



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 786**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 15/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98950411 .3**

86 Fecha de presentación : **27.10.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1033134**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2000**

54 Título: **Composiciones que inhiben la proliferación de músculo liso y procedimiento para el diagnóstico de arteriosclerosis.**

30 Prioridad: **29.10.1997 JP 9-297569**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **OTSUKA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
9, Kandatsukasa-cho 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0048, JP

72 Inventor/es: **Matsuzawa, Yuji y**
Ohmoto, Yasukazu

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Composiciones que inhiben la proliferación de músculo liso y procedimiento para el diagnóstico de la arteriosclerosis.

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones inhibidoras del crecimiento del músculo liso que comprende apM1 (el transcripto génico 1 más abundante en el tejido adiposo) como ingrediente activo, un procedimiento destinado al diagnóstico de la arteriosclerosis (aterosclerosis) que comprende ensayar dicho apM1 en una muestra. Se utiliza un equipo diagnóstico de la aterosclerosis que comprende un anticuerpo contra dicho apM1 como componente activo.

Antecedentes de la invención

Es bien conocido que, en la sociedad moderna, la obesidad o la excesiva acumulación de grasa corporal está implicada en el desarrollo de la diabetes mellitus, hiperlipidemia, hipertensión y las enfermedades de aterosclerosis que comprenden la angina de pecho y el infarto de miocardio. La fobesidad, no solamente se encuentra asociada a factores genéticos sino también a factores ambientales.

Recientemente, se han aislado las leptinas y muchos otros genes relacionados con la obesidad en modelos animales. Mientras que se sospecha que este grupo de genes se encuentra asociado en el establecimiento de la obesidad en los seres humanos, una multiplicidad de factores ambientales tales como los excesos alimentarios y la falta de ejercicio físico en los seres humanos contemporáneos también tienen un papel crucial en el desarrollo de la diabetes mellitus y la aterosclerosis mediante la acumulación de grasa.

No solamente la búsqueda de genes relacionados con la obesidad sino también la estrategia dirigida al descubrimiento de los genes específicos que se expresan en el tejido adiposo en condiciones de exceso nutritivo y la influencia de tales transcriptos génicos en el individuo parecen ser extraordinariamente significativos en la eliminación de las etiologías de tales enfermedades y el establecimiento de los modos de terapia relevantes.

El objetivo de la presente invención es indagar sobre los genes relacionados con la obesidad y sus productos de expresión que deben ser de utilidad para averiguar la patogénesis de múltiples enfermedades relacionadas a la obesidad, en particular las enfermedades ateroscleróticas tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio, etc., y establecer los modos terapéuticos pertinentes y establecer los procedimientos terapéuticos y diagnósticos de tales enfermedades utilizando dichos genes y sus productos de expresión.

Los inventores han realizado extensos estudios con el fin de alcanzar los objetivos mencionados y han esclarecido anteriormente que la acumulación de grasa, en particular la grasa visceral en la cavidad abdominal, se encuentra próximamente asociada a una anormal tolerancia de la glucosa, hiperlipidemia e hipertensión. Además, mediante el análisis a gran escala de los genes expresados en el tejido adiposo, han descubierto que muchos genes de proteínas secretorias se expresan en el tejido adiposo y que en particular, en la grasa visceral se puede observar la expresión de múltiples genes de sustancias bioactivas. Además de la clonación de tales genes conocidos, los inventores han tenido éxito en clonar el gen apM1 de una proteína semejante a un colágeno específico del tejido adiposo [*Biochem. Biosphys. Res. Commun.*, 221:286-289 (1996)].

Este gen apM1 se descubrió que codifica la proteína secretoria (apM1) que comprende 244 residuos de aminoácido, contiene un motivo de 66 residuos semejante al motivo del colágeno (G-X-Y) y es homólogo con el subcomponente C1q del sistema del complemento y los colágenos X y VII. Sin embargo, la función fisiológica de dicho gen y su producto de expresión apM1 sigue siendo desconocida.

En la investigación siguiente, los inventores han realizado una serie de investigaciones relativas a la expresión de dicho gen apM1 mediante procedimientos de ingeniería genética, preparación de anticuerpos contra el producto de expresión apM1, el establecimiento de un sistema de ensayo de apM1 que utiliza dicho anticuerpo y la relación entre la concentración en sangre de apM1, determinada mediante la utilización de dicho sistema de ensayo, y la distribución de grasa corporal y múltiples enfermedades. La investigación condujo al nuevo descubrimiento, *inter alia*, de que apM tiene una actividad inhibidora del crecimiento del músculo liso y que la concentración en sangre de apM1 refleja fielmente el cambio aterosclerótico.

Además, los investigadores lograron descubrir que apM1 es efectivo en prevenir y tratar la restenosis postangioplastia, tal como la restenosis después de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) utilizando un stent y en la profilaxis y terapia de las enfermedades ateroscleróticas que acompañan las angiopatías, tales como la angina de pecho y el infarto de miocardio. La presente invención se ha desarrollado en base a tales descubrimientos.

