



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 255**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 16/28 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)	G01N 33/566 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)	A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01907652 .0**

96 Fecha de presentación : **19.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1248843**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Gen NPHS2 implicado en el síndrome nefrótico corticorresistente.**

30 Prioridad: **20.01.2000 FR 00 00709**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2010

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Antignac, Corinne y
Boute, Nicolas**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Gen NPHS2 implicado en el síndrome nefrótico corticorresistente.

5 En este documento se describe un nuevo gen, denominado NPHS2, que codifica una proteína implicada en el síndrome nefrótico corticorresistente.

10 El síndrome nefrótico idiopático es una patología que aparece principalmente en la infancia, y que se caracteriza por una proteinuria masiva, y cambios histológicos no específicos del riñón incluyendo a veces una glomeruloesclerosis segmentaria y focal (FSGS). Estas características están asociadas con una desaparición difusa de los pedicelos de los podocitos observado a microscopía electrónica (Broyer y *col.*, 1998), revelador de síndromes nefróticos cualquiera que sea su causa. La mayoría de los casos responden a una terapia a base de esteroides y tienen un buen pronóstico, pero aproximadamente el 20% son resistentes a los esteroides y evolucionan hacia la insuficiencia renal terminal, conduciendo a una glomeruloesclerosis completa. Se habla entonces de síndrome nefrótico corticorresistente.

15 La ultrafiltración de las macromoléculas del plasma durante la formación de la orina primaria en el glomérulo es una de las principales funciones del riñón humano. La pared capilar estructuralmente compleja responsable de esta función esta compuesta por una membrana basal cubierta por un endotelio fenestrado sobre su superficie interna y por células epiteliales especializadas (podocitos) que forman pedicelos sobre la superficie externa. Se observa en un gran número de enfermedades adquiridas o hereditarias una disfunción del filtro glomerular resultante de una pérdida excesiva de proteínas plasmáticas, lo cual conduce a un síndrome nefrótico, y después quizás a una insuficiencia renal terminal.

20 El estudio de enfermedades genéticas que afectan a la barrera de filtración proporciona modelos útiles para comprender la fisiopatología del proceso de filtración glomerular. Se han descrito algunas de estas afecciones hereditarias con proteinuria y síndrome nefrótico. La más grave es el síndrome nefrótico congénito de tipo finlandés (CNF), que es una enfermedad recesiva autosómica, con una proteinuria masiva en el útero, un síndrome nefrótico al nacer que conduce habitualmente a una insuficiencia renal terminal durante los dos primeros años de vida. El CNF está provocado por mutaciones en el gen NPHS1 (Kestilä, 1998). Por otro lado, se han descrito casos de proteinuria familiar o de síndrome nefrótico con lesiones histológicas de glomeruloesclerosis segmentaria y focal (FSGS) en pacientes más mayores, en particular adultos. Se han cartografiado dos locus genéticos para la FSGS dominante autosómica, respectivamente, sobre el locus 19q13 próximo al locus del gen NPHS1 (Mathis y *col.*, 1998) y sobre el locus 11q21-q22 (Winn y *col.*, 1999).

35 En 1995, una nueva entidad de síndrome nefrótico corticorresistente de transmisión autosómica recesiva se caracterizó de acuerdo con los siguientes criterios: comienzo precoz entre tres meses y cinco años, resistencia a una terapia a base de esteroides, evolución hacia la insuficiencia renal terminal antes de la edad de diez años, ausencia de recidiva después del trasplante renal y ausencia de cualquier desorden extra-renal. Histológicamente, sólo se observan modificaciones mínimas en las biopsias precoces aunque generalmente se presenta una FSGS en estadios posteriores. Un locus genético implicado en este síndrome nefrótico corticorresistente se ha cartografiado en la región 1q25-q31 entre los marcadores D1S452 y D1S466, extendiéndose esta región sobre aproximadamente 12 cM (Fuchshuber, 1995). Otro equipo (Lench y *col.*, 1998) ha confirmado esta localización y, más recientemente, también se ha demostrado una relación de esta región en una familia que presenta una FSGS que comienza en la edad adulta (Tsukaguchi y *col.*, 1999).

45 Los autores de la presente invención han conseguido ahora identificar de manera precisa un nuevo gen implicado en la entidad del síndrome nefrótico corticorresistente descrito anteriormente. En principio, este gen se ha denominado SRN1 y después se ha renombrado como NPHS2.

50 Adjunto a este documento se encuentra una lista de secuencias, en la cual la secuencia SEC ID nº 1 representa el fragmento de ADNc del gen NPHS2 en el ser humano correspondiente a la fase de lectura abierta (ORF). Este ORF contiene 1149 bases y codifica una proteína de 383 aminoácidos, denominada podocina, cuya secuencia se presenta la SEC ID nº 2.

55 Las secuencias SEC ID nº 3 a SEC ID nº 10 representan fragmentos del ADN genómico del gen NPHS2 humano que incluye respectivamente 8 exones (en negrita en el listado adjunto), como se indica a continuación:

SEC ID nº 3:

60 Hay 683 pares de bases delante de ATG. Los clones de ADNc obtenidos explorando un banco de ADNc de riñón fetal humano (banco Clontech clonado en el fago λ gt11) comienzan generalmente entre las bases 615 y 619. Hay 274 pares de bases de ATG en el sitio del corte y empalme (exón 1), después 147 pares de bases de secuencias intrónicas.

65 SEC ID nº 4:

Hay 151 pares de bases intrónicas, después 104 pares de bases de codificación (exón 2), después 123 pares de bases intrónicas.

ES 2 342 255 T3

SEC ID nº 5:

Hay 336 pares de bases intrónicas, después 73 pares de bases de codificación (exón 3), después 291 pares de bases intrónicas.

SEC ID nº 6:

Hay 187 pares de bases intrónicas, después 83 pares de bases de codificación (exón 4), después 90 pb intrónicas.

SEC ID nº 7:

Hay 250 pares de bases intrónicas, después 204 pares de bases de codificación (exón 5), después 195 pares de bases intrónicas.

SEC ID nº 8:

Hay 367 pares de bases intrónicas, después 56 pares de bases de codificación (exón 6), después 169 pares de bases intrónicas.

SEC ID nº 9:

Hay 327 pb intrónicas, después 79 pares de bases de codificación (exón 7), después 310 pares de bases intrónicas.

SEC ID nº 10:

Hay 285 pares de bases intrónicas, después 911 pares de bases de secuencia de ADNc hasta el sitio de poliadenilación utilizado (exón 8). El codón de terminación está en la posición 562, después 109 pares de bases de secuencias genómicas complementarias que incluyen los otros sitios de poliadenilación potenciales.

La secuencia SEC ID nº 11 abarca una parte del exón 5, los exones 6 y 7 y una gran parte del exón 8 (de la base 9792 del ADNc).

Las secuencias SEC ID nº 12 a nº 27 son cebadores utilizados para amplificar secuencias humanas.

La secuencia SEC ID nº 28 es la secuencia del ADNc de podocina de rata, siendo la secuencia SEC ID nº 29 la secuencia de aminoácidos correspondiente. La presente invención se refiere a un ácido nucleico como se define en las reivindicaciones 1, 4, 5, 6 y 9.

Por otro lado, se describe un ácido nucleico aislado, cuya secuencia se selecciona entre la SEC ID nº 3 a la SEC ID nº 10, o una secuencia homóloga, definida como

- i) una secuencia idéntica a al menos el 70% de la secuencia SEC ID nº 3 a la SEC ID nº 10; o
- ii) una secuencia que híbrida con la secuencia SEC ID nº 3 a la SEC ID nº 10 o sus secuencias complementarias, en condiciones de hibridación rigurosas.

La presente invención también tiene por objeto un ácido nucleico aislado, que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o 28, o una secuencia homóloga, definida como

- i) una secuencia idéntica a al menos el 70% de la secuencia SEC ID nº 1; o
- ii) una secuencia que híbrida con la secuencia SEC ID nº 1 o su secuencia complementaria, en condiciones de hibridación rigurosas, o
- iii) una secuencia que codifica el polipéptido, denominado podocina, como se define anteriormente.

Preferentemente, una secuencia de nucleótidos homóloga de acuerdo con la invención es idéntica a al menos el 75% de la secuencia SEC ID nº 1, más preferentemente a al menos el 85%, o a al menos el 90%.

De manera preferente, una secuencia de nucleótidos homóloga híbrida específicamente con secuencias complementarias de las secuencias SEC ID nº 1, 3 a 10, y 28 en condiciones rigurosas. Los parámetros que definen las condiciones de rigurosidad dependen de la temperatura a la cual se separan el 50% de las cadenas emparejadas (T_m).

Para las secuencias que comprenden más de 30 bases, T_m se define por la relación: $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentración de cationes}) - 0,63(\% \text{ de formamida}) - (600/\text{número de bases})$ (Sambrook y *col.*, 1989).

Para las secuencias de longitud inferior a 30 bases, T_m se define por la relación: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

ES 2 342 255 T3

En condiciones de rigurosidad apropiadas, en las que las secuencias específicas no hibridan, la temperatura de hibridación es de aproximadamente 5 a 30°C, preferentemente de 5 a 10°C inferior a la T_m, y los tampones de hibridación utilizados son preferentemente soluciones de fuerza iónica elevada, tal como, por ejemplo, una solución de SSC 6x.

Una secuencia de nucleótidos homóloga a la ORF representada en la SEC ID n° 1 ó 28 incluye cualquier secuencia de nucleótidos que difiere la SEC ID n° 1 ó 28 por mutación, inserción, delección o sustitución de una o más bases, o por la degeneración del código genético, siempre que codifique un polipéptido que presente la actividad biológica de la podocina, como se define a continuación.

Entre dichas secuencias homólogas se incluyen las secuencias de genes de mamíferos distintas de las del ser humano, que codifican la podocina, preferentemente de un primate, bovino, ovino o porcino, o también un roedor, así como las variantes alélicas o secuencias polimórficas.

La siguiente tabla presenta un determinado número de polimorfismos identificados en el gen NPHS2:

Polimorfismos identificados en el gen NPHS2

Exón	Polimorfismo	Posición sobre las secuencias listadas
1	-51/ATGT>C	+19 sobre la SEC ID n° 1
	nt 102 (G>A) = G34G	+171 sobre la SEC ID n° 1
2	nt 288 (G>T) = S96S	+357 sobre la SEC ID n° 1
5	nt 686 (G>A) = R229Q	+755 sobre la SEC ID n° 1
7	873 +7 A>G	+413 sobre la SEC ID n° 9
8	nt 954 (T>C) = A318A	+1023 sobre la SEC ID n° 1
	nt 1038 (A>G) = L346L	+1107 sobre la SEC ID n° 1

La presente invención también tiene por objeto un polipéptido aislado como se define en la reivindicación 2 ó 3.

También se describe en este documento un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 2 ó 29, o una secuencia homóloga, definida como

- una secuencia idéntica a al menos el 70% de la secuencia SEC ID n° 2 ó 29; o
- una secuencia codificada por una secuencia de ácido nucleico homóloga como se define en la reivindicación 2 ii), es decir una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la SEC ID n° 2 ó 29 o su secuencia complementaria, en condiciones rigurosas de hibridación.

