



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 306**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01271857 .3**

86 Fecha de presentación : **21.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1347048**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54

Título: **Proteasa novedosa.**

30

Prioridad: **25.12.2000 JP 2000-393372**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73

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

72

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

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 280 306 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteasa novedosa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una proteasa novedosa.

Antecedentes de la técnica

10 ADAMTS (Una desintegrina y metaloproteasa con motivo de trombospondina) es un grupo de moléculas que contienen un dominio tipo desintegrina, un dominio tipo metaloproteasa y una secuencia repetida de trombospondina tipo I (denominada en lo sucesivo en el presente documento secuencia repetida TSP-1). Hasta ahora se han notificado nueve moléculas ADAMTS humanas.

15 Entre las moléculas ADAMTS humanas, se ha observado que ADAMTS4 (agrecanasa-1) y ADAMTS11 (agrecanasa-2) muestran una actividad de digestión selectiva entre el residuo de ácido glutámico 373° y el residuo de alanina 374° (entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴) de un agregano de sustrato extracelular, y además, se sugirió una posibilidad de que sean enzimas esenciales que degradan el agregano de sustrato extracelular en cartílago de artritis u osteoartritis (Tortorella M.D. *et al.*, Science, 284, 1664-1666, 1999; y Abbaszade I. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999). Además se ha mostrado que ADAMTS2 (procolágeno I N-proteinasa) está implicada en la conversión de procolágeno tipo I para dar un tipo maduro del mismo como una enzima que escinde y elimina la parte N-terminal del procolágeno tipo I, y desempeña un papel importante en la formación de fibras de colágeno, y que una aberración en el gen del mismo está relacionada con el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIC (Colige A. *et al.*, Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999).

25 Concretamente se ha mostrado que las moléculas ADAMTS están implicadas en el metabolismo tal como la degradación y la maduración de una matriz extracelular (por ejemplo, agregano, colágeno o similar).

30 El fallo renal crónico es una enfermedad caracterizada por fibrosis mesangial y glomerulosclerosis. Se considera que un cambio cualitativo y/o aumento cuantitativo de componentes de matriz extracelular son los principales mecanismos de un desarrollo y una progresión del mismo. En un experimento usando un modelo de fallo renal, se mostró que una introducción de gen de decorina (una proteína que suprime específicamente la actividad del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Isaka Y. *et al.*, Nature Med., 2, 418-423, 1996) y una administración de anti-TGF- β (Ziyadeh F.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 8015-8020; Sharma K. *et al.*, Diabetes, 45, 522-530, 1996; y Border W.A. *et al.*, Nature, 346, 371-374, 1990) fueron eficaces. A partir de estos resultados se considera que una supresión o inhibición de las acciones fisiológicas de TGF- β conduce a un tratamiento de fallo renal crónico.

40 Sin embargo, en las actuales circunstancias en las que no se conoce un agente eficaz para tratar el fallo renal crónico, se desea un agente para inhibir el TGF- β pero no ha estado fácilmente disponible hasta ahora.

Descripción de la invención

45 TGF- β es un factor de crecimiento y diferenciación que muestra varias acciones fisiológicas. Por tanto, es peligroso inhibir todas las acciones fisiológicas del TGF- β en un tratamiento de fallo renal crónico en el que se prevé una administración a largo plazo, a la vista de los efectos secundarios. Es preferible suprimir o inhibir solo una parte implicada con un cambio cualitativo y un aumento cuantitativo de componentes de matriz extracelular entre las acciones fisiológicas de TGF- β .

50 El objeto de la presente invención es proporcionar una proteasa novedosa que sea inducida por TGF- β , que esté implicada en el metabolismo de la matriz extracelular, y que sea útil como una herramienta de selección para detectar un agente para tratar el fallo renal crónico, y un polinucleótido novedoso que codifica para la proteasa.

55 Con el objetivo de solucionar los problemas anteriormente mencionados, los presentes inventores han realizado estudios intensivos y como resultado encontraron un polinucleótido que codifica para una proteasa novedosa que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y que consiste en 1224 residuos de aminoácidos de ADNc de riñón fetal humano. Además, los presentes inventores encontraron que un fragmento parcial que consiste en 750 residuos de aminoácidos en el lado del extremo N-terminal de la proteasa novedosa tiene una actividad proteasa eficaz. Además, se encontró que (1) la proteasa se clasifica dentro de las proteasas ADAMTS, y por tanto debe considerarse como una proteasa implicada en el metabolismo de matriz extracelular, (2) la proteasa se expresa actualmente en el riñón humano, (3) una expresión de la misma se induce por TGF- β en una célula cultivada primaria de riñón, y (4) una cantidad del gen expresado de la misma aumenta en un animal con modelo de fallo renal. A partir de estos hallazgos, los presentes inventores revelaron que la proteasa de la presente invención es un polipéptido causante de fallo renal, y eso mediante selección usando el polipéptido de la presente invención, puede seleccionarse una sustancia que inhibe la actividad proteasa de la misma, 65 una sustancia que suprime o inhibe sólo una parte implicada con un cambio cualitativo y un aumento cuantitativo de componentes de matriz extracelular entre las acciones fisiológicas de TGF- β y que es útil como un agente para tratar el fallo renal crónico, puede seleccionarse, y se completa la presente invención.

ES 2 280 306 T3

Por consiguiente, la presente invención se refiere a:

[1] un polipéptido que muestra una actividad proteasa y que comprende (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, (2) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o (3) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2;

[2] un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra actividad proteasa;

[3] un polipéptido que muestra actividad proteasa y que consiste en (1) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o (2) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2;

[6] un polipéptido que consiste en (1) los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2, o (2) los aminoácidos 1° a 1224° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2;

[7] un polinucleótido que codifica para el polipéptido de los puntos [1] a [6];

[8] un vector de expresión que comprende el polinucleótido del punto [7];

[9] una célula transfectada con el vector de expresión del punto [8];

[10] un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une al polipéptido de los puntos [1] a [6];

[11] un procedimiento para producir el polipéptido de los puntos [1] a [6], que comprende las etapas de:

cultivar la célula del punto [9], y

recuperar el polipéptido de los puntos [1] a [6];

[12] un método para detectar si un compuesto que debe someterse a prueba inhibe o no la actividad proteasa del polipéptido de los puntos [1] a [6], que comprende las etapas de:

poner en contacto (1) el polipéptido, (2) α_2 -macroglobulina, y (3) el compuesto que debe someterse a prueba, y

analizar si el polipéptido y la α_2 -macroglobulina forman o no un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor;

[13] un método para seleccionar una sustancia que inhiba la actividad proteasa del polipéptido de los puntos [1] a [6], que comprende las etapas de:

detectar mediante el método del punto [12], y

seleccionar una sustancia que inhiba la actividad proteasa;

[14] un método para seleccionar una sustancia para tratar el fallo crónico mediante el método del punto [13].

El término "actividad proteasa" tal como se usa en el presente documento significa una propiedad en que puede formarse un complejo, que no se disocia por dodecilsulfato de sodio (SDS) y/o un agente reductor, con α_2 -macroglobulina, una proteína inhibidora de proteasa presente en un suero.

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se explicará con detalle a continuación en el presente documento.

[1] *El polipéptido de la presente invención*

El polipéptido de la presente invención incluye

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2;

ES 2 280 306 T3

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestran la actividad proteasa (denominada en lo sucesivo en el presente documento variación funcionalmente equivalente); y

(3) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa (denominado en lo sucesivo en el presente documento polipéptido homólogo).

El “polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2” como el polipéptido de la presente invención no está limitado, siempre que sea un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa. Incluye, por ejemplo,

(1a) un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2;

(1b) un polipéptido de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se añade una secuencia marcadora apropiada o similar al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa;

(1c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se añade una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 751° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan de 1 a 473 aminoácidos del extremo C-terminal de la misma, al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 (es decir, el aminoácido del extremo C-terminal es cualquiera de los aminoácidos 751° a 1224°; denominada en lo sucesivo en el presente documento “la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o una secuencia con eliminación en el extremo C-terminal de la misma”);

(1d) un polipéptido de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se añade una secuencia marcadora apropiada o similar al extremo N-terminal y/o extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o la secuencia con eliminación en el extremo C-terminal de la misma, y que muestra actividad proteasa; y similares.

Un método para confirmar si un polipéptido que debe someterse a prueba (denominado en lo sucesivo en el presente documento polipéptido prueba) “muestra o no la actividad proteasa” tal como se usa en el presente documento (denominado en lo sucesivo en ocasiones en el presente documento “método para confirmar la actividad proteasa”) no está particularmente limitado, siempre y cuando pueda confirmarse si el polipéptido de prueba muestra o no “una propiedad en la que puede formarse un complejo, que no se disocia por SDS y/o un agente reductor, con α_2 -macroglobulina, una proteína inhibidora de proteasa presente en un suero”. Puede confirmarse, por ejemplo, poniendo el polipéptido de prueba en contacto con α_2 -macroglobulina, una proteína inhibidora de proteasa presente en un suero, y analizando después si se forma o no un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor [tal como 2-mercaptoetanol (2-ME)], más particularmente por un método descrito en el ejemplo 4.

