAC GAA ATG GAT TCC TTT AAT GGC CCC AGT CAT GAG AAT ATA ATA Lys Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile 355 360 365	1104
20	ACA CAT GGC AGA AAA TAT CAT TAT GTA CCC CAC AGA CAA AAT AAT TCT Thr His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser 370 375 380	1152
25	ACA CGG AAT AAG GGT ATG CCA CAA GGG AAA GGC TCC TGG GGT AGA CAA Thr Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln 385 390 395 400	1200
30	CCC CAT TCC AAC AGG AGG TTT AGT TCC CGT AGA AGG GAT GAC AGT AGT Pro His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser 405 410 415	1248
35	GAG TCA TCT GAC AGT GGC AGT TCA AGT GAG AGC GAT GGT GAC Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp 420 425 430	1290
40	TAGTCCACCA GGAGTCCCA GCGGGGTGAC AGTCTGAAGA CCTCGTCACC TGTGAGTTGA TGATAGGAGAG AGCCACCTGA CAGCTGACCA GGTGAAGAGA GGATAGAGTG AAGAACTGAG TGAGCCAAGA ATCCTGGTCT CTTGGGGGA ATTTTGTCTA TCTTAATACT CACAGTATAA AATTCTATTA AAGGCTATAA TSTTTTAAAG CAAAAAATAA TCATTACAGA TCTATGAAAT AGGTAACATT TGAGTAGGTG TCATTTAAAA ATAGTTGGTG AATGTCACAA ATGCCTTCTA TGTTGTTTGC TCTGTAGACA TAAAAATAAA CAATATCTCT CGATGATAAA AAAAAAATAA AAAAA	1350 1410 1470 1530 1590 1650 1655

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 430 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Val	Asn	Lys	Glu	Tyr	Ser	Ile	Ser	Asn	Lys	Glu	Asn	Thr	His	Asn	Gly
1				5					10					15	
Leu	Arg	Met	Ser	Ile	Tyr	Pro	Lys	Ser	Thr	Gly	Asn	Lys	Gly	Phe	Glu
			20					25					30		

ES 2 281 964 T3

	Asp	Gly	Asp	Asp	Ala	Ile	Ser	Lys	Leu	His	Asp	Gln	Glu	Glu	Tyr	Gly	
			35					40					45				
5	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asn	Asn	Met	Gln	His	Ile	Met	Gly	Pro	Val	Thr	
		50					55					60					
10	Ala	Ile	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Lys	Glu	Asn	Thr	Pro	Arg	Asn	
	65					70					75					80	
	Val	Leu	Asn	Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	Met	Asn	Tyr	Ala	Lys	Ala	His	Ser	
					85					90					95		
15	Lys	Asp	Lys	Lys	Lys	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Gln	Ala	Gln	Lys	Ser	Pro	
					100				105					110			
20	Val	Lys	Ser	Lys	Ser	Thr	His	Arg	Ile	Gln	His	Asn	Ile	Asp	Tyr	Leu	
			115					120					125				
	Lys	His	Leu	Ser	Lys	Val	Lys	Lys	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Glu	Gly	Ser	
		130						135				140					
25	Gly	Tyr	Thr	Asp	Leu	Gln	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asp	Ile	Ser	Pro	Phe	
	145					150					155					160	
30	Ser	Gly	Asp	Gly	Gln	Pro	Phe	Lys	Asp	Ile	Pro	Gly	Lys	Gly	Glu	Ala	
					165					170					175		
	Thr	Gly	Pro	Asp	Leu	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile	Gln	Thr	Gly	Phe	Ala	Gly	
				180					185					190			
35	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ser	Thr	His	Leu	Asp	Thr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	
			195					200					205				
40	Asn	Glu	Ile	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Gly	Asn	Thr	Ile	Gly	Thr	
		210					215					220					
	Arg	Asp	Glu	Thr	Ala	Lys	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Val	
	225					230					235					240	
45	Glu	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Met	Gly	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Pro	
					245					250					255		
	Gly	Arg	Glu	Gly	Asn	Arg	Val	Asp	Ala	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	His	Gln	
					260				265					270			
50	Gly	Lys	Val	Glu	Phe	His	Tyr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Lys	Glu	Lys	Arg	
			275					280					285				
55	Lys	Glu	Gly	Ser	Ser	Asp	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ile	
		290					295					300					
	Pro	Lys	Asn	Gly	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Lys	Gly	Val	Asp	His	Ser	Asn	
	305					310					315					320	
60	Arg	Asn	Gln	Ala	Thr	Leu	Asn	Glu	Lys	Gln	Arg	Phe	Pro	Ser	Lys	Gly	
					325					330					335		
65	Lys	Ser	Gln	Gly	Leu	Pro	Ile	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	
				340					345					350			