Más generalmente, por “secuencia homóloga de aminoácidos” se entiende cualquier secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia SEC ID n° 2 ó 29 por sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido o de un número reducido de aminoácidos, particularmente por sustitución de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales o pseudoaminoácidos en posiciones tales que estas modificaciones no perjudiquen significativamente a la actividad biológica de la podocina.

Dichas sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, es decir, sustituciones de aminoácidos de la misma clase, tales como sustituciones de aminoácidos de cadenas laterales no cargadas (tales como asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina), aminoácidos de cadenas laterales básicas (tales como lisina, arginina e histidina), aminoácidos de cadenas laterales ácidas (tales como ácido aspártico y ácido glutámico) aminoácidos de cadenas laterales apolares (tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína).

Preferentemente, dicha secuencia de aminoácidos homóloga es idéntica al menos al 85% de la secuencia SEC ID n° 2 ó 29, preferentemente al menos al 95%.

La homología se determina generalmente utilizando un programa de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Las secuencias de aminoácidos similares están alineadas para obtener el máximo grado de homología (es decir, de identidad). Con este fin, puede ser necesario introducir de manera artificial huecos (“gaps”) en la secuencia. Una vez realizado el alineamiento óptimo, se establece el grado de homología (es

ES 2 342 255 T3

decir, de identidad) registrando todas las posiciones para las cuales los aminoácidos de dos secuencias comparadas son idénticos, con respecto al número total de posiciones.

“La actividad biológica de la podocina” se refiere al mantenimiento de la integridad del filtro glomerular. La ausencia o la modificación de la podocina provoca la filtración de proteínas a nivel del glomérulo y por consiguiente la aparición de proteinuria.

El polipéptido de la presente invención puede sintetizarse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. El polipéptido de la invención puede sintetizarse, por ejemplo, por técnicas de síntesis química, tales como la síntesis de tipo Merrifield que es ventajosa por razones de pureza, especificidad antigénica, ausencia de productos secundarios no deseados y por su facilidad de producción.

Una podocina recombinante también puede producirse mediante un procedimiento, en el que un vector que contiene un ácido nucleico que comprende la secuencia SEC ID n° 1 ó n° 28 o una secuencia homóloga se transfiere a una célula huésped que se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido correspondiente.

La podocina producida puede después recuperarse y purificarse.

El experto en la materia conoce los procedimientos de purificación utilizados. El polipéptido recombinante obtenido puede purificarse partir de lisados y extractos celulares, del sobrenadante del medio de cultivo, por procedimientos utilizados individualmente o en combinación, tales como fraccionamiento, procedimientos cromatográficos, técnicas de inmunoafinidad usando anticuerpos mono- o policlonales específicos, etc.

La secuencia de ácido nucleico de interés, que codifica la podocina, puede insertarse en un vector de expresión, en el cual la secuencia está unida operativamente a elementos que permiten regular su expresión, tales como particularmente promotores, activadores y/o terminadores de la transcripción.

Las señales que controlan la expresión de las secuencias de nucleótidos (promotores, activadores, secuencias de terminación, ...) se seleccionan en función del huésped celular utilizado. A este efecto, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónoma dentro del huésped seleccionado, o en vectores integradores del huésped seleccionado. Dichos vectores se prepararán de acuerdo con los procedimientos normalmente utilizados por el experto en la materia, y los clones resultantes pueden introducirse en un huésped apropiado por procedimientos convencionales, tales como por ejemplo, electroporación o precipitación con fosfato de calcio.

Los vectores de clonación y/o de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 también forman parte de la presente invención.

La invención también se refiere a células huésped transfectadas, de manera transitoria o estable, por estos vectores de expresión. Estas células pueden obtenerse introduciendo en células huésped, eucariotas o procariotas, una secuencia de nucleótidos insertada en un vector tal como se define anteriormente y después cultivando dichas células en condiciones que permitan la replicación y/o la expresión de la secuencia de nucleótidos transfectada.

Los ejemplos de células huésped incluyen particularmente células de mamíferos, tales como las células COS-7, 293, MDCK, células de insectos tales como las células SF9, de bacterias tales como *E. coli* y cepas de levaduras tales como YRG2.

Las diferentes secuencias de nucleótidos descritas en este documento pueden ser o no de origen artificial. Puede tratarse de secuencias de ADN o de ARN, obtenidas explorando bancos de secuencias por medio de sondas elaboradas basándose en las secuencias SEC ID n° 1 ó 28 y 3 a 10. Dichos bancos pueden prepararse por técnicas clásicas de biología molecular, conocidas por el experto en la materia.

Las secuencias de nucleótidos descritas en este documento también pueden prepararse por síntesis química o incluso por procedimientos mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas explorando bancos.

Estas secuencias de nucleótidos permiten realizar sondas o cebadores, que hibridan específicamente con una secuencia SEC ID n° 1 ó 28, ó de 3 a 10, de acuerdo con la invención, o su cadena complementaria. Las condiciones de hibridación apropiadas corresponden a las condiciones de temperatura y de fuerza iónica normalmente utilizadas por el experto en la materia, preferentemente en condiciones rigurosas tales como las definidas anteriormente. Estas sondas pueden utilizarse como herramienta de diagnóstico *in vitro* para detectar, por experimentos de hibridación, particularmente de hibridación “*in situ*”, transcritos específicos del polipéptido de la invención en muestras biológicas o para poner de manifiesto síntesis aberrantes o anomalías genéticas resultantes de un polimorfismo, mutaciones o un mal corte y empalme.

Los ácidos nucleicos de la invención útiles como sondas incluyen como mínimo 10 nucleótidos, preferentemente al menos 20 nucleótidos, más preferentemente al menos 100 nucleótidos. Los ácidos nucleicos útiles como cebadores incluyen como mínimo 10 nucleótidos, preferentemente al menos 14 nucleótidos y preferentemente menos de 40 nucleótidos.

Más precisamente, en este documento se describe un ácido nucleico que tiene al menos 10 nucleótidos, que híbrida específicamente con una de las secuencias de ácido nucleico de SEC ID nº 1 ó 28, ó 3 a 10 o su cadena complementaria, en condiciones de hibridación rigurosas.

5 De manera ventajosa, como sonda puede utilizarse el ácido nucleico constituido por la secuencia SEC ID nº 11, que abarca una parte del exón 5, los exones 6 y 7 y una gran parte del exón 8 (de la base de 728 a la base 1792 del ADNc).

10 Por otro lado, para una amplificación (por ejemplo, por PCR) pueden utilizarse, como cebador, los ácidos nucleicos constituidos por las secuencias de la SEC ID nº 12 a la SEC ID nº 27.

15 Preferentemente, las sondas o los cebadores de la invención se marcan antes de su uso. Para esto, el experto en la materia dispone de varias técnicas, como por ejemplo el marcaje fluorescente, radiactivo, quimioluminiscente o enzimático.

En la presente invención se incluyen procedimientos de diagnóstico *in vitro* en los que se aplican estos oligonucleótidos para la detección de mutaciones o transformaciones genómicas, a nivel del gen NPHS2.

20 El experto en la materia conoce bien los procedimientos convencionales para analizar el ADN contenido en una muestra biológica y para diagnosticar un trastorno genético. Están disponibles numerosas estrategias de análisis genotípico (Antonarakis y *col.*, 1989, Cooper y *col.*, 1991).

25 Preferentemente, para detectar una anomalía en el gen NPHS2, puede utilizarse el procedimiento DGGE (electroforesis en gel de gradiente desnaturante), el procedimiento de SSCP (polimorfismo de conformación de cadena sencilla) o el procedimiento DHPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturante; Kuklin y *col.* 1997; Huber y *col.*, 1995). Preferentemente, después de estos procedimientos se realiza una secuenciación directa. El procedimiento de RT-PCR puede realizarse ventajosamente para detectar anomalías en el transcrito de NPHS2, porque permite visualizar las consecuencias de una mutación de corte y empalme que provoca la pérdida de 1 o más exones a nivel del transcrito, o un corte y empalme aberrante debido a la activación de un sitio críptico. Preferentemente, 30 también después de este procedimiento se realiza una secuenciación directa. Los procedimientos desarrollados más recientemente que utilizan microplacas de ADN también pueden aplicarse para detectar una anomalía en el gen NPHS2 (Bellis y *col.*, 1997).

35 La clonación del gen NPHS2 así como la identificación de diversas mutaciones responsables del síndrome nefrótico corticorresistente permiten contemplar diagnósticos directos. La especificidad y la fiabilidad de dichos procedimientos de diagnóstico son particularmente apreciables para un diagnóstico prenatal. Por lo tanto, las secuencias de ácidos nucleicos descritas en este documento representan una herramienta particularmente interesante para el asesoramiento genético.

40 Por lo tanto, la presente invención tiene por tanto la utilización de acuerdo con la reivindicación 13.

Por lo tanto, la invención tiene por objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un síndrome nefrótico corticorresistente asociado a una mutación del gen NPHS2, que comprende las etapas constituidas por:

- 45 a1) poner en contacto una muestra biológica que contenga el ADN con oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de todo o parte del gen NPHS2, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico, de acuerdo con la reivindicación 1;
- 50 b1) amplificar dicho ADN;
- c1) detectar los productos de amplificación;
- d1) comparar los productos de amplificación obtenidos con los obtenidos con una muestra de control, y detectar de esta manera una posible anomalía en dicho gen NPHS2, indicadora de un síntoma nefrótico corticorresistente asociado a una mutación en el gen NPHS2;
- 55

o, de acuerdo con una alternativa,

- 60 a2) poner en contacto una muestra biológica que contenga el ARN con oligonucleótidos específicos que permitan la ampliación de todo o parte del transcrito del gen NPHS2, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 ó 6;
- b2) amplificar dicho ARN;
- 65 c2) detectar los productos de amplificación;

ES 2 342 255 T3

- d2) comparar los productos de amplificación obtenidos con los obtenidos con una muestra de control, y detectar de esta manera una posible anomalía en dicho transcrito del gen NPHS2, indicadora de un síntoma nefrótico corticorresistente, asociado a una mutación del gen NPHS2.

También forman parte de la invención los ácidos nucleicos aislados constituidos por una secuencia diferente de la secuencia SEQ ID nº 1 por una mutación, inserción o delección, particularmente en al menos una de las posiciones de los nucleótidos 481, 173/174, 488, 924/925, 128, 343, 482, 548, 607 y 940 o también 1033, 529, 622, 774-782, 154, 422, 442, 571, 572, 583, 783, 794 y 848, a reserva de que dicho ácido nucleico aislado esté implicado en un síndrome nefrótico corticorresistente.