Se sabe que la α_2 -macroglobulina es una proteína inhibidora de proteasa presente en un suero y que puede formar un complejo con varias proteasas. Se sabe que la formación del complejo depende de la actividad proteasa, y que el complejo formado se forma mediante un enlace amida de proteasa y α_2 -macroglobulina, y por tanto no se disocia por SDS o un agente reductor tal como 2-ME (Feinman R.D. *et al.*, Ann. New York Acad. Sci., 737, 254-266, 1994; y Kuno K. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 18821-18826, 1999).

El polipéptido anterior (1a), es decir, “el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2” es una proteasa novedosa que consiste en 750 residuos de aminoácidos y muestra la actividad proteasa. El polipéptido (1a) corresponde a un polipéptido parcial “del polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2”.

Como secuencia marcadora en el polipéptido de la presente invención, puede usarse, por ejemplo, una secuencia para realizar fácilmente una confirmación de la expresión de polipéptido, confirmación de la localización intracelular del mismo, purificación del mismo, o similares. Como secuencia, pueden mencionarse, por ejemplo, el marcador FLAG, el marcador hexa-histidina, el marcador hemaglutinina, el epítipo myc, o similares.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5 (por ejemplo, de uno a varios aminoácidos) en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa. Además, un origen de la variación funcionalmente equivalente no se limita a los seres humanos.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención incluye, por ejemplo, variaciones humanas del polipéptido que consisten en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y varia-

ES 2 280 306 T3

ciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos a los seres humanos (tales como ratón, rata, hámster o perro), y se preparan polipéptidos adicionales usando polinucleótidos obtenidos mediante modificación artificial de polinucleótidos que codifican para estos polipéptidos nativos (es decir, variaciones humanas o variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos al ser humano) o polinucleótidos que codifican para el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 mediante técnicas de ingeniería genética. El término “variación” tal como se usa en el presente documento, significa diferencias individuales entre los mismos polipéptidos en la misma especie o diferencias entre polipéptidos homólogos en varias especies.

Pueden obtenerse variaciones humanas del polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o variaciones funcionalmente equivalentes derivadas de organismos distintos al ser humano por los expertos en la técnica según la información de una secuencia de bases (por ejemplo, la secuencia de bases de SEQ ID No: 1) de un polinucleótido que codifica para el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2. Con respecto a esto, generalmente pueden realizarse técnicas de ingeniería genética según métodos conocidos (por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, “Molecular Cloning-A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989).

Por ejemplo, se diseñan una sonda apropiada o unos cebadores apropiados según la información de una secuencia de bases de un polinucleótido que codifica para el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2. Se lleva a cabo un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R. K. *et al.*, Science, 239, 487-491, 1988) o un método de hibridación usando una muestra (por ejemplo ARN total o una fracción de ARNm, una biblioteca ADNc, o una biblioteca fago) preparada a partir de un organismo (por ejemplo un mamífero tal como un ser humano, ratón, rata, hámster o perro) de interés y los cebadores o la sonda para obtener un polinucleótido que codifica para el polipéptido. Puede obtenerse un polipéptido deseado expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado y confirmando que el polipéptido expresado muestra la actividad proteasa mediante, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 4.

Además, puede obtenerse el polipéptido modificado artificialmente por técnicas de ingeniería genética mediante, por ejemplo, el siguiente procedimiento. Puede obtenerse un gen que codifica para el polipéptido mediante un método convencional, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Mark, D.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5662-5666, 1984). Puede obtenerse un polipéptido deseado expresando el polinucleótido resultante en un sistema de expresión apropiado y confirmando que el polipéptido expresado muestra la actividad proteasa mediante, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 4.

La variación funcionalmente equivalente de la presente invención incluye, por ejemplo,

(2a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa;

(2b) un polipéptido de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y se añade una secuencia marcadora apropiada, o similar, al extremo N-terminal y/o extremo C-terminal de la misma, y que muestra actividad proteasa;

(2c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y al extremo C-terminal de la misma se añade una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 751° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 o una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan de 1 a 473 aminoácidos del extremo C-terminal de la misma, y que muestra actividad proteasa; y

(2d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y al extremo C-terminal de la misma se añade una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 751° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan de 1 a 473 aminoácidos del extremo C-terminal de la misma, y además se añade una secuencia marcadora apropiada o similar al extremo N-terminal y/o extremo C-terminal de la misma, y que muestra actividad proteasa.

Tal como anteriormente, se explica el polipéptido de la presente invención, pero se prefiere como polipéptido de la presente invención “el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2”, “el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2”, “un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5) en total en una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra actividad proteasa” o “un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o añaden de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5) en total en una o varias posiciones en la

ES 2 280 306 T3

secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, y que muestra la actividad proteasa”, y más preferiblemente “el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2” o “el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2”.

5

[2] *El polinucleótido de la presente invención*

El polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando codifique para el polipéptido de la presente invención. Como polinucleótido de la presente invención, pueden mencionarse, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que consiste en las bases 1^a a 2250^a en la secuencia de bases de SEQ ID No: 1. Lo más preferible es un polinucleótido que consiste en las bases 1^a a 2250^a en la secuencia de bases de SEQ ID No: 1. Con respecto a esto, el término “polinucleótido” tal como se usa en el presente documento incluye tanto ADN como ARN.

10

Un método para producir el polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado, pero pueden mencionarse por ejemplo, (1) un método que utiliza PCR, (2) un método que utiliza técnicas de ingeniería genética convencionales (es decir, un método para seleccionar un transformante que comprende un ADNc deseado a partir de cepas transformadas con una biblioteca de ADNc), o (3) un método de síntesis química. Estos métodos se explicarán en este orden a continuación en el presente documento.

15

20

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

Se extrae ARNm de tejidos o células humanos que pueden producir el polipéptido de la presente invención. Se sintetizan un par de cebadores, entre los se localiza el ARNm de longitud total correspondiente al polipéptido de la presente invención o una región parcial del ARNm, basándose en la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica para el polinucleótido de la presente invención. Puede obtenerse ADNc de longitud total que codifica para el polipéptido de la presente invención o una parte del ADNc realizando una reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) usando el ARNm extraído como molde.

25

30

Más preferiblemente, se extrae ARN total que contiene ARNm que codifica para el polipéptido de la presente invención mediante un método conocido a partir de células o tejidos que pueden producir el polipéptido de la presente invención. Como método de extracción, pueden mencionarse, por ejemplo, un método de tiocianato de guanidina-fenol caliente, un método de tiocianato de guanidina-clorhidrato de guanidina o un método de tiocianato de guanidina-cloruro de cesio. Se usa preferiblemente el método de tiocianato de guanidina-cloruro de cesio. Pueden identificarse las células o tejido que pueden producir el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, mediante un método de inmunotransferencia tipo northern usando un polinucleótido o una parte del mismo que codifica para el polipéptido de la presente invención o un método de inmunotransferencia tipo western usando un anticuerpo específico para el polipéptido de la presente invención.

35

40

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

45

A continuación, se sintetiza el ADNc de primera cadena llevando a cabo una reacción con transcriptasa inversa del ARNm purificado en presencia de un cebador al azar, un cebador oligodT, y/o un cebador adaptado. Esta síntesis puede llevarse a cabo según un método convencional. El ADNc de primera cadena resultante se somete a PCR usando dos cebadores entre los que se localizan una longitud total o una región parcial del polinucleótido de interés, amplificando de esta manera el ADNc de interés. Se fracciona el ADN resultante mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa. Puede obtenerse el fragmento de ADN de interés llevando a cabo una digestión del ADN con enzimas de restricción y la ligación posterior, si es necesario.

50

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

55

En primer lugar, se sintetiza ADNc de cadena sencilla usando transcriptasa inversa de ARNm preparado mediante el método PCR anteriormente mencionado como molde, y después se sintetiza ADNc de doble cadena a partir del ADNc de cadena sencilla. Como este método, pueden mencionarse, por ejemplo, un método de nucleasa S1 (Efstratiadis, A. *et al.*, Cell, 7, 279-288, 1976), un método Land (Land, H. *et al.*, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981), un método O. Joon Yoo (Yoo, O. J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983), y un método Okayama-Berg (Okayama, H. y Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982).

60

Después se prepara un plásmido recombinante que comprende el ADNc de doble cadena y se introduce en una cepa de *Escherichia coli*, tal como DH 5 α , HB101, o JM109, transformando así la cepa. Se selecciona un transformante usando una resistencia a fármaco frente a, por ejemplo, tetraciclina, ampicilina, o canamicina como marcador. Cuando la célula huésped es *E. coli*, puede realizarse la transformación de la célula huésped, por ejemplo, mediante

65

ES 2 280 306 T3

el método de Hanahan (Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983); concretamente un método en el que el ADN recombinante se añade a células competentes preparadas en presencia de CaCl₂, MgCl₂ o RbCl. Además, como un vector distinto a un plásmido, puede usarse un vector fago tal como un sistema lambda.