Descripción de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición inhibidora del crecimiento de músculo liso que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de por lo menos uno de los componentes seleccionados de entre el grupo que comprende apM1 y sus sales en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición terapéutica y profiláctica destinada al restenosis postangioplastia que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de por lo menos un componente seleccionado de entre el grupo que comprende apM1 y sus sales en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona una composición terapéutica y profiláctica destinada a la aterosclerosis que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de por lo menos un componente seleccionado de entre el grupo que comprende apM1 y sus sales en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona según la presente invención un procedimiento destinado al diagnóstico de la aterosclerosis que comprende cuantificar apM1 en una muestra mediante un anticuerpo anti-apM1 y comparar el valor así encontrado con los valores medidos en sujetos sanos y en pacientes ateroscleróticos.

La composición inhibidora del crecimiento del músculo liso según la presente invención es efectiva, mediante su actividad inhibidora del crecimiento del músculo liso, en la profilaxis y terapia de las enfermedades ateroscleróticas acompañadas de angiopatía, tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio inclusivo de la trombosis, el infarto cerebral, etc. y en la detención del progreso de tales enfermedades ateroscleróticas. De hecho, el apM1 como ingrediente activo de la composición de la presente invención tiene la capacidad de inhibir la expresión las moléculas de adhesión celular que controlan el comienzo de la aterosclerosis, es decir VCAM-1 (molécula-1 de adhesión de las células vasculares), ELAM (molécula de adhesión endotelio leucocito), ICAM-1 (molécula-1 de adhesión intercelular) etc. Es debido a dicha acción que la composición de la presente invención antagoniza el inicio de múltiples enfermedades ateroscleróticas.

En consecuencia, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica destinada a inhibir la expresión de las moléculas de adhesión en las células vasculares endoteliales.

El hecho de que apM1 inhiba la expresión de dichas moléculas de adhesión celular indica que la composición de la presente invención puede ser adecuada en la profilaxis y terapia del asma bronquial que es una enfermedad relacionada con la alergia tipo I que acompaña la infiltración eosinofílica y que también se conoce que es una enfermedad asociada a la expresión incrementada de por ejemplo VCAM-1.

Además, en vista de que se conoce que dicha ICAM-1 y ELAM son moléculas de adhesión relacionadas a la inflamación, la composición de la presente invención que comprende apM1 como ingrediente activo también puede ser indicada como agente antiinflamatorio o fármaco terapéutico para la artritis reumática, por ejemplo, aprovechando dicho efecto inhibidor de la expresión de las moléculas de adhesión.

Además, la composición de la presente invención es efectiva en la prevención y el tratamiento de la restenosis postangioplastia, por ejemplo en los casos de los stents de PTCA. Por consiguiente, en la angina de pecho o el infarto de miocardio, después de una operación destinada a la neovascularización contra la estenosis de la arteria coronaria, la reperfusión postisquémica y la herida de las células vasculares endoteliales evoca la expresión de moléculas de adhesión en las células vasculares endoteliales y la consecuente proliferación de las células de músculo liso que inducen restenosis. La composición de la presente invención inhibe dicha expresión de moléculas de adhesión y el crecimiento de las células de músculo liso contribuyendo en la prevención de la restenosis isquémica después de la angioplastia.

Los procedimientos de diagnóstico de la aterosclerosis según la presente invención utilizan un nuevo marcador, que es la potencia de crecimiento de músculo liso (la capacidad de síntesis de ADN de las células músculo liso). El procedimiento de diagnóstico de la presente invención se realiza mediante la determinación y la cuantificación de los niveles de apM1 en una muestra utilizando un anticuerpo específico contra apM1.

A continuación se describen en secuencia la producción de apM1 para ser utilizada como ingrediente activo en la composición de la presente invención, la preparación de la composición que utiliza apM1 como ingrediente activo, la producción de un anticuerpo contra apM1 y el ensayo de apM1.

En la presente memoria, la designación de aminoácidos, péptidos, secuencias de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos etc., mediante abreviaturas está en conformidad con las reglas de nomenclatura recomendadas por la IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, [Eur. J. Biochem., 138:9 (1984)], "The Guidelines for Drafting of Specifications etc. Containing Nucleotide Sequences or Amino Acid Sequence Information" (Editado por la "Japanese Patent Office", Junio, 1998) y las convenciones en el campo técnico relevante.

ApM1 se puede proporcionar en forma de proteína recombinante mediante procedimientos de ingeniería genética establecidos [p.ej., *Science*, 224: 1431 (1984); *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 130:692 (1985); *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80:5990 (1983)]. En este caso, como gen apM1, se puede utilizar el gen que los presentes inventores establecieron previamente [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221:286-289 (1996)].

Como alternativa, apM1 se puede producir mediante el procedimiento convencional de síntesis química de acuerdo con la información de secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen.

Más particularmente, la producción de apM1 mediante procedimientos de ingeniería genética comprende construir un ADN recombinante con el que se puede expresar el gen codificante de la proteína objetivo en una célula huésped, introduciendo el ADN en la célula huésped con el fin de obtener un transformante y cultivando el transformante.

Como la célula huésped anteriormente mencionada, se pueden utilizar células derivadas de los eucariotas y procariontes. Las células eucariotas comprenden células de vertebrados y células de microorganismos eucariotas. Como células de vertebrados, se utiliza frecuentemente la línea celular COS [Cell, 23:175 (1981)], la línea celular de ovario de hámster Chino y la correspondiente línea celular deficiente en dihidrofolato reductasa [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77:4216 (1980)] y semejantes, aunque éstas no son selecciones exclusivas.