Entre las mutaciones ya identificadas, se destacan particularmente las siguientes, presentadas en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

Mutaciones en el gen NPHS2

Tipo de mutación	Cambio de nucleótido	Efecto en la secuencia codificante	Exón	nº de identificación de la familia relacionada	Estado de la mutación ^b	Posición en la SEQ ID nº 1
Sin sentido Delección/ inserción	C→T en 412	R138X	3	8	H	481
	Inserción de G en 104/5	Desplazamiento	1	14	h	173/174
	Delección de G en 419	Desplazamiento	3	14	h ^c	488
	Delección de AA en 855/6	Desplazamiento	7	9	h	924/925
Sentido erróneo	C→T en 59	P20L	1	15	H	128
	G→T en 274	G92C	1	3	h ^{c,d}	343
	G→A en 413	R138Q	3	4	h ^c	482
				6	H	
				7	H	
				11	H	
				12	h	
				13	H	
	A→G en 479	D160G	4	16	H	548
	G→A en 538	V180M	5	10	H	607
				12	h	940
	C→T en 871	R291W	7	2	h ^c	

^a: la posición de las mutaciones se indica tomando como base 1 la A del codon ATG y de acuerdo con la nomenclatura de *Antonarakis et al*

^b: H = mutación homocigota; h = mutación heterocigota

^c: únicamente detectada la mutación paterna

^d: implica el último nucleótido del exón 1 y por tanto probablemente modifica también el corte y empalme

No se han vuelto a encontrar mutaciones en 40 controles

TABLA 2

Otras mutaciones en el gen NPHS2

	Tipo de mutación	Cambio de nucleótido ^a	Efecto en la secuencia codificante	Exón	Número de familias	Estado de la mutación ^b	Posición en la SEQ ID nº 1
5							
10	Sin sentido	C→T en 964	R322X	8	1	h	1033
	Deleción	/ Inserción de T en 460	Desplazamiento	4	1	h	529
15	inserción	Deleción de T en 553	Desplazamiento	5	1	h	622
20		Deleción de 9pb en 705-713	Desplazamiento de TER 236-238	5	1	h	774-782
25	Sentido erróneo	G→A en 85	A29T	1	1	h	154
		C→T en 353	P118L	2	1	h	522
		G→A en 373	A125I	2	1	h	442
30		C→A en 502	R168S	4	1	h	571
		C→T en 502	R168C	4	1	h	571
		G→A en 503	R168H	4	1	h	572
		C→G en 514	L172V	4	1	h	583
35		G→T en 714	R238S	5	1	h	783
		C→T en 725	A242V	5	2	h	794
40		T→A en 779	V260E	6	2	H	848

^a: la posición de las mutaciones se indica tomando como base 1 la A del codon ATG y de acuerdo con la nomenclatura de *Antonarakis et al*

^b: H = mutación homocigota; h = mutación heterocigota

No se han vuelto a encontrar mutaciones en 40 controles.

Estos ensayos pueden aprovecharse particularmente en familias que ya tienen un niño afectado, para el diagnóstico presintomático (en particular diagnóstico prenatal).

En los casos esporádicos, la detección de una mutación del gen NPHS2 permite modificar el tratamiento (y en particular evitar tratamientos inmunosupresores que serán ineficaces) y predecir la ausencia de recidiva después del trasplante renal.

Este ensayo diagnóstico también puede servir para investigar la asociación de determinadas variantes polimórficas de la podocina en otras patologías que implican anomalías secundarias del filtro glomerular (nefropatía diabética, nefropatía del SIDA, reducción nefrónica, hipertensión arterial). Estas variantes podrían representar factores de susceptibilidad en el desencadenamiento o progresión de la nefropatía en estas enfermedades.

La invención también tiene por objeto anticuerpos dirigidos contra el polipéptido podocina tal como se define en la reivindicación 2 ó 3.

Se puede tratar de anticuerpos poli- o monoclonales o de sus fragmentos, anticuerpos quiméricos, particularmente humanizados o inmunoconjugados.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse a partir del suero de un animal inmunizado contra un polipéptido de acuerdo con los modos operativos usuales.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, se puede utilizar como antígeno un fragmento peptídico apropiado, que puede acoplarse por medio de un resto radioactivo a una proteína o a otro péptido. Se inmunizaron conejos con el equivalente de 1 mg del antígeno peptídico de acuerdo con el procedimiento descrito por Benoit *et al.* (1982). A intervalos de cuatro semanas, los animales se trataron mediante inyecciones de 200 μ g de antígeno y de 10 a 14 días más tarde se desangraron. Después de la tercera inyección, el antisuero se examinó para determinar su capacidad para unirse al péptido antigénico radiomarcado con yodo, preparado por el procedimiento de cloramina-T y a continuación se purificó mediante una cromatografía en columna de intercambio iónico de carboximetil celulosa (CMC). A continuación, las moléculas de anticuerpo se recogieron en los mamíferos y se aislaron hasta la concentración deseada por procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, utilizando DEAE Sephadex para obtener la fracción de IgG.

Con objeto de aumentar la especificidad del suero policlonal, los anticuerpos pueden purificarse mediante una cromatografía de inmunoafinidad utilizando polipéptidos que inmunizan en fase sólida. Los anticuerpos se ponen en contacto con el polipéptido que inmuniza en fase sólida durante un tiempo suficiente de manera que se hace inmuno-reaccionar el polipéptido con la molécula de anticuerpo para formar un complejo inmunológico en fase sólida.

A modo de ejemplo, se han producido anticuerpos policlonales en el conejo contra dos proteínas recombinantes que comprenden los fragmentos de los aminoácidos 15 a 89 y 135 a 383 de la podocina, acoplados a seis restos histidina del extremo N-terminal, habiéndose subclonado los ADNc en el vector PQ E32 (Quiagen) y expresado en *E. coli*.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de acuerdo con el procedimiento clásico de cultivo de hibridomas descrito por Köhler y Milstein (1975).

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fab y F(ab')₂. También pueden presentarse en forma de inmunokonjugados o de anticuerpos marcados.

Los anticuerpos de la invención, en particular los anticuerpos monoclonales, pueden utilizarse particularmente para análisis por inmunohistoquímica de la podocina sobre cortes de tejidos específicos, por ejemplo, por inmunofluorescencia, marcaje con oro, inmunoperoxidasa...

Los anticuerpos así producidos también pueden utilizarse ventajosamente en cualquier situación en la que deba observarse la expresión de la podocina.

La invención también tiene por objeto el uso de al menos un anticuerpo, de acuerdo con la reivindicación 11, para la detección o purificación de un polipéptido tal como se define en la reivindicación 2 ó 3 en una muestra biológica.

Más precisamente, en este documento se describe un procedimiento *in vitro* para la detección o la medición del índice de expresión de la podocina en una muestra biológica, que comprende poner en contacto al menos un anticuerpo como se define anteriormente con dicha muestra biológica en condiciones que permitan la posible formación de complejos inmunológicos específicos entre la podocina y el o dichos anticuerpos, y detectar los complejos inmunológicos específicos posiblemente formados. La puesta a punto de dicho ensayo (de tipo ELISA por ejemplo) podría ser particularmente útil para investigar el desarrollo de anticuerpos anti-podocina después del trasplante renal, en determinadas enfermedades renales autoinmunes, incluso en el síndrome nefrótico corticosensible.

También se describe un kit para aplicar este procedimiento que comprende:

- al menos un anticuerpo específico de la podocina, posiblemente fijado sobre un soporte;
- medios de revelación de la formación de complejos antígenos/anticuerpos específicos entre la podocina y dicho anticuerpo y/o medios de cuantificación de estos complejos.

La invención también tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido podocina tal como se define en la reivindicación 2 ó 3, o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, que contienen al menos un polipéptido, pueden determinarse de la manera habitual por el experto en la materia, particularmente de acuerdo con los criterios generalmente tomados en cuenta para establecer un tratamiento terapéutico adaptado a un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados, etc.

De manera general, puede administrarse a adultos humanos una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz que varía de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1 mg.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente, que codifica un polipéptido con actividad de podocina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, destinándose dicha composición para utilizarse en terapia génica. El ácido nucleico preferentemente insertado en un vector generalmente viral (tal como adenovirus y retrovirus) puede administrarse en forma desnuda, exento de cualquier vehículo que favorezca la transferencia a la célula diana, tal como liposomas aniónicos, lípidos catiónicos, micropartículas, por ejemplo micropartículas de oro, agentes de precipitación, por ejemplo, fosfato de calcio, o cualquier otro agente que facilite la transfección. En este caso, el polinucleótido puede diluirse simplemente en una solución fisiológicamente aceptable, tal como una solución estéril o una solución estéril taponada en presencia o ausencia de un vehículo.

De manera alternativa, un ácido nucleico de la invención puede asociarse a agentes que faciliten la transfección. Puede estar, entre otras cosas, (i) asociado a un agente químico que modifica la permeabilidad celular, tal como la bupivacaína; (ii) encapsulado en liposomas, posiblemente en presencia de sustancias complementarias que facilitan la transfección; o (iii) asociado a lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, de oro o de tungsteno.

Cuando las construcciones de ácido nucleico de la invención recubren micropartículas, éstas pueden inyectarse por vía intradérmica o intraepidérmica por la técnica del bombardeo de genes, "gene gun" (documento WO 94/24263).

La cantidad a utilizar como medicamento depende particularmente de la propia construcción del ácido nucleico, del individuo al cual se administra este ácido nucleico, del modo de administración y del tipo de formulación, y de la patología. De manera general, puede administrarse a adultos humanos una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz que varía de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 1 mg, preferentemente de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 800 μg y, de manera preferente de aproximadamente 25 μg a aproximadamente 250 μg .

Las construcciones de ácidos nucleicos de la invención pueden administrarse por cualquier vía de administración convencional tal como particularmente por la vía parenteral. La elección de la vía de administración depende en particular de la formulación seleccionada. Una administración diana en el tejido renal, en particular en los glomérulos, puede ser particularmente ventajosa.

El polipéptido de la invención o el ácido nucleico que codifica este polipéptido son útiles como medicamento, particularmente para el tratamiento de una enfermedad renal, en particular para el tratamiento de un síndrome nefrótico corticorresistente asociado a una mutación del gen NPHS2 o que se produce en el marco de una enfermedad general (SIDA, diabetes ...).

También se describe un procedimiento de tratamiento terapéutico, en el cual se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un polipéptido podocina tal como se define anteriormente o un ácido nucleico que codifica este polipéptido.

El paciente en cuestión es generalmente un ser humano, pero la solicitud también puede extenderse a cualquier mamífero si fuera necesario.

Los ejemplos siguientes, así como la figura adjunta, ilustran la invención sin limitar su alcance.

Leyenda de la figura

La figura adjunta es un mapa de la región NPHS2. La región candidata de 2,5 Mb está delimitada por los marcadores *D1S1640* y *183f10-CA*. En el mapa se indica la posición de los marcadores polimórficos y de las secuencias STS (en negrita e itálica) y las secuencias ETS únicas y agrupaciones UniGene de EST (en letra normal). Los YAC, PAC y cósmidos se representan por líneas. Los genes se indican por cuadros rayados. El *NGAP* está representado por dos cuadros separados por una línea horizontal que simboliza la presencia de exones cortados y empalmados de manera alternativa en posición 5', probablemente debido a un promotor alternativo. El *RPS14P*, un pseudogen de la proteína ribosomal S14, se localiza en el interior del intrón de *NGAP*.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación del gen NPHS2

El enfoque utilizado por los autores de la presente invención para identificar el gen NPHS2 ha sido definir el intervalo genético mínimo en el que se situaba el gen, después establecer el mapa físico de la región construyendo un cóntigo de PAC que abarca la región, hacer el inventario de los genes conocidos y los EST de la región y caracterizar los EST (por RACE-PCR y selección del banco de ADNc de riñón fetal).