5 Como un método para seleccionar un transformante que contiene el ADNc de interés a partir de los transformantes resultantes, pueden usarse varios métodos, tales como (i) un método para seleccionar un transformante usando una sonda de oligonucleótido sintético, (ii) un método para seleccionar un transformante usando una sonda producida por PCR, (iii) un método para seleccionar un transformante usando un anticuerpo frente al polipéptido de la presente invención, o (iv) un método para seleccionar un transformante usando un sistema de traducción por hibridación selectiva.

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

15 Se sintetiza un oligonucleótido que corresponde al total o a una parte del polipéptido de la presente invención (en este caso, puede ser o bien una secuencia de nucleótido teniendo en cuenta el uso del codón o bien una pluralidad de secuencias de nucleótidos como una combinación de posibles secuencias de nucleótidos, y en el último caso, puede reducirse su número incluyendo inosina) y, usando este oligonucleótido como sonda (marcado con ³²P O ³³P), se hibrida con filtro de nitrocelulosa o filtro de poliamida sobre los que se desnaturalizan los ADN de los transformantes y se fijan, para detectar y seleccionar las cepas positivas resultantes.

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

25 Se sintetizan oligonucleótidos de un cebador sentido y un cebador antisentido correspondientes a una parte del polipéptido de la presente invención, y se amplifica un fragmento de ADN que codifica para todo o parte del polipéptido de interés realizando una PCR usando estos cebadores juntos. Como ADN molde usado en este método, puede usarse el ADNc sintetizado mediante reacción de transcripción inversa a partir de ARNm de células que pueden producir el polipéptido de la presente invención, o ADN genómico. El fragmento de ADN resultante está marcado con ³²P O ³³P, y un transformante que contiene el ADNc de interés se selecciona realizando una hibridación de colonias o una hibridación de placa de lisis usando este fragmento como sonda.

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

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

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

45 En primer lugar, se somete el ADNc obtenido de cada transformante a inmunotransferencia sobre, por ejemplo, filtro de nitrocelulosa y se hibrida con ARNm preparado a partir de células que pueden producir el polipéptido de la presente invención, y entonces se disocia y recupera el ARNm unido al ADNc. El ARNm recuperado se traduce para dar un polipéptido en un sistema de traducción de polipéptido apropiado, por ejemplo, inyección en ovocitos de *Xenopus* o un sistema libre de células tal como un lisado de reticulocito de conejo o germen de trigo. Se selecciona un transformante que contiene el ADNc de interés detectándolo con el uso de un anticuerpo frente a polipéptido de la presente invención.

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

En el método de síntesis química del punto (3), puede producirse el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, uniendo fragmentos de ADN producidos mediante un método de síntesis química. Puede sintetizarse cada ADN usando un sintetizador de ADN [por ejemplo, Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman) o 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems)].

Además el polinucleótido de la presente invención puede producirse mediante síntesis química de ácido nucleico según un método convencional tal como un método de triéster de fosfito (Hunkapiller, M. *et al.*, Nature, 10, 105-111, 1984), basado en la información sobre el polipéptido de la presente invención. Con respecto a esto, se conocen codones para cada aminoácido y opcionalmente pueden seleccionarse y determinarse mediante el método convencional, por ejemplo, teniendo en cuenta el uso de codón de cada huésped que debe usarse (Crantham, R. *et al.*, Nucleic Acids

Res., 9, r43-r74, 1981). Además puede realizarse una modificación parcial de los codones de estas secuencias de bases según un método convencional, tal como mutagénesis dirigida al sitio que usa un cebador comprendido por un oligonucleótido sintético que codifica para una modificación deseada (Mark, D.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984).

La determinación de secuencias de ADN obtenidas mediante, por ejemplo, los métodos mencionados anteriormente puede realizarse mediante, por ejemplo, un método de modificación química Maxam-Gilbert (Maxam, A.M. y Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) o un método de terminación en cadena de didesoxinucleótido (Messing, J. y Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982).

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

Se reintegra un polinucleótido aislado de la presente invención en un ADN de vector apropiado y puede transfectarse una célula huésped eucariota o procariota mediante el vector de expresión resultante. Además, puede expresarse el polinucleótido en una célula huésped deseada, introduciendo un promotor apropiado y una secuencia relacionada con la expresión del gen en el vector.

El vector de expresión de la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando comprenda el polinucleótido de la presente invención. Como el vector de expresión, pueden mencionarse, por ejemplo, un vector de expresión obtenido introduciendo el polinucleótido de la presente invención en un vector de expresión conocido seleccionado apropiadamente según una célula huésped que debe usarse.

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

En células huésped eucariotas se incluyen, por ejemplo, células de animales vertebrados, insectos y levaduras. Como célula de animal vertebrado puede mencionarse, por ejemplo, una célula COS de simio (Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981), una cepa carente de dihidrofolato reductasa de una célula de ovario de hámster chino (CHO) (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980), una célula HEK293 derivada de riñón fetal humano, o una célula 293-EBNA (Invitrogen) obtenida introduciendo un gen de EBNA-1 del virus Epstein Barr en una célula HEK293.

Como un vector de expresión de una célula de animal vertebrado, generalmente puede usarse un vector que contiene un promotor ubicado en sentido 5' del gen que debe expresarse, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de transcripción y similares. El vector puede contener adicionalmente un origen de replicación, si es necesario. Como vector de expresión, puede mencionarse, por ejemplo, pSV2dhfr que contiene un promotor temprano SV40 (Subramani, S. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981), pEF-BOS que contiene un promotor de factor de elongación humano (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990), o pCEP4 que contiene un promotor de citomegalovirus (Invitrogen).

Cuando se usa la célula 293-EBNA como la célula huésped, por ejemplo, puede usarse como vector de expresión pCEP4 (Invitrogen) que contiene un origen de replicación del virus Epstein Barr y que puede realizar una replicación autónoma en la célula 293-EBNA.

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

Puede incorporarse el vector de expresión a las células COS mediante, por ejemplo, un método DEAE-dextrano (Luthman, H. y Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983), un método de coprecipitación de fosfato de calcio-ADN (Graham, F. L. y van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973), un método que utiliza un reactivo de transfección disponible comercialmente (por ejemplo, FuGENE™6 Transfection Reagent; Boeringer Mannheim), o un método de electroporación (Neumann, E. *et al.*, EMBO J., 1, 841-845, 1982).

Cuando se usa la célula CHO como célula huésped, puede obtenerse una célula transfectada que puede producir de manera estable el polipéptido de la presente invención realizando cotransfección de un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica para el polipéptido de la presente invención, junto con un vector que puede expresar un gen neo que funciona como un marcador de resistencia G418, tal como pRSVneo (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) o pSV2-neo (Southern, P. J. y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982), y seleccionar una colonia resistente G418.

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

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

Cuando se expresa el polipéptido de la presente invención como una proteína de fusión con una secuencia marcadora en marco, puede realizarse fácilmente la identificación de la expresión del polipéptido de la presente invención, purificación del mismo, o similar. Como secuencia marcadora pueden mencionarse, por ejemplo, una etiqueta TAG, una etiqueta hexa-histidina, una etiqueta hemaglutinina o un epítope myc. Además, puede eliminarse la secuencia marcadora por la proteasa insertando una secuencia de aminoácidos específica reconocida por una proteasa tal como enterocinasa, factor Xa o trombina entre la secuencia marcadora y el polipéptido de la presente invención.

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

Es posible detectar si un compuesto que debe someterse a prueba inhibe o no la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención, usando el polipéptido de la presente invención. Además, usando este método de detección de la presente invención, es posible seleccionar una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención. Se considera que MDTs9 (metaloproteasa y desintegrina con repeticiones de trombospondina tipo-1 9), el polipéptido de la presente invención, es una proteasa ADAMTS a partir de su secuencia, y por tanto que es una proteasa que está implicada en el metabolismo de la matriz extracelular. MDTs9 es una proteína expresada en el riñón, tal como se muestra en los ejemplos 5 y 8, y la proteasa ADAMTS inducida por TGF- β tal como se muestra en el ejemplo 6. Por tanto una sustancia que inhiba la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención es útil como un agente para tratar el fallo renal crónico en la que se prevé una administración a largo plazo, porque es sumamente posible que la sustancia suprima o inhiba sólo una parte que está implicada en un cambio cualitativo y un aumento cuantitativo de los componentes de matriz extracelular, entre las acciones fisiológicas de TGF- β . Además, puede usarse por sí mismo el polipéptido de la presente invención como una herramienta para seleccionar una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar el fallo renal crónico.