Como vector de expresión de origen vertebrado, se puede utilizar en general un vector provisto de una secuencia promotora localizada corriente arriba del gen que se debe expresar, lugar de corte de ARN (precursor), lugar de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción. Cuando sea necesario, el vector puede tener un origen de replicación. Como ejemplo de tal vector de expresión se puede mencionar pSV2dhfr que comprende un promotor temprano de SV40 [Mol. Cell Biol. 1:854 (1981)].

Como microorganismo eucariótico, generalmente se utilizan las levaduras y entre éstas, se pueden utilizar con ventaja las levaduras del género *Saccharomyces*. Como vector de expresión derivado de microorganismos eucarióticos tales como las levaduras, se puede utilizar, entre otros, pAM82 que comprende un promotor del gen de la fosfatasa ácida [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80:1 (1983)].

Como huésped procariótico, generalmente se utilizan más frecuentemente *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Cuando se utilizan tales huéspedes, es ventajoso seleccionar un vector de plásmido que se pueda replicar en el microorganismo huésped y con el fin de que se exprese el gen objetivo en el vector, utilizar un plásmido de expresión provisto de una región promotora y una secuencia SD (Shine-Dalgarno) corriente arriba del gen y, además, de un codón de iniciación (p.ej., ATG) necesario para el inicio de la síntesis de proteínas. Como huésped *Escherichia coli*, se utiliza generalmente *E. coli* K12 y como vector, pBR322 o sus productos de modificación. Sin embargo, estas no son selecciones exclusivas y se pueden utilizar las múltiples cepas de bacterias y vectores. Los ejemplos de promotores que se pueden utilizar son el promotor del triptófano (trp), el promotor 1pp, el promotor lac y el promotor PL/PR.

La introducción del ADN recombinante resultante en la célula huésped con el fin de transformarla se puede realizar de forma rutinaria.

El transformante obtenido se puede cultivar mediante procedimientos convencionales, mediante los cuales se expresa la proteína recombinante objeto, produce y acumula o secreta intracelularmente, extracelularmente o en la membrana del huésped. El medio de cultivo se puede seleccionar adecuadamente de entre múltiples medios de utilización rutinaria, de acuerdo con la célula huésped seleccionada. El cultivo del transformante se puede realizar en condiciones adecuadas para la célula huésped en particular.

Cuando sea necesario, la apM1 obtenida del modo anteriormente descrito se puede aislar y purificar mediante múltiples procedimientos de separación que utilizan las características físicas, químicas y otras de la misma [Biochemical Data Book II, 1175-1259, Primera Edición, 1ª impresión, Junio 23, 1980, publicado por Tokio Kagaku Dojin, K.K.; Biochemistry, 25(25):8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163:313 (1987), etc.]. Mas particularmente, dicho aislamiento y purificación se pueden lograr mediante el tratamiento de reconstitución convencional, tratamiento mediante un agente precipitante de las proteínas (salado), centrifugación, procedimiento de choque osmótico, sonicación, ultrafiltración, múltiples tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de filtrado molecular (filtración por gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alto rendimiento, (HPLC), etc., diálisis, etc, utilizadas por sí solas o en combinación.

Por el contrario, la apM1 anteriormente mencionada se puede producir también mediante el procedimiento general de síntesis química con base en la información de la secuencia de aminoácidos. El procedimiento comprende los procedimientos convencionales de síntesis de péptidos en fase líquida y en fase sólida. Más detalladamente, cada uno de tales procedimientos comprende el denominado procedimiento de elongación en etapas, que comprende condensar los aminoácidos componentes, uno tras otro con el fin de extender la cadena según la información de secuencia de aminoácidos y el procedimiento de condensación de fragmentos que comprende sintetizar primero fragmentos de péptidos cada uno de los cuales comprende múltiples residuos de aminoácidos y acoplarlos uno tras otro según dicha información.

La reacción de condensación que se debe utilizar en el procedimiento anteriormente descrito de síntesis de péptidos se puede realizar también de modo convencional. Por ejemplo, el procedimiento que se puede realizar comprende el procedimiento de azida, el procedimiento de anhídrido mixto, el procedimiento DCC, el procedimiento de éster activado, el procedimiento redox, el procedimiento DPPA (difenílforil azida). El procedimiento de aditivos DCC+ (p.ej., 1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinimida o N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida) y el procedimiento de Woodward, entre otros.

El disolvente que se puede utilizar en tales procedimientos también se puede seleccionar adecuadamente de entre los disolventes que son bien conocidos por su utilización en las reacciones de condensación para la generación de pép-

tidos. Como ejemplos específicos, se pueden mencionar la N,N-dimetilformamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO), exafosforamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, etc., que incluye la mezcla de los mismos.

Con el fin de realizar las reacciones de síntesis de péptidos, los grupos carboxílicos de los aminoácidos o péptidos que no están implicados en las reacciones respectivas se pueden proteger generalmente mediante la esterificación, p.ej., en forma de un éster de alquilo inferior, p. eje., metil éster, etil éster o ter-butil éster, o un arilalquil éster, p. ej., bencil éster, p-metoxibencil éster o p-nitrobencil éster.