ES 2 281 964 T3

5 Lys Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile
 355 360 365

 10 Thr His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser
 370 375 380

 15 Thr Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln
 385 390 395 400

 20 Pro His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser
 405 410 415

 Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp
 420 425 430

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 4 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 35 (iii) HIPOTÉTICO: SÍ
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

 40 Ser Gly Asp Gly
 1

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICO: SÍ
 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

 Ala Asp Ala Val Asp Val Ser
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 22 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

ES 2 281 964 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser
1 5 10 15
Ser Ser Glu Ser Asp Gly
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr Glu Ser Lys Ser Ser
1 5 10 15
Ser Glu Glu Asp Gly
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "oligonucleótido"

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

ES 2 281 964 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

GACGACGACA AGGTGAATAA AGAATATAGT ATCAGTAA

38

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "oligonucleótido"

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

GGAACAAGAC CCGTCTAGTC ACCATCGCTC TCACT

35

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

Asp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Ser
1				5					10					15

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

60

Asp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Ser	Asp
1				5					10					15	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

ES 2 281 964 T3

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Ser	Glu	Ser	Asp	Gly										
			20												

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser
1				5					10				

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

50

Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser
1				5				10					15	

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

ES 2 281 964 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser Ser Ser Asp Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Set His His Ser Asp Glu Ser Asp
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

ES 2 281 964 T3

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICO: SÍ
10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:
Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp
1 5 10

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- 20 (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICO: SÍ
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:
30 Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 21:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 40 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
45 (iii) HIPOTÉTICO: SÍ
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:
Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
50 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 22:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
65 (iii) HIPOTÉTICO: SÍ

ES 2 281 964 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr Glu Ser Lys Ser Ser
1 5 10 15
Ser Glu Glu Asp Gly
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "oligonucleótido"

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

GGTTATACAG ATCTTCAAGA GAGAG

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "oligonucleótido"

(iii) HIPOTÉTICO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

GTTGGTACTT TCAGCTGCAT CACT

24

ES 2 281 964 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Colegio Universitario de Londres

<120> Hormona polipeptídica novedosa, fosfatonina

<130> D1583PCT

<140> documento PCT/EP99/03403

<141> 18-05-1999

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1655

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1290)

<400> 1

```

gtg aat aaa gaa tat agt atc agt aac aaa gag aat act cac aat ggc 48
Val Asn Lys Glu Tyr Ser Ile Ser Asn Lys Glu Asn Thr His Asn Gly
1      5      10      15
ctg agg atg tca att tat cct aag tca act ggg aat aaa ggg ttt gag 96
Leu Arg Met Ser Ile Tyr Pro Lys Ser Thr Gly Asn Lys Gly Phe Glu
20     25     30
gat gga gat gat gct atc agc aaa cta cat gac caa gaa gaa tat ggc 144
Asp Gly Asp Asp Ala Ile Ser Lys Leu His Asp Gln Glu Glu Tyr Gly
35     40     45
gca gct ctc atc aga aat aac atg caa cat ata atg ggg cca gtg act 192
Ala Ala Leu Ile Arg Asn Asn Met Gln His Ile Met Gly Pro Val Thr
50     55     60
gcg att aaa ctc ctg ggg gaa gaa aac aaa gag aac aca cct agg aat 240
Ala Ile Lys Leu Leu Gly Glu Glu Asn Lys Glu Asn Thr Pro Arg Asn
65     70     75     80
gtt cta aac ata atc cca gca agt atg aat tat gct aaa gca cac tcg 288
Val Leu Asn Ile Ile Pro Ala Ser Met Asn Tyr Ala Lys Ala His Ser
85     90     95
aag gat aaa aag aag cct caa aca gat tcc caa gcc cag aaa agt cca 336
Lys Asp Lys Lys Lys Pro Gln Arg Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro
100    105    110
gta aaa agc aaa agc acc cat cgt att caa cac aac att gac tac cta 384
Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu
115    120    125
aaa cat ctc tca aaa gtc aaa aaa atc ccc agt gat ttt gaa ggc agc 432
Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser
130    135    140
ggg tat aca gat ctt caa gag aga ggg gac aat gat ata tct cct ttc 480
Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe

```

ES 2 281 964 T3

	145		150		155		160	
5	agt ggg gac ggc caa cct ttt aag gac att cct ggt aaa gga gaa gct	528						
	Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala							
		165			170		175	
10	act ggt cct gac cta gaa ggc aaa gat att caa aca ggg ttt gca ggc	576						
	Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly							
		180			185		190	
15	cca agt gaa gct gag agt act cat ctt gac aca aaa aag cca ggt tat	624						
	Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu Asp Thr Lys Lys Pro Gly Tyr							
		195			200		205	
20	aat gag atc cca gag aga gaa gaa aat ggt gga aat acc att gga act	672						
	Asn Glu Ile Pro Glu Arg Glu Glu Asn Gly Gly Asn Thr Ile Gly Thr							
		210			215		220	
25	agg gat gaa act gcg aaa gag gca gat gct gtt gat gtc agc ctt gta	720						
	Arg Asp Glu Thr Ala Lys Glu Ala Asp Ala Val Asp Val Ser Leu Val							
		225			230		235	
30	gag ggc agc aac gat atc atg ggt agt acc aat ttt aag gag ctc cct	768						
	Glu Gly Ser Asn Asp Ile Met Gly Ser Thr Asn Phe Lys Glu Leu Pro							
		245			250		255	
35	gga aga gaa gga aac aga gtg gat gct ggc agc caa aat gct cac caa	816						
	Gly Arg Glu Gly Asn Arg Val Asp Ala Gly Ser Gln Asn Ala His Gln							
		260			265		270	
40	ggg aag gtt gag ttt cat tac cct cct gca ccc tca aaa gag aaa aga	864						
	Gly Lys Val Glu Phe His Tyr Pro Pro Ala Pro Ser Lys Glu Lys Arg							
		275			280		285	
45	aaa gaa ggc agt agt gat gca gct gaa agt acc aac tat aat gaa att	912						
	Lys Glu Gly Ser Ser Asp Ala Ala Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Ile							
		290			295		300	
50	cct aaa aat ggc aaa ggc agt acc aga aag ggt gta gat cat tct aat	960						
	Pro Lys Asn Gly Lys Gly Ser Thr Arg Lys Gly Val Asp His Ser Asn							
		305			310		315	
55	agg aac caa gca acc tta aat gaa aaa caa agg ttt cct agt aag ggc	1008						
	Arg Asn Gln Ala Thr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Phe Pro Ser Lys Gly							
		325			330		335	
60	aaa agt cag ggc ctg ccc att cct tct cgt ggt ctt gat aat gaa atc	1056						
	Lys Ser Gln Gly Leu Pro Ile Pro Ser Arg Gly Leu Asp Asn Glu Ile							
		340			345		350	
65	aaa aac gaa atg gat tcc ttt aat ggc ccc agt cat gag aat ata ata	1104						
	Lys Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile							
		355			360		365	
70	aca cat ggc aga aaa tat cat tat gta ccc cac aga caa aat aat tct	1152						
	Thr His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser							
		370			375		380	
75	aca cgg aat aag ggt atg cca caa ggg aaa ggc tcc tgg ggt aga caa	1200						
	Thr Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln							
		385			390		395	
80	ccc cat tcc aac agg agg ttt agt tcc cgt aga agg gat gac agt agt	1248						

ES 2 281 964 T3

Pro His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser
405 410 415

gag tca tct gac agt ggc agt tca agt gag agc gat ggt gac 1290
Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp
420 425 430

tagtccacca ggagttacca ggggggtgac agtctgaaga cctcgtcacc tgtgagttga 1350

tgtagaggag agccacctga cagctgacca ggtgaagaga ggatagagtg aagaactgag 1410

tgagccaaga atcctggtct ccttggggga atttttgcta tcttaatagt cacagtataa 1470

aattctatta aaggctataa tgtttttaag caaaaaaaaaa tcattacaga tctatgaaat 1530

aggtaacatt tgagtaggtg tcatttaaaa atagttggtg aatgtcacaa atgccttcta 1590

tgttgtttgc tctgtagaca tgaaaataaa caatatctct cgatgataaa aaaaaaaaaa 1650

aaaaa 1655

<210> 2

<211> 430

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Val Asn Lys Glu Tyr Ser Ile Ser Asn Lys Glu Asn Thr His Asn Gly
1 5 10 15