Los compuestos que deben someterse a prueba que pueden aplicarse al método de detección o método de selección de la presente invención no están particularmente limitados, pero pueden mencionarse, por ejemplo, diversos compuestos conocidos (incluyendo péptidos) registrados en archivos químicos, compuestos obtenidos mediante técnicas de química combinatoria (Terrett, N.K., *et al.*, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) o técnicas de síntesis convencionales o péptidos aleatorios preparados empleando un método de presentación de fago (Felici, F. *et al.*, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) o similares. Estos compuestos conocidos incluyen compuestos (incluyendo péptidos) que se sabe que muestran una actividad inhibidora de proteasa pero que se desconoce que inhiban la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención. Además, pueden usarse los sobrenadantes de cultivos de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas u organismos marinos o extractos de tejidos animales como compuestos prueba para seleccionar. Además, pueden usarse compuestos (incluyendo péptidos) obtenidos modificando química o biológicamente compuestos (incluyendo péptidos) seleccionados mediante el método de selección de la presente invención.

El método de detección de la presente invención comprende las etapas de:

poner en contacto (1) el polipéptido de la presente invención, (2) α_2 -macroglobulina y (3) un compuesto que debe someterse a prueba, y

analizar si el polipéptido de la presente invención y la α_2 -macroglobulina forman o no un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor (tal como 2-ME).

Puede llevarse a cabo el método de detección de la presente invención mediante un método similar al mencionado anteriormente para confirmar la actividad proteasa, excepto que el polipéptido de la presente invención, la α_2 -macroglobulina y el compuesto prueba se ponen en contacto los unos con los otros en lugar de poner en contacto el polipéptido prueba con α_2 -macroglobulina. Concretamente, en el método de detección de la presente invención, se detecta si el compuesto prueba inhibe o no la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención poniendo en contacto el polipéptido de la presente invención, la α_2 -macroglobulina, y el polipéptido prueba, y después analizando

si el polipéptido de la presente invención y la α_2 -macroglobulina forman o no un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor (tal como 2-ME) en presencia del compuesto prueba. Cuando el polipéptido de la presente invención y la α_2 -macroglobulina no forman un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor (tal como 2-ME) en presencia del compuesto prueba, o disminuye el grado de formación, es posible confirmar que el compuesto prueba inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención.

En el método de selección de la presente invención, se selecciona una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar el fallo renal crónico, basándose en los resultados obtenidos detectando si el compuesto prueba inhibe o no la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención usando el método de detección de la presente invención. Más particularmente, por ejemplo, cuando se ponen en contacto el polipéptido de la presente invención, la α_2 -macroglobulina y el compuesto prueba los unos con los otros, puede seleccionarse una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención para tratar el fallo renal crónico basándose en la presencia o grado de formación del complejo del polipéptido de la presente invención y la α_2 -macroglobulina en presencia de compuesto prueba. Cuando el polipéptido de la presente invención y la α_2 -macroglobulina no forman un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor (tal como 2-ME) en presencia del compuesto prueba, o disminuye el grado de formación, es posible confirmar que el compuesto prueba es una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención o una sustancia para tratar el fallo renal crónico.

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

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

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

El anticuerpo monoclonal puede producirse fácilmente por los expertos en la técnica según, por ejemplo, un método de fusión celular de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975).

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

Como célula de mieloma para obtener un hibridoma, puede usarse una célula de mieloma que tiene un marcador tal como una carencia de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa o timidina cinasa (por ejemplo, línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8.U1). Puede usarse polietilenglicol como agente de fusión. Como medio de preparación de hibridomas, puede usarse, por ejemplo, un medio comúnmente usado tal como un medio esencial mínimo de Eagle, un medio esencial mínimo modificado de Dubelco, o un medio RPMI-1640 añadiendo apropiadamente del 10 al 30% de suero bovino fetal. Pueden seleccionarse las cepas fusionadas mediante un método de selección HAT. Se selecciona un sobrenadante de cultivo de los hibridomas mediante un método bien conocido tal como un método ELISA o un método inmunohistológico, para seleccionar clones de hibridoma que segregan el anticuerpo de interés. Se garantiza la monoclonalidad del hibridoma seleccionado mediante la repetición de la subclonación por un método de dilución limitante. Se producen anticuerpos, en una cantidad que puede purificarse, mediante cultivo de los hibridomas resultantes en un medio durante de 2 a 4 días, o en la cavidad peritoneal de una cepa BALB/c de ratón tratada previamente con pristano durante de 10 a 20 días.

Los anticuerpos monoclonales resultantes en el sobrenadante del cultivo o los ascitis pueden separarse y purificarse por métodos de purificación y aislamiento de polipéptido convencionales. Ejemplos de los métodos de purificación y separación incluyen, por ejemplo, separación centrífuga, diálisis, desalar con sulfato de amonio o una técnica cromatográfica usando celulosa-DEAE, hidroxipatita, agarosa de proteína A y similares.

Además, pueden producirse los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpos que contienen una parte del mismo insertando el total o una parte del gen que codifica para el anticuerpo monoclonal en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión resultante en la célula huésped adecuada (tal como *E. coli*, células animales o levaduras).

ES 2 280 306 T3

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo que comprenden una parte activa del anticuerpo tal como F(ab')₂, Fab, Fab' o Fv mediante un método convencional, por ejemplo, mediante digestión de los anticuerpos separados y purificados (incluyendo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales) con una proteasa tal como pepsina o papaina, y separando y purificando los fragmentos resultantes mediante métodos de purificación y aislamiento de polipéptido habituales.

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

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por, pero no se limita de ninguna manera a, los siguientes ejemplos. Se realizaron los procedimientos según los métodos conocidos (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989), a no ser que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1

Preparación del vector de expresión que tiene FLAG añadido a su extremo C-terminal

Se construye un vector de expresión pCEP4d en el que se ha eliminado la unidad de expresión EBNA1 del virus Epstein-Barr digiriendo el plásmido pCEP4 (fabricado por Invitrogen) con enzimas de restricción ClaI y NsiI, obteniendo extremos romos y después auto ligándose. Se digirió el vector de expresión resultante pCEP4d con enzimas de restricción NheI y BamHI, y se extrajo el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 7,7 kpb del gel de agarosa, al que se insertó el oligonucleótido de doble cadena preparado por apareamiento del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 3 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 4 para construir el vector de expresión pCEP4d-FLAG. Se analizó la secuencia de bases del vector de expresión resultante para confirmar que la secuencia deseada estaba incluida en el mismo.

Se realizó una PCR, usando como molde el vector de expresión pCEP4d-FLAG, el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 5 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 6 como cebadores y ADN polimerasa PyroBest (PyroBest™; fabricado por Takara-shuzo). En la PCR, se realizó una reacción de desnaturalización térmica primero a 94°C durante 2 minutos. Después, se repitió 15 veces una reacción en ciclo compuesta por tratamientos a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos. A continuación, se realizó una reacción de extensión a 72°C durante 7 minutos. Se digirió un fragmento de ADN resultante de aproximadamente 0,4 kpb con una enzima de restricción, SpeI, y se insertó en un vector de expresión pCEP4d-FLAG (de aproximadamente 7,7 kpb) que se había digerido con XbaI para obtener un vector de expresión pCEPdE2-FLAG. En el vector de expresión resultante pCEPdE2-FLAG se ordenaron la secuencia de reconocimiento XbaI, la secuencia de reconocimiento NheI, la secuencia de reconocimiento NotI, la secuencia de reconocimiento BamHI y la etiqueta FLAG desde el promotor hacia el sentido 3' del mismo.

Ejemplo 2

Clonación del gen de ORF de longitud total del gen de proteasa novedosa MDTS9

Se realizó una PCR, usando una combinación de oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 7 (que tiene una secuencia de reconocimiento SpeI y una secuencia Kozak añadida al extremo 5'-terminal) y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 8 (que tiene una secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 5'-terminal) como cebadores, una biblioteca de ADNc de riñón fetal humano (ADNc Marathon-Ready™; fabricado por Clontech) como un molde, y ADN polimerasa (TaKaRa LA Taq™; fabricado por Takara-shuzo) como ADN polimerasa. En la PCR, se realizó en primer lugar una reacción de desnaturalización térmica a 94°C durante 2 minutos. Entonces se repitió 40 veces un ciclo compuesto por tratamientos a 98°C durante 10 segundos, y 68°C durante 2 minutos y 30 segundos. A continuación, se realizó una reacción de extensión a 68°C durante 7 minutos. Se subclonaron en un plásmido PCR2.1 (fabricado por Invitrogen) un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN con aproximadamente 2,2 kpb (que tiene la secuencia de reconocimiento de SpeI y la secuencia Kozak añadida al extremo 5'-terminal y la secuencia de reconocimiento NotI añadida al extremo 3'-terminal) para obtener un clon pMDTS9Cys1.

Se digirió el plásmido resultante pMDTS9Cys1 con enzimas de restricción, SpeI y NotI, y se insertó un fragmento de ADN resultante de aproximadamente 2,2 kpb en el sitio XbaI y NotI del plásmido pCEPdE2-FLAG construido el ejemplo 1 para construir un plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys1-FLAG.