Los aminoácidos que comprenden un grupo funcional en la cadena lateral, por ejemplo el grupo hidroxilo de un residuo de tirosina, se pueden proteger con acetilo, bencilo, benciloxycarbonilo, ter-butilo o semejantes, aunque tales protecciones no son necesariamente indispensables.

Además, el grupo guanidino de los residuos de arginina, por ejemplo, se puede proteger con un grupo protector adecuado tal como un nitro, tosilo, p-metoxibencensulfonilo, metilen-2-sulfonilo, benciloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo o damantiloxycarbonilo.

Las reacciones de eliminación de tales grupos protectores de los aminoácidos o péptidos protegidos, o de la proteína final, también se pueden realizar mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante procedimientos de reducción catalítica o mediante procedimientos que utilizan amonio líquido/sodio metálico, fluoruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico o ácido metansulfónico.

La apM1 obtenida de tal modo se puede purificar mediante los múltiples procedimientos anteriormente mencionados, por ejemplo, los procedimientos de rutina en la química de péptidos, tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de partición, la cromatografía de filtración por gel, la distribución contracorriente, etc.

La composición de la presente invención comprende apM1 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo. Las sales comprenden las de los metales alcalinos, alcalinotérreos y las de amonio, tales como las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario y amonio. Dichas sales se pueden producir mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Las sales anteriormente mencionadas comprenden además las sales de ácido de adición que se pueden preparar mediante la reacción de apM1 con los ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados de modo conocido. Los ejemplos de sales de ácidos de adición son clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, p-toluensulfonato (tosilato), citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, sulfonato, glicolato, ascorbato, bencensulfonato, napsilato y semejantes.

La composición según la presente invención generalmente se proporciona y utiliza en forma de una preparación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de dicho ingrediente activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vehículo que se puede utilizar en dicha preparación farmacéutica comprende múltiples diluyentes y/o excipientes, tales como rellenos, generadores de volumen, agregantes, humectantes, desintegrantes, tensioactivos, lubricantes. Tales vehículos se utilizan convencionalmente según las formas de dosis unitarias deseadas.

La forma de dosis unitaria de la preparación farmacéutica se puede seleccionar de entre una amplia multiplicidad según los objetivos terapéuticos. Los ejemplos típicos comprenden formas sólidas tales como tabletas, píldoras, polvos, polvos finos, granulados y cápsulas, y formas líquidas tales como disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Estas preparaciones se clasifican, por la ruta de administración, en preparaciones orales, preparaciones parenterales, preparaciones transnasales, preparaciones vaginales, supositorios rectales, tabletas sublinguales, ungüentos, y cada una de estas se puede formular y moldear o procesar de otro modo mediante los procesos farmacéuticos establecidos. Además, tales preparaciones farmacéuticas se pueden suplementar con múltiples aditivos que se pueden formular en preparaciones farmacéuticas ordinarias, tales como estabilizadores, agentes antibacterianos, tampones, agentes isotónicos, agentes quelantes, agentes controladores del pH y tensioactivos, cada uno de ellos al nivel adecuado.

Los estabilizadores comprenden albúmina de suero humano y los L-aminoácidos, carbohidratos y derivados de celulosa que se utilizan convencionalmente. Estos se pueden utilizar por sí solos o en combinaciones con un tensioactivo. En particular, tales combinaciones pueden contribuir a una mayor estabilidad del agente activo.

Los L-aminoácidos no quedan particularmente restringidos pero comprenden glicina, cisteína, ácido glutámico etc.

Los carbohidratos no quedan particularmente restringidos pero comprenden monosacáridos tales como la glucosa, manosa, galactosa y fructosa; los alcoholes de azúcar tales como manitol, inositol y xilitol; disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa y polisacáridos tales como el dextrano, hidroxipropil-almidón, sulfato de condriotina y ácido hialurónico; incluidos los derivados de los mismos.

Los tensioactivos no quedan particularmente restringidos pero se pueden utilizar tensioactivos iónicos y no iónicos. Los ejemplos de tensioactivos son polioxietilenglicol sorbitan alquil ésteres, polioxietilen alquil ésteres, sorbitán monoacil ésteres y glicéridos de ácidos grasos.

ES 2 285 786 T3

Los derivados de celulosa no quedan particularmente restringidos pero comprenden metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica etc.

Los carbohidratos se pueden utilizar en por lo menos aproximadamente 0,0001 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 10 mg por 1 μ g de ingrediente activo. Los tensioactivos se pueden utilizar en por lo menos aproximadamente 0,00001 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,0001 y 0,01 mg por 1 μ g de ingrediente activo. La albúmina de suero humano se puede utilizar en por lo menos aproximadamente 0,0001 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,001 y 0,1 mg por 1 μ g de ingrediente activo. Los aminoácidos se pueden utilizar en aproximadamente 0,001 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,001 y 0,1 mg por 1 μ g de ingrediente activo. Los derivados de celulosa se pueden utilizar en por lo menos aproximadamente 0,00001 mg, preferentemente entre 0,001 y 0,1 mg por 1 μ g de ingrediente activo.