1. Cartografía física de la región candidata y localización del gen NPHS2

Un análisis de unión usando marcadores microsatélites (Dib *et al.*, 1996), así como nuevas familias de pacientes, ha permitido localizar el locus NPHS2 entre los marcadores D1S480 y D1S2883. Se ha construido un cóntigo de YAC (20 clones) que abarca la región entre estos dos marcadores. También se ha construido un cóntigo de cromosomas artificiales P1 (PAC) para abarcar esta región estimada en aproximadamente 3 Mb. Otros marcadores microsatélites también se han podido caracterizar en este cóntigo. Dos familias que presentan eventos de recombinación han permitido localizar de manera exacta el locus de la enfermedad entre D1S1640 y 183F10CA, nuevo marcador microsatélite identificado por secuenciación de subclones de la región. El cóntigo 35 PAC entre estos dos marcadores abarca aproximadamente de 2 a 2,5 Mb, pero contiene 5 espacios parcialmente rellenados por 14 cósmidos.

Los autores de la invención también han localizado sobre este cóntigo, investigando en los bancos de datos las secuencias potencialmente localizadas en la región y secuenciando los extremos de los YAC, de los PAC y de los cósmicos, así como de subclones de diferentes PAC que contienen potencialmente islotes CpG, genes ya conocidos, agrupaciones de EST (UniGene) y EST independientes.

2. Identificación del gen NPHS2

Consultando la base de datos del Sanger Centre, se ha descubierto que el PAC 545A16 contenía el marcador D1S215 localizado cerca del límite telomérico de la región de interés así como el EST AA398634, que provenía de un banco de testículo y contenía secuencias cortas débilmente homólogas al gen de la estomatina, pero curiosamente, *a priori*, en sentido opuesto al EST. Los autores de la invención han localizado por tanto este EST en el cósmido 28e17 y en el PAC 302d13 y han demostrado por RT-PCR que se expresaba en el riñón.

Después han sido necesarios múltiples ensayos de RACE-PCR para obtener un ADNc a partir de este EST. En efecto, los productos obtenidos correspondían, en la mayoría de los experimentos, a ADN genómicos que aparecían sin empalmes. Sin embargo, uno de los productos obtenidos correspondía a un transcrito que contenía una corta fase de lectura abierta y homólogo a seis EST (agrupación Unigene Hs. 192657), provenientes todos de un banco de riñón humano, pero que no se había localizado en el genoma. De hecho, se comprueba que los EST del agrupamiento Unigene Hs. 254975 al cual pertenece el EST AA398634 parecen pertenecer a otro gen o pseudogen cuyo sentido de la transcripción es opuesto al NPHS2 y que solapa parcialmente con la secuencia 3' de NPHS2, lo que explica los datos proporcionados por los bancos de datos relativos al EST AA398634. Utilizando este producto de RACE-PCR descrito anteriormente como sonda para hibridar una transferencia de Northern que contiene ARN de diferentes tejidos, se ha demostrado que este transcrito de aproximadamente 2 kb se expresaba solamente en el riñón. Estos resultados se han confirmado hibridando una transferencia puntual que contenía ARN de 50 tejidos diferentes (Clontech). Se obtuvo una señal intensa solamente con el riñón adulto y el riñón fetal. La localización de este gen en el cóntigo y su expresión casi exclusiva en el riñón hacían de este gen un excelente gen candidato, hipótesis reforzada por la casi ausencia del producto de amplificación por RT-PCR, utilizando cebadores situados a la vez en la parte 5' y en la parte 3' del ADNc, con el ARN extraído del riñón de un paciente terminal. El ADNc completo del gen NPHS2 se ha clonado por corte y empalme de un banco de ADNc de riñón fetal humano con la sonda utilizada para hibridar la transferencia de Northern (Secuencia ID nº 11).

Las uniones intrones-exones y las secuencias genómicas aguas arriba del exón 1 se han obtenido por secuenciación directa de PAC 302d13 y del cósmido 28e17.

Ejemplo 2

Identificación de mutaciones en familias de pacientes

Los autores de la invención que han caracterizado la estructura intrón-exón del gen, han continuado investigando después por SSCP ("Polimorfismo Conformacional Monocatenario") mutaciones en 16 pacientes no emparentados que presentan un síndrome nefrótico corticorresistente familiar tal como se describe anteriormente (inicio precoz, evolución rápida hacia la insuficiencia renal terminal, sin recidiva después del implante y lesiones de glomeruloesclerosis segmentaria y focal en las biopsias renales) y que pertenecen a familias en las que el estudio de haplotipos era compatible con una relación en el locus NPHS2.

Para este análisis SSCP, los exones se amplificaron por PCR utilizando cebadores intrónicos flanqueantes. Las condiciones de PCR y los cebadores se seleccionaron utilizando el programa Oligo 5.0 (NBI) y eran los siguientes:

exón 1, 5'-GCA GCG ACT CCA CAG GGA CT-3' (SEC ID nº 12) y 5'-TCA GTG GGT CTC GTG GGG AT-3' (SEQ ID nº 13);

exón 2, 5'-AGG CAG TGA ATA CAG TGA AG-3' (SEC ID nº 14) y 5'-GGC CTC AGG AAA TTA CCT A-3' (SEQ ID nº 15);

ES 2 342 255 T3

exón 3, 5'-TTC TGG GAG TGA TTT GAA AG-3' (SEC ID nº 16) y 5'-TGA AGA AAT TGG CAA GTC AG-3' (SEQ ID nº 17);

exón 4, 5'-AAG GTG AAA CCC AAA CAG C-3' (SEC ID nº 18) y 5'-CGG TAG GTA GAC CAT GGA AA-3' (SEC ID nº 19);

exón 5, 5'-CAT AGG AAA GGA GCC CAA GA-3' (SEC ID nº 20) y 5'-TTT CAG CAT ATT GGC CAT TA-3' (SEC ID nº 21);

exón 6, 5'-CTC CCA CTG ACA TCT GA-3' (SEC ID nº 22) y 5'-AAT TTA AAA TGA AAC CAG AA-3' (SEC ID nº 23);

exón 7, 5'-CTA AAT CAT GGC TGC ACA CC-3' (SEC ID nº 24) y 5'-CTT CCT AAA GGG CAG TCT GG-3' (SEC ID nº 25);

exón 8, 5'-GGT GAA GCC TTC AGG GAA TG-3' (SEC ID nº 26) y 5'-TTC TAT GGC AGG CCC CTT TA-3' (SEC ID nº 27);

a temperaturas de hibridación de 50°C (exón 6), 55°C (exones 2, 3, 4 y 5), 60°C (exones 1, 7 y 8). A razón de la gran cantidad de GC del exón 1, la PCR se efectuó utilizando la Taq polimerasa de Qiagen y la solución -Q de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además, debido a su tamaño, el producto de PCR del exón 1 ha debido digerirse por la enzima *SmaI* en dos fragmentos antes de la electroforesis en gel. La migración se ha realizado durante dos horas a 600 V, 25 mA y 15 W con la unidad de electroforesis Genephor, utilizando el kit GeneGel Excel 12.5/24 (Pharmacia). La clonación se realizó con un colorante "Automated Gel Stainer GeneStain" utilizando el kit de tinción PlusOne Silver (Pharmacia).

Resultados

Se observaron diez mutaciones diferentes. Algunas dan lugar a un desplazamiento de la fase de lectura o a la aparición de un codón de terminación prematuro y son por lo tanto mutaciones inactivadoras, lo que demuestra que el gen identificado es en efecto el gen NPHS2. Otras son mutaciones de sentido erróneo producidas en regiones muy conservadas de la proteína, que se segregan en las familias con la enfermedad y que no se han vuelto a encontrar en 80 cromosomas de control, lo que sugiere en gran medida que estas mutaciones son responsables del fenotipo en los niños afectados.

Una de las mutaciones de sentido erróneo (R138Q) se ha vuelto a encontrar en seis individuos no emparentados, pero que provenían de la misma parte de Europa, sugiriendo la posibilidad de un efecto fundador para esta mutación.

Ejemplo 3

Estudio de la expresión del gen NPHS2 en el riñón por hibridación in situ

Procedimiento

Secciones de riñón de 6 µm cubiertas con parafina se separaron de su parafina y se rehidrataron y después se trataron con microondas en un tampón de citrato de sodio (0,01 M, pH 6) para aumentar la señal hibridación. Las ribosondas de NPHS2 se sintetizaron a partir del producto de PCR de 1065 pares de bases (posición 728 a 1792 del ANDc de NPHS2, SEQ ID nº 1) sub-clonado en el vector PGEM-Teasy. La sonda antisentido se sintetizó después de la digestión con *SalI* utilizando la polimerasa T7 y la sonda sentido después de la digestión con *SacII* utilizando la polimerasa Sp6. Las ribosondas se marcaron con digoxigenina-11-UTP (Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o con [³⁵S]UTP como se describe en Sibony *et al.*, 1995. Los experimentos de hibridación *in situ* se realizaron como se describe en Kalatzis *et al.* (1998) y Heidet *et al.* (1997) para sondas de digoxigenina-11-UTP y [³⁵S] UTP, respectivamente.

Resultados

Estos experimentos de hibridación *in situ* han permitido demostrar que el gen NPHS2 se expresaba únicamente a nivel de los podocitos en el riñón maduro. En los riñones fetales, no se observó ninguna señal en las primeras fases del desarrollo de la nefrona. En cambio, se detectaron señales intensas en el segmento inferior del cuerpo en S, en la región correspondiente a futuros podocitos. Esta expresión persiste en los glomérulos inmaduros y en los glomérulos maduros del córtex profundo. Estos resultados que demuestran la expresión exclusiva del gen NPHS2 en los podocitos, a la vez precozmente durante el desarrollo y en los glomérulos maduros, están completamente de acuerdo con la patología observada, y justifican la denominación de "podocina" para la proteína codificada por el gen NPHS2.