Leu Arg Met Ser Ile Tyr Pro Lys Ser Thr Gly Asn Lys Gly Phe Glu
20 25 30

Asp Gly Asp Asp Ala Ile Ser Lys Leu His Asp Gln Glu Glu Tyr Gly
35 40 45

Ala Ala Leu Ile Arg Asn Asn Met Gln His Ile Met Gly Pro Val Thr
50 55 60

Ala Ile Lys Leu Leu Gly Glu Glu Asn Lys Glu Asn Thr Pro Arg Asn
65 70 75 80

Val Leu Asn Ile Ile Pro Ala Ser Met Asn Tyr Ala Lys Ala His Ser
85 90 95

Lys Asp Lys Lys Lys Pro Gln Arg Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro
100 105 110

Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu
115 120 125

Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe
145 150 155 160

Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala
165 170 175

Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly
180 185 190

ES 2 281 964 T3

5 Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu Asp Thr Lys Lys Pro Gly Tyr
 195 200 205
 Asn Glu Ile Pro Glu Arg Glu Glu Asn Gly Gly Asn Thr Ile Gly Thr
 210 215 220
 10 Arg Asp Glu Thr Ala Lys Glu Ala Asp Ala Val Asp Val Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Glu Gly Ser Asn Asp Ile Met Gly Ser Thr Asn Phe Lys Glu Leu Pro
 15 245 250 255
 Gly Arg Glu Gly Asn Arg Val Asp Ala Gly Ser Gln Asn Ala His Gln
 260 265 270
 20 Gly Lys Val Glu Phe His Tyr Pro Pro Ala Pro Ser Lys Glu Lys Arg
 275 280 285
 Lys Glu Gly Ser Ser Asp Ala Ala Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
 25 290 295 300
 Pro Lys Asn Gly Lys Gly Ser Thr Arg Lys Gly Val Asp His Ser Asn
 305 310 315 320
 30 Arg Asn Gln Ala Thr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Phe Pro Ser Lys Gly
 325 330 335
 Lys Ser Gln Gly Leu Pro Ile Pro Ser Arg Gly Leu Asp Asn Glu Ile
 35 340 345 350
 Lys Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile
 355 360 365
 40 Thr His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser
 370 375 380
 Thr Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln
 45 385 390 395 400
 Pro His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser
 405 410 415
 50 Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp
 420 425 430

55 <210> 3

<211> 4

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

65

ES 2 281 964 T3

<400> 3
 Ser Gly Asp Gly
 1
 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 <400> 4
 Ala Asp Ala Val Asp Val Ser
 20 1 5
 <210> 5
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 <400> 5
 35 Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Glu Ser Asp Gly
 20
 40
 <210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 50
 <400> 6
 Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr glu Ser Lys Ser Ser
 55 1 5 10 15
 Ser Glu Glu Asp Gly
 20
 60
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

ES 2 281 964 T3

<400> 7

Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser
1 5 10

5 <210> 8
<211> 38
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 8

20 gacgacgaca aggtgaataa agaatatagt atcagtaa 38

<210> 9
<211> 35
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 9

35 ggaacaagac ccgtctagtc accatcgctc tcaact 35

<210> 10
<211> 15
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 10

50 Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser
1 5 10 15

<210> 11
55 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 11

65 Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp
1 5 10 15

ES 2 281 964 T3

<210> 12
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 10
 <400> 12

 Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Glu Ser Asp Gly
 20

 <210> 13
 20 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 30 <400> 13

 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Ser Asp Ser
 1 5 10

 35 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 45 <400> 14

 Asp Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
 1 5 10 15
 50
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

 <400> 15

 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser Ser Asp Ser
 1 5 10
 65

 <210> 16

ES 2 281 964 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 10 <400> 16
 Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
 1 5 10
 15 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 25 <400> 17
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
 1 5 10
 30 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 40 <400> 18
 Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial
 <400> 19
 60 Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp
 1 5 10
 <210> 20
 65 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 281 964 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 20

10 Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp
1 5 10

<210> 21

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 21

25 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn
1 5 10

<210> 22

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 22

40 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn
1 5 10

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial

<400> 23

55 Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr Glu Ser Lys Ser Ser
1 5 10 15
60 Ser Glu Glu Asp Gly
20

<210> 24

65 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 281 964 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial	
5	<400> 24	
	ggttatacag atcttcaaga gagag	25
10	<210> 25	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia artificial	
20	<400> 25	
	gttggtactt tcagctgcat cact	24
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		