La proporción del ingrediente activo en la preparación farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar liberalmente de entre un amplio rango. Generalmente, el ingrediente activo comprende entre aproximadamente el 0,00001 y el 70% en peso, preferentemente entre el 0,0001 y el 5% en peso de la preparación final.

El tampón que se puede incorporar opcionalmente en la preparación farmacéutica comprende ácido bórico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido s-aminocaproico, ácido glutámico y as sales correspondientes (p. ej., sales de los metales alcalinos, o metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, calcio y magnesio). Los agentes isotónicos comprenden cloruro sódico, cloruro potásico, azúcares y glicerina, entre otros. Los agentes quelantes comprenden edetato sódico y ácido cítrico.

La preparación farmacéutica de la presente invención comprende no solamente preparaciones líquidas sino también preparaciones liofilizadas destinadas a la reconstitución extemporánea preparadas mediante el liofilizado de preparaciones líquidas para mayor duración de almacenamiento. Las preparaciones liofilizadas se administran después de su disolución en agua o un tampón que comprende disolución salina fisiológica.

En el moldeado de la composición farmacéutica de la presente invención en forma de tabletas, se pueden utilizar como vehículo, múltiples excipientes tales como lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico y fosfato potásico; agregantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, disolución de glucosa, disolución de almidón, disolución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y polivinil pirrolidona; desintegrantes tales como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, almidón seco, alginato sódico, polvo de ágar, polvo de laminarano, bicarbonato sódico y carbonato cálcico; tensioactivos tales como éster de ácido graso de polioxietilensorbitano, laurilsulfato sódico y estearil monoglicérido; inhibidores de la desintegración tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao, y aceite hidrogenado; promotores de la absorción tales como base de amonio cuaternario y laurilsulfato sódico; humectantes tales como glicerina y almidón; absorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal y lubricantes tales como talco purificado, sal de ácido esteárico, polvo de ácido bórico y polietilenglicol.

Además, cuando sea necesario, las tabletas obtenidas pueden estar recubiertas de materiales de recubrimiento convencionales con el fin de proporcionar tabletas recubiertas de azúcar, tabletas recubiertas de gelatina, tabletas entéricas, tabletas recubiertas de películas o tabletas de doble o multicapa.

Las píldoras se pueden preparar utilizando, como vehículos, excipientes tales como la glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, caolín y talco; agregantes tales como polvo de goma arábiga, polvo de goma de tragacanto, gelatina y etanol y desintegrantes tales como laminarano y ágar.

Las cápsulas generalmente se prepara mediante la formulación del ingrediente activo con un vehículo o vehículos tales como los mencionados anteriormente mediante ejemplos y composiciones encapsulantes utilizando cápsulas de gelatina dura o blanda, por ejemplo.

Las preparaciones líquidas de administración oral comprenden disoluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires. Cada uno se puede preparar utilizando diluyentes inertes convencionales, por ejemplo los vehículos farmacéuticamente aceptables incluida el agua. Las preparaciones líquidas pueden además estar suplementadas con agentes auxiliares tales como un agente mojante, un agente emulsionante y/o un agente suspensor y se pueden preparar mediante procedimientos establecidos.

La preparación líquida destinada a la administración parenteral, por ejemplo una disolución acuosa estéril o no estéril, emulsión o suspensión, se puede preparar mediante la utilización de un diluyente tal como el agua, alcohol etílico, propilenglicol, polietilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polietoxilado, ésteres de ácidos grasos y sorbitano polietoxilado y aceites vegetales tales como el aceite de oliva. La preparación líquida puede estar suplementada con éster de ácido orgánico que se puede inyectar o infundir, tal como oleato de etilo. Tales preparaciones se pueden suplementar todavía más con un disolvente, tampón, agente mojante, emulgente, agente suspensor, conservante, dispersante y otros aditivos.

Tales preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar mediante filtración a través de un filtro bacteriano, la incorporación de un bactericida, tratamiento de irradiación, tratamiento térmico, o semejantes. Además, dichas prepa-

ES 2 285 786 T3

raciones farmacéuticas se pueden proporcionar cada una de ellas en forma de una composición estéril sólida, que se puede disolver en agua estéril o un medio esterilizable adecuado para la esterilización extemporánea.

5 Los supositorios rectales y las preparaciones vaginales se pueden preparar mediante la utilización de polietilenglicol, manteca de cacao, un alcohol superior, o un éster de alcohol superior, gelatina o glicéridos semisintéticos como vehículos o bases.

10 Los ungüentos tales como las pastas, cremas y geles se pueden preparar mediante la utilización de diluyentes tales como petrolatum blanco, parafina, glicerina, derivados de celulosa, propilenglicol, polietilenglicol, silicona, bentonita y aceites vegetales estables tales como aceite de oliva.

Las preparaciones farmacéuticas destinadas a la administración transnasal o sublingual se pueden preparar mediante la utilización de excipientes estándar bien conocidos o excipientes en forma convencional.

15 Además, cuando sea necesario, la preparación farmacéutica de la presente invención se puede suplementar con agentes colorantes, conservantes, perfumes, sabores, edulcorantes u otras composiciones farmacéuticas.