Bibliografía

- **Antonarakis** S. E., Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N Engl J. Med.* 320:153-163 (1989).
- 5 - **Antonarakis**, S. E., Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Nomenclature Working Group. Hum. Mut.* 11, 1-3 (1998).
- **Bellis** y col., *medecine/sciences*, 13:1317-24, (1997).
- 10 - **Benoit** y col., *PNAS USA*, 79, 917-921 (1982).
- **Broyer** M., **Meyrier** A., **Niaudet** P. & **Habib** R. Minimal changes and focal segmental glomerular sclerosis. In *Oxford Textbook of Clinical Nephrology* 2ª ed. (eds Davison A.M. y col.,) 493-535 (*Oxford University Press, Inc.*, 1998).
- 15 - **Cooper** y col., Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA, 3ª Edición *Hum Genet.*, 87:519-560 (1991).
- **Conton**, P. J. y col., Clinical and pathologic features of familial focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* 26, 34-40 (1995).
- 20 - **Dib**, C. y col., A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380, 152-154 (1996).
- **Fuchshuber**, A. y col., Mapping a gene (NPHS2) to chromosome 1 q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2155-2158 (1995).
- 25 - **Heidet**, L. y col., Diffuse leiomyomatosis associated with X-linked Alport syndrome: extracellular matrix study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Lab. Invest.* 76, 233-243 (1997).
- 30 - **Huber**, C. G. y col., Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly(styrenedivinylbenzene) particles. *Anal. Chem.* 67, 578-585 (1995).
- **Kuklin**, A. y col., Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE™ DNA fragment analysis system. *Genetic Testing* 1, 201-206 (1997/98).
- 35 - **Kalatzis**, V., **Sahly**, I., **El-Amraoui**, A. & **Petit**, C. Eya1 expression in the developing ear and kidney: towards the understanding of the pathogenesis of Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome. *Dev. Dyn.* 213, 486-499 (1998).
- **Kestilä**, M. y col., Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1, 575-582 (1998).
- 40 - **Köhler** y **Milstein**, *Nature*, 256, 495-497, (1975).
- **Lench** y col., *Am. J. Hum. Genet.* 63, A296 (1998).
- 45 - **Mathis**, B. J. y col., A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney. Int.* 53, 282-286 (1998).
- **Sambrook** y col., Molecular cloning, a laboratory manual Spring Harbor *Laboratory Press*, 9.54-62 (1989).
- 50 - **Tsukaguchi** y col., Adult onset familial FSGS mapping to chromosome 1 q. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 443A (1999).
- **Winn**, M. P. y col., Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 58, 113-120 (1999).
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado, cuya secuencia se selecciona de la SEC ID nº 3 a la SEC ID nº 10, que representa un fragmento del ADN genómico del gen humano designado NPHS2.
2. Polipéptido aislado, denominado podocina, constituido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2.
3. Polipéptido aislado, constituido por una secuencia homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, definiéndose dicha secuencia homóloga como:
 - i) una secuencia idéntica a al menos el 70% de la secuencia SEC ID nº 2; o
 - ii) una secuencia codificada por una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia SEC ID nº 1 o su secuencia complementaria, en condiciones rigurosas de hibridación, tales como las proporcionadas por una temperatura de hibridación de 5 a 30°C inferior a la T_m, y un tampón de hibridación SSC 6x, entendiéndose que dicho polipéptido presenta la actividad biológica de la podocina, polipéptido de secuencia SEC ID nº 2.
4. Ácido nucleico aislado, constituido por una secuencia diferente de la secuencia SEC ID nº 1 por una mutación, inserción o delección, en al menos una posición entre los nucleótidos 481, 173/174, 488, 924/925, 128, 343, 482, 548, 607 y 940, o también 1033, 529, 622, 774-782, 154, 422, 442, 571, 572, 583, 783, 794 y 848, a reserva de que dicho ácido nucleico aislado esté implicado en un síndrome nefrótico corticorresistente.
5. Ácido nucleico aislado, constituido por la secuencia SEC ID nº 1 que codifica un polipéptido designado podocina.
6. Ácido nucleico aislado, constituido por una secuencia homóloga a la secuencia SEC ID nº 1, definiéndose dicha secuencia homóloga como:
 - i) una secuencia idéntica a al menos el 70% de la secuencia SEC ID nº 1, entendiéndose que dicha secuencia codifica un polipéptido que presenta la actividad biológica del polipéptido denominado podocina de secuencia SEC ID nº 2; o
 - ii) una secuencia que codifica el polipéptido, como se define en la reivindicación 2 ó 3.
7. Vector de clonación y/o de expresión que contiene un ácido nucleico, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1, 4, 5 ó 6.
8. Célula huésped transfectada por un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Ácido nucleico constituido por una secuencia seleccionada entre las secuencias SEC ID nº 11 a SEC ID nº 27.
10. Procedimiento de producción de un polipéptido recombinante podocina, en el que un vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 se transfiere a una célula huésped, que se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, respectivamente.
11. Anticuerpo dirigido contra el polipéptido como se define en la reivindicación 2 ó 3.
12. El uso de al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11 para detectar o purificar un polipéptido como se define en la reivindicación 2 ó 3 en una muestra biológica.
13. El uso de al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, 4, 5 ó 6 para detectar una anomalía en el gen NPHS2, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o, en su transcrito, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 ó 6.
14. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un síndrome nefrótico corticorresistente, que comprende las etapas constituidas por:
 - a1) poner en contacto una muestra biológica que contiene el ADN con oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de todo o parte del gen NPHS2, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1;
 - b1) amplificar dicho ADN;

ES 2 342 255 T3

c1) detectar los productos de amplificación;

d1) comparar los productos de amplificación obtenidos con los obtenidos con una muestra de control, y detectar de esta manera una posible anomalía en dicho gen NPHS2, indicadora de un síndrome nefrótico corticorresistente

o, según una alternativa,

a2) poner en contacto una muestra biológica que contiene el ARN con oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de todo o parte del transcrito del gen NPHS2, definido como que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 ó 6;

b2) amplificar dicho ARN;

c2) detectar los productos de amplificación;

d2) comparar los productos de amplificación obtenidos con los obtenidos con una muestra de control, y detectar de esta manera una posible anomalía en dicho transcrito del gen NPHS2, indicadora de un síndrome nefrótico corticorresistente.

15. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, para su uso en el tratamiento de enfermedades renales, particularmente de un síndrome nefrótico corticorresistente.

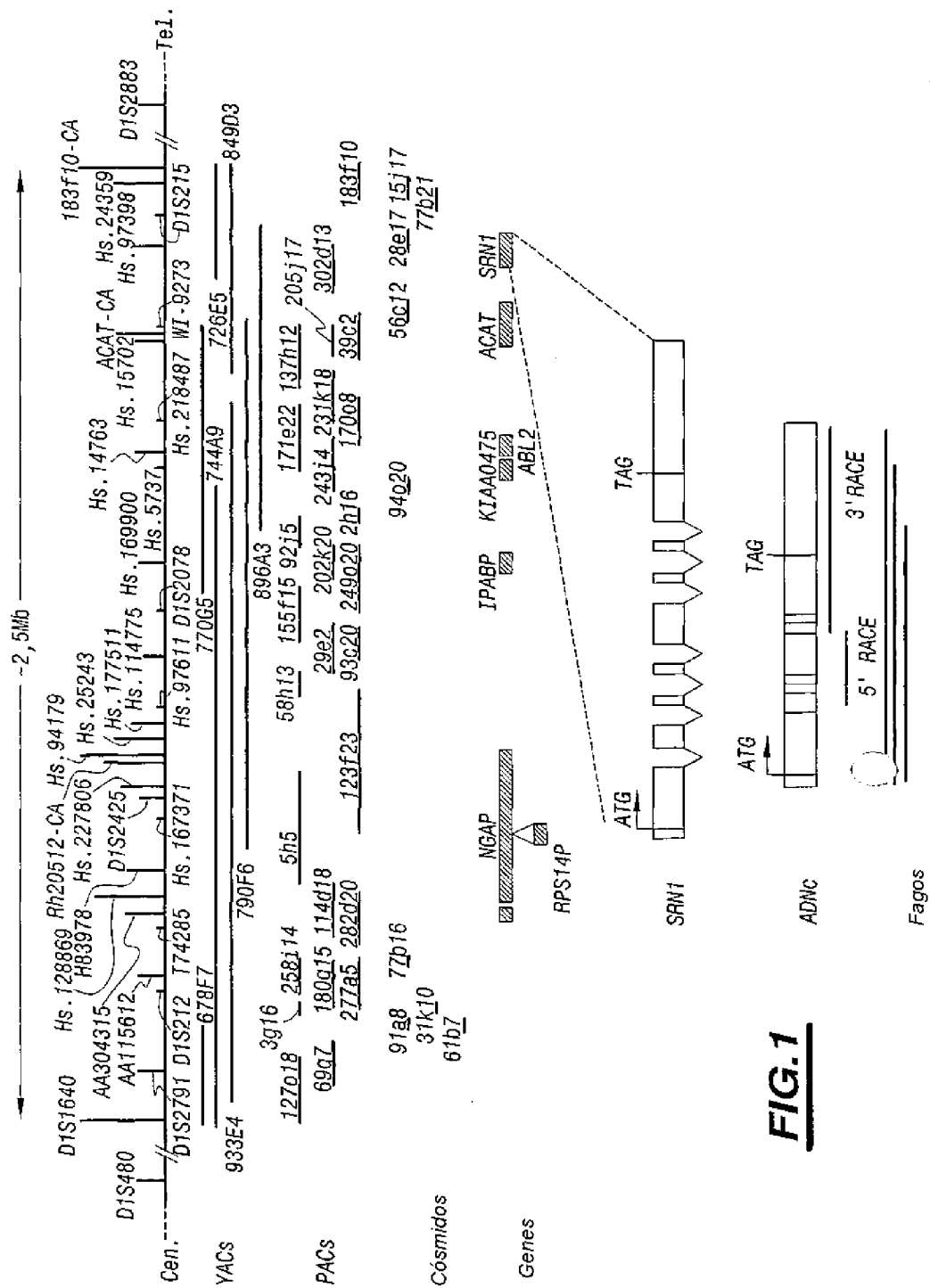


FIG.1

ES 2 342 255 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> Gen NPHS2 implicado en el síndrome nefrótico corticorresistente, proteína codificada por este gen y usos de diagnóstico y terapéuticos

<130> BFF 99/0667

10

<140>

<141>

15 <150> FR 0000709

<151> 20-01-2000

<160> 29

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1853

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

30 <221> CDS

<222> (70) .. (1221)