Se realizó una PCR, usando una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 9 (que tiene una secuencia de reconocimiento de SpeI y una secuencia Kozak añadida al extremo 5'-terminal) y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 10 como cebadores, una biblioteca de ADNc de riñón fetal humano (ADNc Marathon-Ready™; fabricado por Clontech) como molde y ADN polimerasa (TaKaRa

ES 2 280 306 T3

LA TaqTM; fabricada por Takara-shuzo) como ADN polimerasa. En la PCR, se realizó en primer lugar una reacción de desnaturalización térmica a 94°C durante 2 minutos. Después se repitió 45 veces un ciclo compuesto por tratamientos a 98°C durante 10 segundos, y 68°C durante 30 segundos. A continuación, se realizó una reacción de extensión a 68°C durante 7 minutos. Se subclonaron en un plásmido PCR2.1 (fabricado por Invitrogen) un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN con aproximadamente 0,2 kpb (que tiene la secuencia de reconocimiento de SpeI y la secuencia Kozak añadida al extremo 5'-terminal y la secuencia de reconocimiento de NotI añadida al extremo 3'-terminal) para obtener un clon pMDTS9(5S2-12).

Se insertaron un fragmento A de ADN de SpeI-NcoI de aproximadamente 0,2 kpb obtenido por digestión del plásmido resultante pMDTS9(5S2-12) con enzimas de restricción SpeI y NcoI, y un fragmento B de ADN de NcoI-NotI de aproximadamente 2,0 kpb obtenido por digestión del plásmido resultante anterior pMDTS9Cys1 con enzimas de restricción NcoI y NotI, en el sitio de XbaI y NotI del pCEPdE2-FLAG construido en el ejemplo 1 para construir un plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG. De manera similar, se insertaron el fragmento A de ADN y el fragmento B de ADN en el sitio de SpeI y NotI de un plásmido pZErO-2 (fabricado por Invitrogen) para construir un plásmido pZErO-MDTS9Cys2.

Se realizó una PCR, usando una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 11 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 12 como cebadores, una biblioteca de ADNc de riñón fetal humano (ADNc Marathon-ReadyTM; fabricado por Clontech) como una molde, y ADN polimerasa (TaKaRa LA TaqTM; fabricado por Takara-shuzo) como ADN polimerasa. En la PCR, se realizó en primer lugar una reacción de desnaturalización térmica a 94°C durante 2 minutos. Después, se repitió 40 veces un ciclo compuesto por tratamientos a 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos y 30 segundos. A continuación, se realizó una reacción de extensión a 68°C durante 7 minutos. Se subclonaron en un plásmido PCR2.1 (fabricado por Invitrogen) un producto de PCR resultante, un fragmento de ADN con aproximadamente 2,1 kpb para obtener un clon pMDTS9-3H.

Se ligó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kpb, generado mediante digestión del plásmido resultante pMDTS9-3H con enzimas de restricción SphI y NotI, en un fragmento de ADN de aproximadamente 9,3 kpb generado mediante digestión del plásmido resultante anterior pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG con enzimas de restricción SphI y NotI para construir un plásmido pCEPdE2-MDTS9Full-FLAG.

El plásmido resultante pCEPdE2-MDTS9Full-FLAG contiene un gen que consiste en las bases 1^a a 3672^a en la secuencia de bases SEQ ID No: 1, es decir, la secuencia de bases del gen de proteasa novedosa MDTS9. Puede expresarse un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos 1^o a 1224^o en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 21 añadida al extremo C-terminal de la misma a partir de una célula animal como un huésped.

Además, el plásmido resultante anterior pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG contiene un gen que consiste en las bases 1^a a 2250^a en la secuencia de bases de SEQ ID No: 1, es decir, la secuencia de bases del gen de la proteasa novedosa MDTS9. Puede expresarse un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos 1^o a 750^o en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 21 añadida al extremo C-terminal de la misma a partir de una célula animal como un huésped. Con respecto a esto, se considera que el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 es una proteasa ADAMTS.

Ejemplo 3

Expresión de la proteína MDTS9 truncada (MDTS9Cys2) y de la proteína MDTS9 de longitud total (MDTS9Full)

Se usó un reactivo de transfección disponible comercialmente (FuGENETM6 Transfection Reagent; fabricado por Boehringer Mannheim) según un protocolo relacionado con el mismo, para introducir el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG o el plásmido pCEPdE2-MDTS9Full-FLAG preparado en el ejemplo 2, o el plásmido pCEPdE2-FLAG preparado en el ejemplo 1 como control, en una célula HEK293-EBNA (fabricada por Invitrogen) cultivada en un medio que contiene suero [DMEM (GIBCO-BRL), suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 µg/ml, estreptomina 100 µg/ml, y G418 250 µg/ml (fabricado por Nakarai Tesque Inc.)].

Tras la introducción del plásmido, se cultivaron células durante 48 horas (denominado en lo sucesivo en el presente documento cultivo con suero). Alternativamente, tras la introducción del plásmido, se cultivaron las células durante 16 horas, se lavaron con PBS dos veces, y se cultivaron en un medio sin suero [DMEM (GIBCO-BRL), penicilina 100 µg/ml, estreptomina 100 µg/ml, y G418 250 µg/ml (fabricado por Nakarai Tesque Inc.)] durante 32 horas (denominado en lo sucesivo en el presente documento cultivo sin suero).

Se centrifugó cada líquido de cultivo obtenido en el cultivo con suero o cultivo sin suero a 3000 rpm durante 10 minutos usando una centrífuga (tipo 8800; fabricada por Kubota Corporation) para obtener un sobrenadante de cultivo. Se trató cada célula restante tras la eliminación del medio de cultivo con una disolución de extracción [HEPES 20 mmol/l (pH 7,4), Tritón X-100 al 1%, glicerol al 1% y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%] durante 15 minutos, y se retiró de una placa de cultivo pipeteando. Se centrifugó la suspensión celular resultante a 3000 rpm durante 10 minutos usando una centrífuga (tipo 8800; fabricada por Kubota Corporation) para separar una fracción unida de membrana celular (sobrenadante) de una fracción celular (sedimento).

ES 2 280 306 T3

Se confirmó la expresión de las proteínas deseadas en las fracciones resultantes (es decir, sobrenadante de cultivo, fracción unida de membrana celular, y fracción celular) mediante inmunotransferencia tipo Western usando un anticuerpo (anticuerpo M2 monoclonal de ratón anti-FLAG; fabricado por Sigma) frente a la etiqueta FLAG añadida al extremo C-terminal. Más particularmente, se sometió cada fracción a electroforesis en un gel SDS/acrilamida al 10%-20% (fabricado por Daiichi Pure Chemicals) en condiciones reductoras usando 2-ME, y se transfirió a una membrana difluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un aparato de inmunotransferencia. Se añadió a la membrana PVDF resultante, un agente bloqueante (Block-ace, fabricado por Dainippon Pharmaceutical) para realizar un bloqueo. Después, se hizo reaccionar los productos sobre la membrana sucesivamente con el anticuerpo M2 monoclonal de ratón anti-FLAG y un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa del rábano (fabricado por Zymed o TAGO). Alternativamente, tras el bloqueo, se hizo reaccionar satisfactoriamente los productos sobre la membrana con un anticuerpo M2 biotinilado (fabricado por Sigma) y una estreptoavidina marcada con peroxidasa del rábano (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech). Tras la reacción, se confirmó una expresión de la proteína deseada mediante un sistema de detección mediante inmunotransferencia tipo Western disponible comercialmente (ECL Western Blotting Detecting System; fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

Un peso molecular aparente en la electroforesis en gel de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) de la proteína detectada (es decir, proteína MDTS9 truncada) en cada fracción obtenida mediante el cultivo sin suero de la célula en la que se introdujo el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG fue de aproximadamente 55 a 65 kDa en el sobrenadante de cultivo, de aproximadamente 55 a 65 kDa en la fracción unida de membrana celular, y de aproximadamente 80 a 95 kDa en la fracción celular.

Además, la proteína detectada (es decir, proteína MDTS9 de longitud total) en cada fracción obtenida mediante cultivo sin suero de la célula en la que se introdujo el plásmido pCEPdE2-MDTS9Full-FLAG, se detectó principalmente en la fracción unida de membrana celular y la fracción celular. Un peso molecular aparente en SDS-PAGE de la misma fue de aproximadamente 130 a 140 kDa en todas las fracciones.

Ejemplo 4

Confirmación de actividad proteasa de proteína MDTS9 truncada

(1) Construcción de plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG

Se usó un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ (fabricado por Stratagene), según un protocolo relacionado con el mismo, para construir un plásmido pZErO-MDTS9Cys2E/Q que contiene un gen MDTS9Cys2E/Q en el que se sustituye Glu (ácido glutámico) en His-Glu-Ser-Gly-His (SEQ ID No: 22) con Gln (glutamina). Se considera que Glu es un centro activo. En esta construcción, se usó el plásmido pZErO-MDTS9Cys2 preparado en el ejemplo 2 como molde, y se usaron el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 3 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases SEQ ID No: 14 como conjunto de cebadores.