20 El procedimiento de administración de dichas preparaciones farmacéuticas no está particularmente restringido pero se puede seleccionar juiciosamente con referencia a la forma de dosis, antecedentes del paciente, inclusive la edad y género, gravedad de la enfermedad y otras condiciones. Por ejemplo, las tabletas, píldoras, disoluciones, suspensiones, emulsiones, granulados y cápsulas se administran por vía oral. Las inyecciones se administran intravenosamente solas o en una mezcla con una infusión ordinaria tal como glucosa o un aminoácido y si es necesario, se administran solas intramuscularmente, intradermalmente, subcutáneamente o intraperitonealmente. Los supositorios se insertan en el recto, mientras que las preparaciones vaginales se administran en la vagina. Las preparaciones transnasales se administran por la nariz, las preparaciones sublinguales en la cavidad oral y los ungüentos son para la absorción transdermal.

30 La cantidad de ingrediente activo que se ha de contener en dicha preparación farmacéutica y la dosis no quedan particularmente restringidas pero en cada una de éstas se pueden seleccionar juiciosamente de entre un amplio rango según el efecto terapéutico esperado, el procedimiento de administración, el tiempo de tratamiento, los factores del paciente tales como edad y género. La dosis se selecciona generalmente de modo que la concentración del ingrediente activo en la sangre esté preferentemente comprendida entre aproximadamente 1 y 200 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente entre aproximadamente 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Esta preparación se puede administrar una vez o varias dosis divididas al día.

35 A continuación se describe en detalle la producción de un anticuerpo específico contra apM1. El anticuerpo específico contra apM1 se puede producir como un antisuero (anticuerpo policlonal) o un anticuerpo monoclonal mediante la utilización de apM1, un fragmento de apM1 o una proteína compleja que la contiene como hapteno o inmunógeno.

40 Los procedimientos destinados a la producción de dicho anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la materia. El anticuerpo según la presente invención se puede producir de acuerdo con un procedimiento conocido [p. ej., Biochemical Experiments Series: "Methods for immunobiochemical research", Japanese Biochemical Society (ed.) (1986)].

45 Más particularmente, el anticuerpo monoclonal anti-apM1 se puede producir mediante, p. ej., un procedimiento que comprende construir una célula de fusión (hibridoma) entre un plasmocito (inmunocito) de un mamífero inmunizado con dicho inmunógeno y una célula de plasmocitoma de origen mamífero, seleccionando un clon que produce el anticuerpo que reconoce la deseada apM1 y cultivando dicho clon.

50 La apM1 que se puede utilizar como inmunógeno en los procedimientos anteriores no queda particularmente restringida pero puede ser uno de las especies recombinantes conocidas de apM1 preparadas median procedimientos de ADN recombinante, un péptido que comprende una secuencia parcial de apM1, o la proteína correspondiente conjugada que contiene un grupo prostético. La apM1 anteriormente mencionada se conoce que es un factor de secreción específico de tejido adiposo y cualquier proteína que tenga la actividad o acción equivalente, por ejemplo GBP 28 (proteína de unión a gelatina de 28 kDa), se puede utilizar de mismo modo como inmunógeno.

55 El mamífero que se debe inmunizar con dicho inmunógeno en el procedimiento anterior no queda particularmente restringido pero preferentemente se selecciona desde el punto de vista de la compatibilidad con la célula de plasmocitoma que se deberá utilizar en la fusión. Generalmente, el ratón, la rata o el conejo se utilizan ventajosamente.

60 La inmunización de dicho mamífero se realiza mediante procedimientos de rutina, por ejemplo mediante la inyección de dicho inmunógeno por vía intravenosa, intradermal, subcutánea o intraperitoneal. Preferentemente, el inmunógeno se administra solo u opcionalmente en combinación con un adyuvante ordinario a un animal de laboratorio, tal como un ratón, múltiples veces a intervalos de 2 a 14 días, en una dosis total comprendida entre 100 y 500 $\mu\text{g/ratón}$. Como inmunógeno, es preferible utilizar esplenocitos aislados aproximadamente 3 días después de la última inmunización.

65 En lo que se refiere a la célula de plasmocitoma de mamífero como la otra célula parental que se ha de fusionar con el inmunocito, se puede utilizar cualquiera de las múltiples células ya conocidas, por ejemplo p3 (p3/x63-

Ag8) [*Nature*, 256:495-497 (1975)], p3-U1 [*Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81:1-7 (1978)], NS-1 [*Eur. J. Immunol.*, 6:511-519 (1976)], MPC-11 [*Cell*, 8:405-415 (1976)], SP2/0 [*Nature*, 276:269-270 (1978)], FO [*J. Immunol. Meth.*, 35:1-21 (1980)], x63.6.5.3. [*J. Immunol.* 123:1548-1550 (1979)], S194 [*J. Exp. Med.*, 148:313-323 (1978)], etc, y las células de mieloma tales como las de rata R210 [*Nature*, 277:131-133 (1979)].

La reacción de fusión entre dichas células de inmunocito y plasmocitoma se puede realizar generalmente de acuerdo con el procedimiento de Milstein *et al.* [Methods in enzymology, Vol. 73, p.3 (1981)], por ejemplo. Más particularmente, la anterior reacción de fusión se puede realizar en un medio habitual en presencia del un inductor de la fusión ordinario, tal como polietilenglicol (PEG), Virus Sendai (HVJ) o semejantes. Para lograr una mayor eficacia de fusión, opcionalmente se puede suplementar el medio con un agente auxiliar tal como el dimetilsulfóxido.