<400> 1

35

cacaggagact ggcgtccctt gcccttagcg ctcccgcgct gctgctccag ccgcccggca 60

gctctgagg atg gag agg agg gcg cgg agc tcc tcc agg gag tcc cgc ggg 111

40

Met Glu Arg Arg Ala Arg Ser Ser Ser Arg Glu Ser Arg Gly
1 5 10

cga ggc ggc agg act ccg cac aag gag aac aag agg gca aag gcc gag 159

45

Arg Gly Gly Arg Thr Pro His Lys Glu Asn Lys Arg Ala Lys Ala Glu
15 20 25 30

agg agc ggc ggg ggc cgc ggg cgc cag gag gct ggg ccc gag ccg tcg 207

50

Arg Ser Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gln Glu Ala Gly Pro Glu Pro Ser
35 40 45

ggc tcc gga cgg gcg ggg acc ccg ggg gag ccc cga gcg ccc gcc gcc 255

Gly Ser Gly Arg Ala Gly Thr Pro Gly Glu Pro Arg Ala Pro Ala Ala
50 55 60

acg gtg gtg gac gtg gat gag gtc cga ggc tcc ggc gag gag ggc acc 303

55

Thr Val Val Asp Val Asp Glu Val Arg Gly Ser Gly Glu Glu Gly Thr
65 70 75

gag gtg gtg ggc ctg ttg gag agc gag cgg ccc gag gaa ggt acc aaa 351

60

Glu Val Val Ala Leu Leu Glu Ser Glu Arg Pro Glu Glu Gly Thr Lys
80 85 90

tcc tcc ggc tta ggg gcc tgt gag tgg ctt ctt gtc ctc att tcc ctg 399

65

Ser Ser Gly Leu Gly Ala Cys Glu Trp Leu Leu Val Leu Ile Ser Leu
95 100 105 110

ES 2 342 255 T3

5	ctc ttc atc atc atg acc ttc cct ttt tcc atc tgg ttc tgc gta aag 447 Leu Phe Ile Ile Met Thr Phe Pro Phe Ser Ile Trp Phe Cys Val Lys 115 120 125
10	gtt gta caa gag tat gaa aga gta att ata ttc cga ctg gga cat ctg 495 Val Val Gln Glu Tyr Glu Arg Val Ile Ile Phe Arg Leu Gly His Leu 130 135 140
15	ctt cct gga aga gcc aaa ggc cct ggt ctt ttc ttt ttt ttg ccc tgc 543 Leu Pro Gly Arg Ala Lys Gly Pro Gly Leu Phe Phe Phe Leu Pro Cys 145 150 155
20	ctg gat acc tac cac aag gtt gac ctt cgt ctc caa act ctg gag ata 591 Leu Asp Thr Tyr His Lys Val Asp Leu Arg Leu Gln Thr Leu Glu Ile 160 165 170
25	cct ttt cat gag atc gtg acc aaa gac atg ttt ata atg gag ata gat 639 Pro Phe His Glu Ile Val Thr Lys Asp Met Phe Ile Met Glu Ile Asp 175 180 185 190
30	gcc att tgc tac tac cga atg gaa aat gcc tct ctt ctc cta agc agt 687 Ala Ile Cys Tyr Tyr Arg Met Glu Asn Ala Ser Leu Leu Leu Ser Ser 195 200 205
35	ctt gct cat gta tct aaa gct gtg caa ttc ctt gtg caa acc act atg 735 Leu Ala His Val Ser Lys Ala Val Gln Phe Leu Val Gln Thr Thr Met 210 215 220
40	aag cgt ctc cta gca cat cga tcc ctc act gaa att ctt cta gag agg 783 Lys Arg Leu Leu Ala His Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Leu Glu Arg 225 230 235
45	aag agc atc gcc caa gat gca aag gtt gcc ttg gat tca gtg acc tgt 831 Lys Ser Ile Ala Gln Asp Ala Lys Val Ala Leu Asp Ser Val Thr Cys 240 245 250
50	att tgg gga atc aaa gtg gag aga ata gaa att aaa gat gtg agg ttg 879 Ile Trp Gly Ile Lys Val Glu Arg Ile Glu Ile Lys Asp Val Arg Leu 255 260 265 270
55	cca gct ggg ctt cag cac tca ctg gct gtg gag gct gaa gcg caa aga 927 Pro Ala Gly Leu Gln His Ser Leu Ala Val Glu Ala Glu Ala Gln Arg 275 280 285
60	caa gcc aaa gtg cgg atg att gct gca gaa gcg gaa aag gct gct tct 975 Gln Ala Lys Val Arg Met Ile Ala Ala Glu Ala Glu Lys Ala Ala Ser 290 295 300
65	gag tcc ctg agg atg gca gct gag att ctg tca ggc acc cct gct gct 1023 Glu Ser Leu Arg Met Ala Ala Glu Ile Leu Ser Gly Thr Pro Ala Ala 305 310 315
	gtt cag ctt cga tac ctc cac acc ctt cag tct ctg tcc aca gag aag 1071 Val Gln Leu Arg Tyr Leu His Thr Leu Gln Ser Leu Ser Thr Glu Lys 320 325 330
	cct tcc act gtg gtt tta cct ttg cca ttt gac cta ctg aat tgc ctg 1119 Pro Ser Thr Val Val Leu Pro Leu Pro Phe Asp Leu Leu Asn Cys Leu 335 340 345 350

ES 2 342 255 T3

tct tct ccc agc aac aga act cag gga agc ctc ccc ttc cca agt cct 1167
 Ser Ser Pro Ser Asn Arg Thr Gln Gly Ser Leu Pro Phe Pro Ser Pro
 355 360 365

5 tcc aaa cct gtt gag cca cta aat cct aaa aag aaa gac tct ccc atg 1215
 Ser Lys Pro Val Glu Pro Leu Asn Pro Lys Lys Lys Asp Ser Pro Met
 370 375 380

10 tta tag gaaggatggg gcataatgtg actgtaaagg ggctgccat agaaaagtca 1271
 Leu

catccctgag ggagacactc tgtccctcatt ccctgccctt cctttgggtg ccatatggaa 1331

15 tggccatgga atgcacgaag tcacaatgca ccatccatga gaagacrgtg aaatgatgta 1391

atgacagaga aggcagacaa catgtttccg tgactcatct agtcagagca attatgggaa 1451

20 acagctttgg tcaacattct actttggaaa gaattttgag tctagatgtg gttaaatttt 1511

gacttctggg aacttgggtc agatgtccct ttcactgtat gtcctctgac ccctttggca 1571

aggttgccac agtcccaca gcccttccca caagcaccta tcattgggct tgtcacactc 1631

25 tattgtctct ctgtcccgaa gatgcagtct tctctccaat gatactacca agtcttagtt 1691

ttcctcaacc aactcaatc tttttgctcc acctgaatt cctcacacct aacctgata 1751

30 gttacctaaa gtgacactta aatgtttcag agtgaatgca aaaaagagag atgtacttgg 1811

agtcggatat acaatttatc cctaattaaa gcatttaaaa gg 1853

35 <210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Met Glu Arg Arg Ala Arg Ser Ser Ser Arg Glu Ser Arg Gly Arg Gly
 45 1 5 10 15

Gly Arg Thr Pro His Lys Glu Asn Lys Arg Ala Lys Ala Glu Arg Ser
 20 25 30

50 Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gln Glu Ala Gly Pro Glu Pro Ser Gly Ser
 35 40 45

Gly Arg Ala Gly Thr Pro Gly Glu Pro Arg Ala Pro Ala Ala Thr Val
 55 50 55 60

Val Asp Val Asp Glu Val Arg Gly Ser Gly Glu Glu Gly Thr Glu Val
 65 70 75 80

60 Val Ala Leu Leu Glu Ser Glu Arg Pro Glu Glu Gly Thr Lys Ser Ser
 85 90 95

Gly Leu Gly Ala Cys Glu Trp Leu Leu Val Leu Ile Ser Leu Leu Phe
 65 100 105 110

Ile Ile Met Thr Phe Pro Phe Ser Ile Trp Phe Cys Val Lys Val Val

ES 2 342 255 T3

	115		120		125													
5	Gln	Glu	Tyr	Glu	Arg	Val	Ile	Ile	Phe	Arg	Leu	Gly	His	Leu	Leu	Pro		
	130						135					140						
	Gly	Arg	Ala	Lys	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Pro	Cys	Leu	Asp		
	145					150					155					160		
10	Thr	Tyr	His	Lys	Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Phe		
					165					170					175			
15	His	Glu	Ile	Val	Thr	Lys	Asp	Met	Phe	Ile	Met	Glu	Ile	Asp	Ala	Ile		
				180					185					190				
	Cys	Tyr	Tyr	Arg	Met	Glu	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala		
				195				200					205					
20	His	Val	Ser	Lys	Ala	Val	Gln	Phe	Leu	Val	Gln	Thr	Thr	Met	Lys	Arg		
	210						215					220						
25	Leu	Leu	Ala	His	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Leu	Glu	Arg	Lys	Ser		
	225					230					235					240		
	Ile	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Val	Thr	Cys	Ile	Trp		
					245					250					255			
30	Gly	Ile	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Ala		
				260					265					270				
35	Gly	Leu	Gln	His	Ser	Leu	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Gln	Ala		
		275						280					285					
	Lys	Val	Arg	Met	Ile	Ala	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser		
		290					295					300						
40	Leu	Arg	Met	Ala	Ala	Glu	Ile	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gln		
	305					310					315				320			
45	Leu	Arg	Tyr	Leu	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Thr	Glu	Lys	Pro	Ser		
					325					330					335			
	Thr	Val	Val	Leu	Pro	Leu	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Asn	Cys	Leu	Ser	Ser		
				340					345					350				
50	Pro	Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Pro	Phe	Pro	Ser	Pro	Ser	Lys		
			355					360					365					
55	Pro	Val	Glu	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys	Lys	Lys	Asp	Ser	Pro	Met	Leu			
		370					375					380						

60 <210> 3
 <211> 1104
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 342 255 T3

<400> 3

5 aggatatataaa ataagaaata cgtagggagg agagaaaggc atccttgaga cgactccaag 60
 aaggaaagtt ggggatgagg cgaaatttct gattttacct taaagtgacc ctaattcgat 120

10	gaccttttgt	ggtttttttc	ttttttcttt	tttacttggc	cctgccaag	caggacctaa	180
	aaacaaacag	acaaaaaagg	ttactaacaa	ctgttctct	ccacgaaaat	ctgcagtaaa	240
	aggtaaaaga	tgtattcggt	ttgaagagaa	accagagctt	gcgatgagct	tctgtatctc	300
	cgtcagccct	ctagcatgac	attaggaacc	ctccaggaga	tgagtcttca	cagcccgggg	360
15	tggcacctct	agacacgcac	ttttcaacgc	ccgcaccctg	ccccggggcg	gctctccac	420
	ccaggcctgc	ctctgcttca	gcgcgcctcc	ggccgtggga	gtcggcgggc	gcagtcacac	480
	gctccaccaa	gacacagctg	tcgggggtcc	gggtgcgcgc	cgcccgggcg	ccccggtgtc	540
	cgccccctgc	cctcagcccc	caccgcagcg	tctttagggt	cccccgggca	cgccacgcgg	600
20	accgcgagcg	actccacagg	gactgcgctc	ccgtgccctt	agcgtctccg	cgctgctgct	660
	ccagccgcgc	ggcagctctg	aggatggaga	ggagggcgcg	gagctctctc	agggagtcct	720
	gcggggcgag	cggcaggact	cgcacacaagg	agaacaagag	ggcaaaagcc	gagaggagcg	780
	gcggggggcg	cggggcgccag	gaggctgggc	ccgagccgtc	gggtctcgga	cgggcgggga	840
	ccccggggga	gccccgagcg	ccgcgcgcca	cggtgggtgga	cgtggattag	gtccgaggct	900
	ccggcgagga	gggcaccgag	gtggtggcgc	tgttggagag	cgagcggccc	gaggaaggta	960
	cggattcagc	accactatct	gctacttttc	caggtggtaa	ctaagggggc	tcagataagg	1020
	tggaaagggt	catccccact	agaccactg	aagccagagc	agattgctgg	atgctcaggt	1080
	tcccaggaac	ggaaggcgct	aagt				1104