Se insertó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,3 kpb generado mediante digestión del plásmido resultante pZErO-MDTS9Cys2E/Q con enzimas de restricción SpeI y NotI, dentro del sitio XbaI y NotI del plásmido pCEPdE2-FLAG construido en el ejemplo 1 para obtener el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG.

(2) Confirmación de la actividad proteasa basándose en la formación de complejo con α_2 -macroglobulina

Se sometió a electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones reductoras usando 2-ME cada sobrenadante de cultivo (cultivo con suero) de cada célula transfectada con el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG preparado en el ejemplo 2 o el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG preparado en el ejemplo 4(1), o el plásmido pCEPdE2-FLAG preparado en el ejemplo 1 como control, y se transfirió a una membrana de PVDF, tal como se describe en el ejemplo 3. A la membrana de PVDF resultante, se añadió un agente bloqueante (Block-Ace fabricado por Dainippon Pharmaceutical) para realizar un bloqueo. Entonces, se hicieron reaccionar sucesivamente los productos sobre la membrana con el anticuerpo de cabra anti- α_2 -macroglobulina (fabricado por CEDARLANE) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa del rábano (fabricado por Zymed Laboratories). Tras la reacción, se confirmó una expresión de la proteína deseada mediante un sistema de detección mediante inmunotransferencia de tipo western comercialmente disponible (ECL Western Blotting Detecting System; fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

En el sobrenadante de cultivo (cultivo con suero) de la célula transfectada con el plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG, se detectó una banda de aproximadamente 250 kDa. La banda no se detectó en cada sobrenadante de cultivo (cultivo con suero) de la célula transfectada con plásmido pCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG o el plásmido pCEPdE2-FLAG. Este resultado muestra que la proteína MDTS9 truncada (MDTS9Cys2) formó un complejo con α_2 -macroglobulina, y por tanto se confirmó que la proteína MDTS9 truncada (MDTS9Cys2) tenía una actividad proteasa.

Ejemplo 5

Confirmación de la distribución tisular de la expresión del gen de MDTS9

Se analizó una distribución tisular de la expresión del gen de MDTS9 según los siguientes procedimientos, usando un panel de ADNc comercialmente disponible [Human MTC Panel I ("Panel I de MTC humano") (nº de catálogo

ES 2 280 306 T3

K1420-1), Human MTC Panel II (“Panel II de MTC humano”) (n° de catálogo K1421-1), Human Fetal MTC Panel (“panel de MTC fetal humano”) (n° de catálogo K1425-1), y Human Tumor MTC Panel (“panel de MTC de tumor humano”) (n° de catálogo K1422-1) en Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panel (panel de ADNc de múltiples tejidos) fabricado por Clontech].

5 Más particularmente, se llevó a cabo una PCR usando una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases SEQ ID No: 15 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 16 como cebadores, el panel de ADNc como molde, y ADN polimerasa (TaKaRa KA Taq™; fabricada por Takara-shuzo). En la PCR, se realizó en primer lugar la reacción de desnaturalización térmica a 94°C durante 2 minutos. Entonces, se repitió
10 44 veces un ciclo compuesto por tratamientos a 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 1 minuto y 30 segundos. Se sometió a electroforesis cada líquido de reacción sobre gel de agarosa para detectar un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kpb derivado de ARNm del gen de MDTS9. Como resultado, se reveló que se expresaba ARNm del gen de MDTS9 en un riñón.

15 Ejemplo 6

Introducción de expresión de gen de MDTS9 mediante TGF-β

(1) Preparación de ADNc molde

20 Se sembraron células epiteliales de túbulo proximal humano normal (5×10^5 células; fabricadas por Clonetics) en una placa de 6 pocillos (fabricada por ASAHI TECHNOGLASS CORPORATION), y se cultivaron durante 1 día usando un kit Renal Epithelial Cell Medium (“medio de células epiteliales renales”) (fabricado por Clonetics). Se cambió el medio por medio de células epiteliales renales libre de suero, y se continuó adicionalmente el cultivo
25 durante 1 día. Se cambió el medio por medio de células epiteliales renales libres de suero que contenía 10 ng/ml (concentración final) de TGF-β1 (fabricado por Sigma), y se cultivaron las células durante 24 horas. Con respecto a esto, se cambió el medio de un grupo control por medio de células epiteliales renales libre de suero sin TGF-β1, y se cultivaron las células durante 24 horas.

30 Se preparó un ARN total de cada grupo tratado usando un reactivo de purificación de ARN total disponible comercialmente (ISOGEN; fabricado por Nippon Gene). Se hizo reaccionar el ARN total resultante con ADNasa (fabricada por Nippon Gene) a 37°C durante 90 minutos. Se convirtió el ARN total tratado con ADNasa (0,5 μg) en ADNc mediante el sistema de primera cadena Superscript (para RT-PCR; fabricado por GIBCO-BRL).

35 (2) Determinación cuantitativa de ARNm de MDTS9 mediante PCR cuantitativa

Se llevó a cabo un análisis de un cambio de la expresión en la célula epitelial del tubo proximal humano normal usando el ADNc preparado en el ejemplo 6(1) como molde y un detector de secuencias (Prism 7700 Sequence Detector; fabricado por Applied Biosystems). Se usó una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 17 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 18 como conjunto de cebadores. Se llevó a cabo una PCR, usando un reactivo de PCR disponible comercialmente (reactivo de núcleo SYBR Green PCR; fabricado por Applied Biosystems), llevando a cabo una reacción de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, y repitiendo 40 veces una reacción en ciclo compuesta por tratamientos a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos.

45 Con respecto a esto, para calcular, como patrón interno, una cantidad de β-actina humana expresada, se llevó a cabo una PCR, usando el ADNc anterior como molde y una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 19 y el oligonucleótido que consiste en la SEQ ID No: 20 como conjunto de cebadores en las mismas condiciones. Además, para obtener una curva patrón para calcular una cantidad de ARNm expresado,
50 se llevó a cabo una PCR, usando el ADNc [preparado en el ejemplo 6(1)] a partir de células epiteliales de túbulo proximal humano sin la estimulación mediante TGF-β1 como molde y el conjunto de cebadores anterior (es decir, una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 17 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 18, o una combinación del oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 19 y el oligonucleótido que consiste en la SEQ ID No: 20) en las mismas
55 condiciones. Se mostró una cantidad del ARNm de MDTS9 expresado en cada condición como una razón con respecto a una cantidad de ARNm del gen de β-actina expresado en cada condición para obtener una cantidad del ARNm del gen de MDTS9 con respecto a una cierta cantidad del ARN total. Como resultado, se reveló que TGF-β1 inducía la expresión génica de ARNm del gen de MDTS9 en aproximadamente 8 veces.

60 Ejemplo 7

Cambio de la expresión del gen de MDTS9 en un modelo de fallo renal de ratas

(1) Preparación de ADNc molde

65 Se preparó ADNc a partir de un riñón de un modelo de nefrectomía 5/6 de rata [Kenjuro Kimura, “jin to toseki (kidney and dialysis)”, 1991 (sup.), 431-439]. Tras 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 semanas desde la nefrectomía 5/6, se anatómizaron cinco ratas con nefrectomía 5/6 y cinco ratas con operación fingida para extirpar los riñones. Se congelaron

ES 2 280 306 T3

inmediatamente los riñones y se mantuvieron a -80°C . Se trituraron los riñones derivados de cada grupo usando un triturador celular (CRYO-PRESS CP-100; fabricado por Microtec Nition) mientras estaban congelados con nitrógeno líquido, y luego se preparó un ARN total usando un reactivo de purificación de ARN total (ISOGEN; fabricado por Nippon Gene). Se hizo reaccionar el ARN total extraído con ADNasa (fabricado por Nippon Gene) a 37°C durante 90 minutos. Se convirtió el ARN total tratado con ADNasa ($0,25\ \mu\text{g}$) en ADNc mediante un sistema de primera cadena Superscript (para RT-PCR; fabricado por GIBCO-BRL).

(2) Determinación cuantitativa de ARNm de contraparte de MDTS9 de rata mediante PCR cuantitativa

Se llevó a cabo un análisis de un cambio de la expresión en un modelo de fallo renal de rata usando el ADNc preparado en el ejemplo 7(1) como molde y un detector de secuencias (Prism 7700 Sequence Detector; fabricado por Applied Biosystems). Se usaron el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 23 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 24 como conjunto de cebadores. Se llevó a cabo una PCR, usando un reactivo de PCR disponible comercialmente (reactivo de núcleo SYBR Green PCR; fabricado por Applied Biosystems), llevando a cabo una reacción de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, y repitiendo 45 veces una reacción en ciclo compuesta por tratamientos a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos.