La proporción de célula de inmunocito a plasmocitoma que se debe utilizar no difiere de las proporciones comúnmente utilizadas en este tipo de proceso. Así, por ejemplo, las células de inmunocito se utilizan generalmente en una proporción de entre 1 y 10 veces superior a la de las células de plasmocitoma. Lo ejemplos de medios de utilidad para la fusión de las células son RPMI-1640 y MEM, que generalmente se utilizan para la proliferación de las células de plasmocitoma y otros medios que son de utilidad en el cultivo de células de este tipo. Generalmente es preferible omitir el componente de suero tal como el suero bovino fetal (FCS) de las formulaciones de medio.

La fusión se logra mediante un procedimiento que comprende mezclar cantidades predeterminadas de dichas células de inmunocito y plasmocitoma concienzudamente en dicho medio y añadir una disolución de PEG, por ejemplo PEG de peso molecular medio aproximado de entre 1000 y 6000, que ha sido previamente calentado a aproximadamente 37°C, al medio generalmente a una concentración de comprendida entre aproximadamente el 30 y el 60% peso/volumen, seguido de agitación. A continuación se repite la adición en serie de un medio adecuado, centrifugación y eliminación del sobrenadante, hasta que se obtiene el hibridoma deseado.

El hibridoma obtenido de este modo se puede aislar mediante cultivo en el medio de selección adecuado, tal como HAT (un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Este cultivo que utiliza medio HAT se realiza durante el tiempo suficiente para matar todas las células (las células no fusionadas etc.) distintas del hibridoma deseado, generalmente durante varios días a algunas semanas. El hibridoma resultante se somete a una búsqueda del clon que produce el anticuerpo deseado mediante los procedimientos habituales de dilución límite, seguido de la producción del anticuerpo monoclonal.

La búsqueda del deseado clone productor de anticuerpo se puede realizar mediante múltiples procedimientos de utilización rutinaria en la detección de anticuerpos, tales como ELISA [Engvall, E., *Meth. Enzymol.*, 70:419-439 (1980)], procedimiento de placa, procedimiento de mancha, procedimiento de aglutinación, procedimiento de Ouchterlony y inmunoradioensayo (RIA) [Hybridoma Techniques and Monoclonal Antibodies, publicado por R&D Planning, K.K., pp.30-53, 5 marzo 1982]. El inmunógeno mencionado hasta ahora en la presente memoria se puede utilizar para esta búsqueda.

El hibridoma así obtenido que produce el anticuerpo monoclonal deseado que reconoce apM1 se puede subcultivar en medio ordinario y también se puede guardar durante largo tiempo en nitrógeno líquido.

La recogida del anticuerpo deseado del anterior hibridoma se puede realizar mediante procedimientos que comprenden cultivar el hibridoma de modo rutinario y cosechar el anticuerpo como sobrenadante del cultivo o el procedimiento que comprende inocular un mamífero compatible con el hibridoma con el fin de producir su multiplicación y cosechar el anticuerpo como fluido ascítico. El primer método es adecuado para la preparación de anticuerpo de elevada pureza y el segundo procedimiento es adecuado para la producción masiva de anticuerpo.

El anticuerpo así obtenido se puede purificar mediante los procedimientos convencionales tales como precipitación, filtración por gel, cromatografía de afinidad etc. De tal modo, se puede obtener el anticuerpo monoclonal antiapM1 que se une específicamente apM1.

La presente invención proporciona además un procedimiento destinado a ensayar apM1 en muestras y un procedimiento asociado destinado al diagnóstico de la aterosclerosis.

El diagnóstico de aterosclerosis según la presente invención comprende determinar la cantidad de apM1 en la sangre de un paciente o en una muestra de orina con un anticuerpo anti-apM1 mediante procedimientos de inmunoensayo en fase líquida o sólida y comparar el valor medido con el correspondiente valor en pacientes con aterosclerosis y con el correspondiente valor en personas sanas para determinar si el nivel de apM1 en la muestra es superior o inferior que le nivel de las personas sanas.

El procedimiento preferido de inmunoensayo es el de ELISA mediante un procedimiento de "sándwich".

A continuación se describe en detalle el procedimiento anterior. Su principio se basa en el procedimiento de enzima anticuerpo. Así, este procedimiento típicamente comprende sembrar un anticuerpo monoclonal anti-apM1 humana (el primer anticuerpo) a una placa de 96 pocillos y, con el fin de evitar la absorción no específica, realizar un bloqueo (inmovilización). A esta placa de anticuerpo inmovilizado, se le añade la disolución estándar de apM1 o la muestra que se debe ensayar y se hace reaccionar (la primera reacción). A continuación se lava la placa, se añade el anticuerpo

anti-apM1 humana (el segundo anticuerpo) y se hace reaccionar (la segunda reacción). Se lava la placa y se añade el anticuerpo de conejo anti-IgG humana marcado con HRP (el tercer anticuerpo) y se hace reaccionar (tercera reacción). Después se lava la placa, se añade el sustrato y se realiza la reacción enzimática (la cuarta reacción). A continuación se lee la actividad como la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

En el procedimiento anterior, también es posible utilizar el anticuerpo policlonal como primer anticuerpo y el anticuerpo monoclonal como segundo anticuerpo.