 $\langle 210 \rangle$ 4

<211> 378

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

[illegible]

45 $\langle 210 \rangle$ 5

 $\langle 211 \rangle$ 700

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 5

	catataaaaag	ctagtgcaga	actcacagaa	aatataagat	ttaatatgcc	ttgataagat	60
55	taatttaggg	aaagttggcc	atggatttta	gataatcata	agtctttaat	caaaattctg	120
	tctatgggtt	caaaaattaa	catggttaat	atactttttc	atttctgaaa	ttttacactt	180
	actaaatata	gatttttgaa	acttaagtat	taatagaaat	tttttcctgg	ttctcaaaac	240
	aaaaaatttc	tgatatctag	gatcattctt	atgccaggcg	ctttttgaaga	ctttttcttt	300
	ctgggagtga	tttgaaagga	ttaaattttct	ctttaggttg	tacaagagta	tgaagaagta	360
60	attatattgc	tactggggaca	tctgcttctt	ggaaagacca	aaggccctgg	taaaaaaaca	420
	ctcttttttt	tctaaacacc	tctctcttga	cttgccaatt	tcttcaaccc	atgcagattt	480
	gtaatatgga	cctcagatta	aatgaagtaa	cttgattcat	gatatctgaa	ttttccaatc	540
	tgttacttat	aggtttattca	aatattcttc	agagactatt	actaactaggt	cataggttagc	600
	caagagagag	aattgggtaca	gagagccac	atgccagggc	aaggcttgct	ggaatatgcaa	660
65	gttagcttag	gaccaattggc	tgggacttga	tgtgagtacg			700

ES 2 342 255 T3

<210> 6

<211> 360

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

10      ctggattaca tattataata tataatagtg          ctctcctttt accctcaggt ggaggtggga 60
      tgggccaatg gtctgtaatt agaggctaag aaaagtaatg tagtgtgcaa cctgacccca 120
      gaaagggtgaa acccaaacag cyttcatgct agctatttat cygtcayttc ctctctctct 180
      ctttttaggtc ttttcttttt tttgcctgct ctggatacct accacaaggt tgaccttcgt 240
      ctccaaactc tggagatacc ttttcatgag gtaagccaaa tgatggcttt tgctttctct 300
15      atacattttc catggtctac ctaccgngga caaaatgatt atttatactc aaaaatagga 360

```

<210> 7

20 <211> 649

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 7

```

      cttcttatga gaagattatt tctgattttt tttaaaaaag gatttaccac aggattaagt 60
      tgtgcattct ttcgtgtatt taataaaaaat ttcataattt tcaaaaacat gtctatttta 120
30      aataaagggt aggccaactc cattttttctc ttgcggagaa aattcacttt gaacacattt 180
      agttcctcta accccacata ggaaaggagc ccaagaatca agcctgtcat ccaaaactttt 240
      ttctgcctag atcgtgacca aagacatgtt tataatggag atagatgcca tttgctacta 300
      ccgaatggaa aatgcctctc ttctcctaag cagtettgct catgtatcta aagctgtgca 360
35      attccttggtg caaaccacta tgaagcgtct cctagcacat cgatccctca ctgaaattct 420
      tctagagagg aagagcatcg cccaagatgc aaaggactt agataaacat aatggccaat 480
      atgctgaaat atttatcttt tattcatattg ttcggtggac atttattaaa tcttctatgg 540
      ccagttccat cccttagggg ccatcccttt gggagctcat agctagttag gaggttgcca 600
      aattgactct gagtcaatta tagttatcag tatggtgctt gttaatcag          649
40

```

<210> 8

45 <211> 592

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 8

```

      aattacattt agggccacct ggataatcca ggataatatc cccatctcaa gagcctttaa 60
      cctaatacaa ccagcaaaat ccctcttggg gtaacattca cagattccag ggattaggac 120
55      atgggatatc tttggggacc attattcagc ataccacacc atcttcaatt gcacagatat 180
      ttattgggtg gcaccatgca agttaaacaa ctctttgcaa ggcactgtga agttaaatat 240
      aacaggcaaa taatgtcctt tcaaagggaa tgttgttcct tagtacagaa caatggccac 300
      cagggtttag gcatgctctc ctcccacctg gaggtccca ctgacatctg aattcttctt 360
      tccacagggtt gccttggatt cagtgccttg tatttgggga atcaaagtgg agagaataga 420
60      aatgtgggta ggaaattaac tagcaagaac tgtatgataa aggaaaatat tctggtttca 480
      ttttaaattt ttcatttgaa aaattatttt cactgagtac tatagccata tcagcataaa 540
      tttataaaaa agagaaacaa atcacctaata atcttacagc cataacacaa tc          592

```

65 <210> 9

<211> 716

ES 2 342 255 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 9

```

cattgttcaa atttattagt tggggccttag attatatacct aagcggaaaa actgagcaca 60
gctcatcaaa tacaaaacct gctgtgctga taatgagaaa ctacagctct actgtagcat 120
10 cagcaataat acaaaactgc atttgaggca tcgaccttgg agatctgect acttttgacc 180
tcagaagtct aggaatggca cactctggtc actecaaatt tgctactcat catgagacag 240
cagtagagag gcttgcaagt ctgtgtgaaa gctttggccc ctaaatcatg gctgcacacc 300
tacatacctg cattctttct ttttcagtaa agatgtgagg ttgccagctg ggcttcagca 360
ctcactggct gtggaggctg aagcgcaaag acaagccaaa gtgcgggtga gcactccatc 420
15 cccccacca gactgccctt taggaaggcc tgctcgtgga gaacatttcc cctttgcttc 480
cttactgtcc attcattagg cactgggcan aagctgtctt gggcccttac aactctatta 540

aaattgctct cttaaagtgt gttaatagtc          ccctgactaa tgcaactcct ctccctctct 600
20 gaagclactg ataatagtga ccactcactg cttgagcttc acctccctc tctctcctta 660
aaggcatctc ctccacacac atcaatccct cttctctagt gctggcatct tttcct      716

```

25 <210> 10

<211> 1305

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 10

```

35 ggcaaaatcc taatctttca agggccacca gatgctaata actcccttaa tacttcattt 60
atacttgtga tggctcctaa cgcattccac cttaaattgt gattaacagt ttaatctgtc 120
tccccagctc aagacccttc agaaagaaga ataaacatgt tctatgctta accgtgcttg 180
ccacatagta gatgctcagt gcttgtctgc tgagtcatac tgcatagtgg tgaagccttc 240
agggaaatgaa gaacaatcac tttgctttcg tcacatgttt tctagatgat tgctgcagaa 300
40 gcggaaaagg ctgcttctga gtccctgagg atggcagctg agattctgtc aggcacccct 360
gctgctgttc agcttcgata cctccacacc cttcagcttc tgtccacaga gaagccttcc 420
actgtggttt tacctttgcc atttgacctc ctgaattgcc tgtcttctcc cagcaacaga 480
actcagggaa gcctcccttc cccaagtcct tccaaacctg ttgagccact aaatcctaaa 540
aagaaagact ctcccatggt ataggaagga tggggcataa tgtgactgta aaggggcctg 600
45 ccatagaaaa gtcacatccc tgaggagagc actctgtcct cattccctgc ccttcctttg 660
gttgccatat ggaatggcca tgggaatgcac gaagtcacaa tgcaccatcc atgagaagac 720
rgtgaaatga tgtaatgaca gagaaggcag acaacatgtt tccgtgactc atctagtcag 780
agcaattatg ggaaacagct ttggtcaaca ttctactttg graagaattt tgagtctaga 840
50 tgtgggttaa ttttgacttc tgggaacttg gttcagatgt ccttttcact gtatgtcctc 900
tgaccctttt ggcaagggtg ccacagctcc cacagccctt cctacaagca cctatcattg 960
ggcttgtcac actctattgc tcttctgtcc craagatgca gtcttctctc caatgatact 1020
accaagtctt agttttcctc aaccacactc aatctttttg ctccaccctg aattcctcac 1080
acctaaccct gatagttacc taaagtgcac cttaaattgt tcagagtgaat tgcaaaaaag 1140
55 agagatgtac ttggagtcgg atatacaatt tatccctaata taaagcattt aaaaggaatt 1200
ctttttgtgg agattccttt ttttaacaaa taaataaaag gacaaaaaca tctgacacat 1260
gtggcttaaa atctgaggga gaatcactat aaatagtggg ccaga      1305

```

60 <210> 11

<211> 1065

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 342 255 T3

<400> 11