Para calcular, como patrón interno, una cantidad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) humana expresada, se llevó a cabo una PCR, usando el ADNc anterior como molde y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 25 y el oligonucleótido que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID No: 26 como conjunto de cebadores en las mismas condiciones. Además, para obtener una curva patrón para calcular una cantidad de ARNm expresado, se llevó a cabo una PCR, usando el ADN genómico de rata (fabricado por Clontech) y el conjunto de cebadores anterior en las mismas condiciones. Se mostró una cantidad del ARNm de gen de MDTS9 expresado en cada condición como una razón con respecto a una cantidad de ARNm del gen de G3PDH expresado en cada condición para comparar una cantidad del ARNm del gen de MDTS9 de rata con respecto a una cierta cantidad del ARN total en cada grupo. Como resultado, se encontró que el ARN, del gen de MDTS9 de rata se expresaba en la rata con nefrectomía $5/6$ aproximadamente 5 veces comparado con la rata con operación fingida tras 1 semana desde la operación, y que se expresaba aproximadamente 2 veces tras 3 semanas (una cantidad de proteínas en la orina remarcablemente aumentada), 6 semanas (el peso del riñón comenzó a aumentar comparado con el peso del riñón normal), y 8 semanas (se agravaron los síntomas) desde la operación.

A partir de este ejemplo se reveló que se induce una expresión del gen de MDTS9 en el modelo de fallo renal.

Ejemplo 8

Tinción inmunohistoquímica de la sección de tejido renal

(1) Preparación de anticuerpo anti-MDTS9 humano

Se preparó una proteína de fusión (GST-MDTS9A) de un péptido que consiste en los aminoácidos 280° a 410° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y glutatión S-transferasa (GST), usando un plásmido pGEX-6P-1 (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como un vector de expresión y *E. coli*, en una fracción de cuerpo de inclusión, según un manual de laboratorio [Masato Okada y Maoru Miyazakim, "Kaitei, Tanpakushitsu Jikken Noto, Jyo (revision, notebook for protein experiments)", Yodo-sha, págs. 162-179]. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) preparativa usando la fracción de cuerpo de inclusión, y luego se extrajo la proteína GST-MDTS9 deseada del gel mediante un método de difusión [Masato Okada y Kaoru Miyakazi, "Kaitei, Tanpakushitsu Jikken Noto, Ge (revision, notebook for protein experiments)", Yodo-sha, págs.48-51].

Se inmunizó un conejo (blanco japonés) mediante la proteína GST-MDTS9A resultante 5 veces en total con un intervalo de 10 a 14 días para obtener antisuero. Se purificó una fracción de IgG del antisuero mediante cromatografía de afinidad usando una columna de Sepharose FF de proteína G (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech). Entonces, se purificó un anticuerpo anti-MDTS9 humano a partir de la fracción de IgG mediante cromatografía de afinidad usando una columna (columna MBP-MDTS9A) en la que se inmovilizaron una proteína de fusión (MBP-MDTS9A) de un péptido que consiste en los aminoácidos 280° a 410° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y proteína de unión a la manosa (MBP). La purificación por afinidad mediante la columna de Sepharose FF de proteína G, inmovilización de MBP-MDTS9A a una columna de Sepharose FF activada con CNBr (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech), y la purificación por afinidad mediante columna de MBP-MDTS9A se llevaron a cabo según protocolos relacionados con las mismas. Además, se llevó a cabo una preparación de MBP-MDTS9A en *E. coli* y purificación de la misma usando pMALc2E (fabricado por New England Biolabs) como vector de expresión según unas instrucciones "pMAL protein fusion and purification system" publicadas por la misma.

(2) Detección de proteína MDTS9 en riñón humano

Se hizo reaccionar el anticuerpo anti-MDTS9 humano preparado en el ejemplo 8(1) con una sección de tejido que se había fijado mediante formalina e incrustado en parafina sobre un portaobjetos. Entonces, se tiñó la sección de tejido usando un kit de tinción disponible comercialmente (kit VECTORSTAIN ABC-AP, n° de catálogo AK-5000; fabricado por VECTOR LABORATORIES) según un protocolo relacionado con el mismo. En este procedimiento, se

ES 2 280 306 T3

usaron un anticuerpo anti-conejo marcado con biotina (n° de catálogo BA-1000; fabricado por Vector) como segundo anticuerpo y un kit I de sustrato de fosfatasa alcalina (n° de catálogo SK-5100; fabricado por Vector) como sustrato de revelado de color. Como resultado, se observó tinción en células epiteliales (particularmente podocitos) de riñones de una persona sana y un paciente que padece nefropatía diabética (fase temprana o fase tardía).

5 Resulta claro a partir de este ejemplo que la proteína MDTS9 se expresa en el riñón humano.

Aplicabilidad industrial

10 El polipéptido de la presente invención es una proteasa novedosa, que se expresa en un riñón, inducida por TGF- β e implicada con un metabolismo en una matriz extracelular. Por tanto, una sustancia que inhibe la actividad proteasa del polipéptido de la presente invención es útil como agente para tratar el fallo renal crónico en la que se prevé una administración a largo plazo, dado que es sumamente posible que la sustancia suprima o inhiba únicamente una parte que está implicada con un cambio cualitativo y un aumento cuantitativo de componentes de matriz extracelular, entre
15 las acciones fisiológicas de TGF- β . Esto es, según el polipéptido de la presente invención, un sistema de selección conveniente para detectar un agente para tratar el fallo renal crónico. Además, el polinucleótido, el vector de expresión, la célula y el anticuerpo de la presente invención son útiles para producir el polipéptido de la presente invención.

Texto libre en la lista de secuencias

20 Las características de la "secuencia artificial" se describen en el identificador numérico <223> en la lista de secuencias. Más particularmente, cada una de las secuencias de bases de SEQ ID Nos: 3 y 4 es una secuencia ligadora sintetizada artificialmente. Cada una de las secuencias de bases de SEQ ID Nos: 5-9 y 12-14 son una secuencia de cebador sintetizada artificialmente. La secuencia de bases de SEQ ID No: 21 es una secuencia de aminoácidos obtenida
25 mediante expresión de ADN que contiene una secuencia de nucleótido de reconocimiento de enzima de restricción NotI y una secuencia de nucleótido que codifica para una secuencia de aminoácidos de etiqueta FLAG.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 280 306 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que muestra una actividad proteasa y que comprende (1) la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, (2) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o (3) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácido de SEQ ID No: 2.
- 15 3. Polipéptido según la reivindicación 1, que consiste en (1) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o (2) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen y/o insertan de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2.
- 20 4. El polipéptido de la reivindicación 1, que consiste en (1) aminoácidos 1° a 750° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, o (2) aminoácidos 1° a 1224° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2.
- 25 5. Un polinucleótido que codifica el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5.
7. Una célula transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 6.
- 30 8. Un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une al polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Un procedimiento para producir el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- 35 cultivar la célula según la reivindicación 7, y
recuperar el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 10. Un método para detectar si un compuesto que debe someterse a prueba inhibe o no la actividad proteasa del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- poner en contacto (1) dicho polipéptido, (2) α_2 -macroglobulina, y (3) dicho compuesto que debe someterse a prueba, y analizar si dicho polipéptido y α_2 -macroglobulina forman o no un complejo que no se disocia por SDS y/o un agente reductor.
- 45 11. El método según la reivindicación 10, que comprende además la etapa de:
- seleccionar una sustancia que inhiba la actividad proteasa.
- 50 12. El método para seleccionar una sustancia para tratar el fallo renal crónico mediante el método según la reivindicación 11.
- 55
- 60
- 65

ES 2 280 306 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.	
5	<120> Proteasa novedosa	
	<130> YO132PCT-664	
10	<150> JP 2000-393372	
	<151> 25-12-2000	
	<160> 26	
15	<210> 1	
	<211> 3675	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (1)..(3675)	
	<400> 1	
30	atg aag ccc cgc gcg cgc gga tgg cgg ggc ttg gcg gcg ctg tgg atg 48	
	Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met	
	1 5 10 15	
35	ctg ttg gcg cag gtg gcc gag cag gca cct gcg tgc gcc atg gga ccc 96	
	Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro	
	20 25 30	
40	gca gcg gca gcg cct ggg agc ccg agc gtc ccg cgt cct cct cca ccc 144	
	Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro	
	35 40 45	
45	gcg gag cgg ccg gcc tgg atg gaa aag gcc gaa tat gac ctg gtc tct 192	
	Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser	
	50 55 60	
50	gcc tac gag gtt gac cac agg gcc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg 240	
	Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met	
	65 70 75 80	
55	cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct 288	
	His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser	
	85 90 95	
60		
65		

ES 2 280 306 T3

5 ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc tcc agg cac gac ttc cac gtg gat ctg 336
 Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu
 100 105 110

10 agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg 384
 Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu
 115 120 125

15 gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc 432
 Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe
 130 135 140

20 tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc 480
 Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala
 145 150 155 160

25 ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca 528
 Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala
 165 170 175

30 gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc 576
 Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly
 180 185 190

35 aga gct gcc caa ggc agc tcg cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc 624
 Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser
 195 200 205

40 aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg 672
 Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg
 210 215 220

45 aca tgg gag ctg gca cat caa ccc ctg cac agc agc gac ctt cgc ctg 720
 Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu
 225 230 235 240

50 gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg 768
 Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met
 245 250 255

55 ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag 816
 Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys
 260 265 270

60 tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ctt ctg agg tcc cat aga aat gaa 864

65

ES 2 280 306 T3

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

ES 2 280 306 T3

5 cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc agc cgc cag tat cta cac 1440
 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His
 465 470 475 480

10 aaa ttt cta agc acc gct caa gct atc tgc ctt gct gat cag cca aag 1488
 Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys
 485 490 495

15 cct gtg aag gaa tac aag tat cct gag aaa ttg cca gga gaa tta tat 1536
 Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr
 500 505 510

20 gat gca aac aca cag tgc aag tgg cag ttc gga gag aaa gcc aag ctc 1584
 Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu
 515 520 525

25 tgc atg ctg gac ttt aaa aag gac atc tgt aaa gcc ctg tgg tgc cat 1632
 Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His
 530 535 540

30 cgt att gga agg aaa tgt gag act aaa ttt atg cca gca gca gaa ggc 1680
 Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly
 545 550 555 560

35 aca att tgt ggg cat gac atg tgg tgc cgg gga gga cag tgt gtg aaa 1728
 Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys
 565 570 575

40 tat ggt gat gaa ggc ccc aag ccc acc cat ggc cac tgg tgg gac tgg 1776
 Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp
 580 585 590

45 tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc gga ggg gga gta tct cat 1824
 Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His
 595 600 605

50 agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca tgg cat gga ggg aag ttc 1872
 Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe
 610 615 620

55 tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc tgc aac agt cag aaa tgt 1920
 Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys
 625 630 635 640

60 ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct cag tgt gcc gag cac aac 1968

65

ES 2 280 306 T3

	Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn	
	645	650
5	agc aga cga ttc aga ggg cgg cac tac aag tgg aag cct tac act caa	2016
	Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln	
	660	665
10	gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac tgt atc gca gaa gga ttt	2064
	Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe	
	675	680
15	gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc aaa gat ggg act cca tgc	2112
	Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys	
	690	695
20	tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat ggg ata tgt gag aga gtt	2160
	Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val	
	705	710
25	gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct gtt gaa gac gtc tgt ggg	2208
	Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly	
	725	730
30	gtg tgt aac ggg aat aac tca gcc tgc acg att cac agg ggt ctc tac	2256
	Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr	
	740	745
35	acc aag cac cac cac acc aac cag tat tat cac atg gtc acc att cct	2304
	Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro	
	755	760
40	tct gga gcc cgg agt atc cgc atc tat gaa atg aac gtc tct acc tcc	2352
	Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser	
	770	775
45	tac att tct gtg cgc aat gcc ctc aga agg tac tac ctg aat ggg cac	2400
	Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His	
	785	790
50	tgg acc gtg gac tgg ccc ggc cgg tac aaa ttt tog ggc act act ttc	2448
	Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe	
	805	810
55	gac tac aga cgg tcc tat aat gag ccc gag aac tta atc gct act gga	2496
	Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly	
	820	825
60		830
65		

ES 2 280 306 T3

5 cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac 2544
 Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn
 835 840 845

10 ccg ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag 2592
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys
 850 855 860

15 cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag 2640
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu
 865 870 875 880

20 tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc 2688
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys
 885 890 895

25 tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag 2736
 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys
 900 905 910

30 aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct 2784
 Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro
 915 920 925

35 ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc 2832
 Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly
 930 935 940

40 ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat 2880
 Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr
 945 950 955 960

45 gac tcg gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc 2928
 Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser
 965 970 975

50 agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc 2976
 Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala
 980 985 990

55 ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag 3024
 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys
 995 1000 1005

60 cgg gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc tcg gcc aga gcg cag ctg 3072

65

ES 2 280 306 T3

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

ES 2 280 306 T3

5 ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc 3648
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys
 1205 1210 1215

10 aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3675
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu
 1220 1225

<210> 2

<211> 1224

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

65

ES 2 280 306 T3

Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met
 245 250 255
 5 Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys
 260 265 270
 Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu
 275 280 285
 10 Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln
 290 295 300
 Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn
 305 310 315 320
 15 Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn
 325 330 335
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu
 20 340 345 350
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp
 355 360 365
 25 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile
 370 375 380
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp
 385 390 395 400
 30 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser
 405 410 415
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala
 420 425 430
 35 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn
 435 440 445
 Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly
 450 455 460
 40 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His
 465 470 475 480
 Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys
 485 490 495
 45 Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr
 500 505 510
 Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu
 515 520 525
 50 Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His
 530 535 540
 Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly
 545 550 555 560
 55 Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys
 565 570 575
 Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp
 580 585 590
 60 Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His
 595 600 605
 65

ES 2 280 306 T3

Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe
 610 615 620
 5 Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys
 625 630 635 640
 Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn
 645 650 655
 10 Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln
 660 665 670
 Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe
 675 680 685
 15 Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys
 690 695 700
 Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val
 705 710 715 720
 Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly
 725 730 735
 20 Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr
 740 745 750
 Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro
 755 760 765
 30 Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser
 770 775 780
 Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His
 785 790 795 800
 35 Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe
 805 810 815
 Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly
 820 825 830
 40 Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn
 835 840 845
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys
 850 855 860
 45 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu
 865 870 875 880
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys
 885 890 895
 50 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys
 900 905 910
 Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro
 915 920 925
 55 Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly
 930 935 940
 Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr
 945 950 955 960
 60 Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser
 965 970 975
 65

ES 2 280 306 T3

Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala
 980 985 990
 5 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys
 995 1000 1005
 Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu
 1010 1015 1020
 10 Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu
 1025 1030 1035 1040
 Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu
 1045 1050 1055
 15 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln
 1060 1065 1070
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg
 1075 1080 1085
 20 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu
 1090 1095 1100
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe
 1105 1110 1115 1120
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser
 1125 1130 1135
 30 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln
 1140 1145 1150
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys
 1155 1160 1165
 35 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu
 1170 1175 1180
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val
 1185 1190 1195 1200
 40 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys
 1205 1210 1215
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu
 45 1220

<210> 3

<211> 50

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia ligadora sintetizada artificialmente

<400> 3

60 ctagecgggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa

50

<210> 4

<211> 50

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 280 306 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia ligadora sintetizada artificialmente	
5	<400> 4	
	gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg	50
10	<210> 5	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
20	<400> 5	
	ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc	34
25	<210> 6	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
35	<400> 6	
	ggactagtgt cgaccggtca tgctgcgc	29
40	<210> 7	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
50	<400> 7	
	ggactagtgc catgggaccc gcagcggcag cgcctggg	38
55	<210> 8	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
65	<400> 8	
	gggcggcgc acccctgtga atcgtgcagg ctgagtatt	40

ES 2 280 306 T3

	<210> 9	
	<211> 41	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 9	
	ggactagtac catgaagccc cgcgcgcgcg gatggcgggg c	41
15	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
25	ccctgtggtc aacctcgtag gcagagacca	30
	<210> 11	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
35	ggcagttcgg agagaaagcc aagctct	27
	<210> 12	
40	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 12	
50	gggcggccgc caagttggac ttagagcaag tcttcagca	40
	<210> 13	
55	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 13	
65	tggccttcac cattgccat cagtctggac acaacttgg c	41

ES 2 280 306 T3

	<i><210></i> 14		
	<i><211></i> 41		
	<i><212></i> ADN		
5	<i><213></i> Secuencia artificial		
	<i><220></i>		
	<i><223></i> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
10	<i><400></i> 14		
	gccaaagtg tgcagact gatgggcaat ggtgaaggcc a		41
15	<i><210></i> 15		
	<i><211></i> 31		
	<i><212></i> ADN		
20	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 15		
25	cacctaagt agctctgcc agtggcagtc t		31
	<i><210></i> 16		
	<i><211></i> 32		
30	<i><212></i> ADN		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 16		
35	acaaacatta cggctatcct ccgagcatgg ag		32
	<i><210></i> 17		
40	<i><211></i> 23		
	<i><212></i> ADN		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
45	<i><400></i> 17		
	ttctaagcac cgetcaagct atc		23
50	<i><210></i> 18		
	<i><211></i> 22		
	<i><212></i> ADN		
55	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 18		
60	gggcctcat caccatatt ca		22
	<i><210></i> 19		
	<i><211></i> 19		
65	<i><212></i> ADN		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 280 306 T3

<210> 25

<211> 15

<212> ADN

5 <213> *Rattus sp.*

<400> 25

10 aagcaggcgg ccgag

15

<210> 26

<211> 21

15 <212> ADN

<213> *Rattus sp.*

<400> 26

20

atcaaagggtg gaagaatggg a

21

25

30

35

40

45

50

55

60

65