```

5      ccactatgaa gcgtctccta gcacatcgat ccctcactga aattcttcta gagaggaaga 60
      gcatcgccca agatgcaaag gttgccttgg attcagtgac ctgtatttgg ggaatcaaag 120
      tggagagaaat agaaaattaaa gatgtgaggt tgccagctgg gcttcagcac tcaactggctg 180
      tggagggtga agcgcaaaga caagccaaag tgcggatgat tgctgcagaa gcggaaaagg 240
      ctgcttctga gtccctgagg atggcagctg agattctgtc aggcacccct gctgctgttc 300
10     agcttcgata cctccacacc cttcagttct tgtccacaga gaagccttcc actgtgggtt 360
      tacctttgcc atttgacctt ctgaattgcc tgtcttctcc cagcaacaga actcagggaa 420
      gcctccccctt cccaagtcct tccaaacctg ttgagccact aaatcctaaa aagaaagact 480
      ctcccatgtt ataggaagga tggggcataa tgtgactgta aaggggcctg ccatagaaaa 540
      gtcacatccc tgaggagagc actctgtcct cattccctgc ccttcctttg gttgccatat 600
15     ggaatggcca tggaatgcac gaagtcacaa tgcaccatcc atgagaagac agtgaaatga 660
      tgtaattgaca gagaaggcag acaacatgtt tccgtgactc atctagtcag agcaattatg 720
      ggaaacagct ttggtcaaca ttctactttg gaaagaattt tgagtctaga tgtgggttaa 780
      ttttgacttc tgggaacttg gttcagatgt ccctttcact gtatgtcctc tgaccccttt 840
20     ggcaagggtg ccacagctcc cacagccctt cctacaagca cctatcattg ggcttgtcac 900
      actctattgc tcttctgtcc cgaagatgca gtcttctctc caatgatact accaagtctt 960
      agttttcctc aaccacactc aatctttttg ctccaccctg aattcctcac acctaaccct 1020
      gatagttacc taaagtgaca cttaaattgt tcagagtga tgcaa 1065

```

25

<210> 12

<211> 20

30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

35

gcagcgactc cacaggact

20

<210> 13

40

<211> 20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 13

tcagtgggtc tcgtgggat

20

50

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

60

aggcagtga tacagtgaag

20

<210> 15

<211> 19

65

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 342 255 T3

	<400> 15	
	ggcctcagga aattaccta	19
5	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 16	
15	ttctgggagt gatttgaag	20
	<210> 17	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
25	tgaagaaatt ggcaagtcag	20
	<210> 18	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 18	
	aaggtgaaac ccaaacagc	19
40	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19	
50	cggtaggtag accatggaaa	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
60	cataggaaag gagccaaga	20
	<210> 21	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 342 255 T3

	<400> 21	
	tttcagcata ttggccatta	20
5	<210> 22	
	<211> 17	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 22	
15	ctcccactga catctga	17
	<210> 23	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
25	aatttaaaat gaaaccagaa	20
	<210> 24	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 24	
	ctaaatcatg gctgcacacc	20
40	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 25	
	cttcctaaag ggcagtctgg	20
50	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 26	
60	ggtgaagcct tcagggaatg	20
	<210> 27	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 342 255 T3

<400> 27

ttctatggca ggccccttta

20

5

<210> 28

<211> 1652

<212> ADN

10 <213> *Rattus rattus*

<220>

<221> CDS

15 <222> (47) .. (1195)

<400> 28

20

cgactctgcc agcatctggc tttggggggc gtgcccgcgc cgtaga atg gac agc 55
Met Asp Ser
1

25

agg gcg cgg agc tct tcc aga aag acc cac ggg aga ggt agc agg tcc 103
Arg Ala Arg Ser Ser Ser Arg Lys Thr His Gly Arg Gly Ser Arg Ser
5 10 15

30

tct tct agg gat gac aag aag tca aag gcc ggg agg ggc aac aga ggc 151
Ser Ser Arg Asp Asp Lys Lys Ser Lys Ala Gly Arg Gly Asn Arg Gly
20 25 30 35

35

cgc gcg cgc ccg gat gct ggg gca gag cgg cag agc gcc ggg cgg acg 199
Arg Ala Arg Pro Asp Ala Gly Ala Glu Arg Gln Ser Ala Gly Arg Thr
40 45 50

40

ggg acc cgg gag gag cac cga gct cca gca gcc acg gta gtg aat gtg 247
Gly Thr Arg Glu Glu His Arg Ala Pro Ala Ala Thr Val Val Asn Val
55 60 65

45

gac gag gtt cga agc ccg ggt gag gag ggt acg gaa gtg gtg gcc ctg 295
Asp Glu Val Arg Ser Pro Gly Glu Glu Gly Thr Glu Val Val Ala Leu
70 75 80

ctg gag agc gag cga cca gag gaa ggg atc aag ccc tct gga tta ggg 343

50

55

60

65

ES 2 342 255 T3

	Leu	Glu	Ser	Glu	Arg	Pro	Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	
	85						90				95						
5	gcc	tgc	gag	tgg	ctt	ctt	gtc	ctc	tcc	tcc	ctg	atc	ttc	atc	atc	gta	391
	Ala	Cys	Glu	Trp	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Ser	Leu	Ile	Phe	Ile	Ile	Val	
	100					105					110					115	
10	acg	ttt	ccc	ttt	tcc	atc	tgg	ttc	tgc	ata	aag	gtt	gtt	caa	gaa	tac	439
	Thr	Phe	Pro	Phe	Ser	Ile	Trp	Phe	Cys	Ile	Lys	Val	Val	Gln	Glu	Tyr	
					120					125					130		
15	gaa	aga	gta	att	ata	ttc	cga	ctg	gga	cat	ctg	ctt	cct	gga	aga	gcc	487
	Glu	Arg	Val	Ile	Ile	Phe	Arg	Leu	Gly	His	Leu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ala	
				135					140					145			
20	aaa	gga	cct	ggc	ctg	ttc	ttt	ttt	cta	ccc	tgc	ctg	gac	acc	tat	cac	535
	Lys	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Pro	Cys	Leu	Asp	Thr	Tyr	His	
			150					155					160				
25	aag	gtt	gac	ctc	cgt	ctc	cag	acc	ttg	gaa	ata	cct	ttc	cat	gag	gtg	583
	Lys	Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Phe	His	Glu	Val	
		165					170					175					
30	gta	acc	aaa	gat	atg	ttc	aca	atg	gag	ata	gac	gct	gtc	tgc	tac	tac	631
	Val	Thr	Lys	Asp	Met	Phe	Thr	Met	Glu	Ile	Asp	Ala	Val	Cys	Tyr	Tyr	
	180					185					190					195	
35	cgc	atg	gaa	aat	gcc	tcc	ctt	ctt	cta	agc	agt	cta	gct	cat	gtg	tcc	679
	Arg	Met	Glu	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	His	Val	Ser	
					200					205					210		
40	aaa	gcc	atc	cag	ttc	ctg	gtg	caa	acc	acc	atg	aag	cgc	ctc	ttg	gca	727
	Lys	Ala	Ile	Gln	Phe	Leu	Val	Gln	Thr	Thr	Met	Lys	Arg	Leu	Leu	Ala	
				215					220					225			
45	cat	cga	tcc	ctc	act	gaa	att	ctc	ctg	gaa	agg	aag	agc	att	gcc	caa	775
	His	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Leu	Glu	Arg	Lys	Ser	Ile	Ala	Gln	
			230					235					240				
50	gat	gta	aag	gtt	gcc	ttg	gac	tca	gtg	acc	tgt	gtt	tgg	ggc	atc	aaa	823
	Asp	Val	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Val	Thr	Cys	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	
		245					250					255					
55	gtg	gag	aga	act	gaa	att	aag	gat	gta	cgg	ctg	cca	gct	ggg	ctt	cag	871
	Val	Glu	Arg	Thr	Glu	Ile	Lys	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Gln	
		260				265					270					275	
60	cac	tct	ctg	gct	gtg	gaa	gct	gag	gca	caa	aga	cag	gcc	aaa	gtg	cgg	919
	His	Ser	Leu	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Lys	Val	Arg	
					280					285					290		
65	gtg	att	gct	gcc	gaa	ggg	gaa	aaa	gct	gcc	tct	gag	tcc	ctg	agg	atg	967
	Val	Ile	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Lys	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Arg	Met	
				295					300					305			
70	gcg	gct	gag	att	ctg	tca	ggc	acc	cca	gct	gct	gtc	cag	ctc	cgg	tac	1015
	Ala	Ala	Glu	Ile	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	Arg	Tyr	
			310					315					320				
75	ctg	cac	act	ctt	cag	tcc	ttg	tcc	aca	gac	aag	cgg	tcc	acc	gtg	gtt	1063

ES 2 342 255 T3

Leu His Thr Leu Gln Ser Leu Ser Thr Asp Lys Pro Ser Thr Val Val
 325 330 335
 5 ttg cct tta ccc ttt gac atg ctg aac ctt ctc tcc tct ccc agc aac 1111
 Leu Pro Leu Pro Phe Asp Met Leu Asn Leu Leu Ser Ser Pro Ser Asn
 340 345 350 355
 10 aga gca caa gga agc atc aac tac cca agt tct ccc aaa cct gtt gaa 1159
 Arg Ala Gln Gly Ser Ile Asn Tyr Pro Ser Ser Pro Lys Pro Val Glu
 360 365 370
 15 cca cta aat ccc aaa agg aag gac tct cct atg cta taggggagag 1205
 Pro Leu Asn Pro Lys Arg Lys Asp Ser Pro Met Leu
 375 380
 20 tggacaagag taatgggaat acaccatata aagccgtatc cctgagcagag gcattcgggtc 1265
 cccacgcca ggcccaccct gcccttggtg tttgcctttt gagtgtatca tgtcacaaga 1325
 tggacacacg catgagaaca cagtgaatg gcagagaaga catccagcca cacaagtggg 1385
 tcgtctcatc attcattaca ggaaagaaag agatttagaa ttttgggttg aggggctgga 1445
 25 gagatggctc agtgggttatg aacaactgact gctcttcag aggtcctgag ttcaaattccc 1505
 agcaaccaca tgggtggctca caaccatctg taatgggatc cgatgcctc ttctgggtgtg 1565
 30 taagacagtg acagtgtact catcatatat aagatgaata aataaacctc tttaaaaaaa 1625
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1652
 <210> 29
 35 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Rattus rattus*
 40 <400> 29
 Met Asp Ser Arg Ala Arg Ser Ser Ser Arg Lys Thr His Gly Arg Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Arg Ser Ser Ser Arg Asp Asp Lys Lys Ser Lys Ala Gly Arg Gly
 20 25 30
 50 Asn Arg Gly Arg Ala Arg Pro Asp Ala Gly Ala Glu Arg Gln Ser Ala
 35 40 45
 Gly Arg Thr Gly Thr Arg Glu Glu His Arg Ala Pro Ala Ala Thr Val
 50 55 60
 55 Val Asn Val Asp Glu Val Arg Ser Pro Gly Glu Glu Gly Thr Glu Val
 65 70 75 80
 60 Val Ala Leu Leu Glu Ser Glu Arg Pro Glu Glu Gly Ile Lys Pro Ser
 85 90 95
 Gly Leu Gly Ala Cys Glu Trp Leu Leu Val Leu Ser Ser Leu Ile Phe
 100 105 110
 65 Ile Ile Val Thr Phe Pro Phe Ser Ile Trp Phe Cys Ile Lys Val Val

ES 2 342 255 T3

	115	120	125	
5	Gln Glu Tyr Glu Arg Val Ile Ile Phe Arg Leu Gly His Leu Leu Pro 130 135 140			
	Gly Arg Ala Lys Gly Pro Gly Leu Phe Phe Phe Leu Pro Cys Leu Asp 145 150 155 160			
10	Thr Tyr His Lys Val Asp Leu Arg Leu Gln Thr Leu Glu Ile Pro Phe 165 170 175			
15	His Glu Val Val Thr Lys Asp Met Phe Thr Met Glu Ile Asp Ala Val 180 185 190			
	Cys Tyr Tyr Arg Met Glu Asn Ala Ser Leu Leu Leu Ser Ser Leu Ala 195 200 205			
20	His Val Ser Lys Ala Ile Gln Phe Leu Val Gln Thr Thr Met Lys Arg 210 215 220			
25	Leu Leu Ala His Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Leu Glu Arg Lys Ser 225 230 235 240			
	Ile Ala Gln Asp Val Lys Val Ala Leu Asp Ser Val Thr Cys Val Trp 245 250 255			
30	Gly Ile Lys Val Glu Arg Thr Glu Ile Lys Asp Val Arg Leu Pro Ala 260 265 270			
35	Gly Leu Gln His Ser Leu Ala Val Glu Ala Glu Ala Gln Arg Gln Ala 275 280 285			
	Lys Val Arg Val Ile Ala Ala Glu Gly Glu Lys Ala Ala Ser Glu Ser 290 295 300			
40	Leu Arg Met Ala Ala Glu Ile Leu Ser Gly Thr Pro Ala Ala Val Gln 305 310 315 320			
45	Leu Arg Tyr Leu His Thr Leu Gln Ser Leu Ser Thr Asp Lys Pro Ser 325 330 335			
	Thr Val Val Leu Pro Leu Pro Phe Asp Met Leu Asn Leu Leu Ser Ser 340 345 350			
50	Pro Ser Asn Arg Ala Gln Gly Ser Ile Asn Tyr Pro Ser Ser Pro Lys 355 360 365			
55	Pro Val Glu Pro Leu Asn Pro Lys Arg Lys Asp Ser Pro Met Leu 370 375 380			