En el procedimiento anterior cuanto mayor es la concentración de apM1 en la disolución estándar o en la muestra de ensayo utilizada, mayor es la actividad enzimática o (absorbancia) que se detecta. Mediante la construcción de una curva estándar (curva de calibración) haciendo una gráfica de los valores de absorbancia de una disolución estándar y comparando la absorbancia de la muestra de ensayo con la curva, se puede encontrar expeditivamente la cantidad de apM1 en la muestra de ensayo con el fin de diagnosticar si el paciente tiene aterosclerosis o no.

Además, el anterior diagnóstico de aterosclerosis según la presente invención se puede realizar más expeditivamente mediante la utilización de un equipo.

El kit y el procedimiento de detección de la cantidad de apM1 en la muestra que se debe ensayar se describen con detalle a continuación.

En el procedimiento de ensayo que utiliza el equipo, la muestra es preferentemente una muestra de orina o de sangre (particularmente una muestra de suero o plasma de sangre en ayunas) y dicha muestra se puede obtener y preparar a partir del sujeto que se debe ensayar de modo rutinario.

El equipo comprende un anticuerpo monoclonal anti-apM1 o un anticuerpo policlonal (anticuerpo anti-apM1) como componente esencial, preferentemente una combinación del mismo con el anticuerpo anti-apM1 policlonal o monoclonal, respectivamente, según sea el caso, o una combinación de dichos anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado se utiliza preferentemente inmovilizando mediante su previo acoplamiento a un vehículo en la placa. Alternativamente, dicho anticuerpo se puede utilizar directamente en forma de un gel de afinidad o se puede utilizar como el gel preparado en un recipiente o tubo de ensayo que se puede agitar y centrifugar y es ameno a la extracción de la fracción no unida por afinidad al gel.

También es preferible equilibrar dicha placa de anticuerpo inmovilizado o gel de antemano con una disolución de tampón adecuado, por ejemplo 0,01 M de tampón Tris-HCl (pH 7,4) + 0,15 M NaCl. Además, dicha placa de anticuerpo inmovilizado o gel se puede suplir con un conservante habitual tal como azida sódica.

Más preferentemente, como componente adicional del equipo, se suple un anticuerpo policlonal anti apM1 humana marcado como segundo anticuerpo para ELISA. Cuando sea necesario, el equipo puede comprender además un estabilizante tal como sacarosa o proteína de suero bovino y/o un conservante. El conservante se selecciona de entre el grupo de sustancias que no afectan el resultado del ensayo con el equipo e incluye una disolución diluida de azida sódica como ejemplo representativo.

Además, el equipo puede opcionalmente comprender una sustancia soluble en agua o miscible tal como glicerina, alcohol, glicol, glicóeter o semejantes y, con el fin de desengrasar, una mezcla de disolventes orgánicos tal como etanol-dietiléter, metanol-dietiléter, o cloroformo-metanol.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un mapa de enzimas de restricción de un plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos del gen apM1.

La Figura 2 muestra una curva estándar construida utilizando apM1 recombinante.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto antagonista de apM1 en el músculo liso medidos según el Ejemplo 3.

La Figura 4 muestra diagramáticamente los niveles sanguíneos de apM1 en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria y de sujetos sanos determinados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los efectos inhibidores dependientes de la concentración de apM1 sobre la expresión de una molécula de adhesión en la superficie celular según se determina de acuerdo con el Ejemplo 5.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la invención con más detalle y no deben limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Producción de apM1 recombinante

(1) *Expresión de apM1 en Escherichia coli*

1) *PCR de apM1*

La secuencia de nucleótidos del gen apM1 y la secuencia de aminoácidos codificada por esta han sido depositadas en el GenBank bajo el número de acceso D45371. La región codificante (CDS) se muestra como la secuencia del nucleótido 27 al nucleótido 761 de la secuencia de nucleótidos. Su secuencia de aminoácidos deducida se muestra en la SEC ID n° 1. En dicha secuencia, los residuos 1 al 14 constituyen el péptido señal y los residuos 15 al 244 representan la apM1 madura.

El gen apM1 se amplificó mediante PCR utilizando el plásmido donado por el Dr. Funahashi, del Second Department de medicina interna, Universidad de Osaka Escuela de Medicina como plantilla. El mapa de enzimas de restricción del plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos del gen apM1 se muestra en la Figura 1.

Diseñada de modo que la secuencia de 693 bp desde el nucleótido 69 al 761 de la secuencia de nucleótidos de apM1 se amplificase con un lugar NdeI en el extremo 5'- y un lugar BamHI en el extremo 3'-, se produjeron cebadores de PCR utilizando un sintetizador automático de ADN. Las secuencias de los cebadores de PCR se muestran en la SEC ID n°: 3 (directo) y la n°: 4 (reversa).

2) *Subclonaje del gen de apM1*

El producto de PCR obtenido en la etapa 1) anterior se subclonó en pT7 Blue T-Vector (Novagen) y se confirmó que no existían mutaciones en la secuencia de nucleótidos (pT7-apM1).

3) *Construcción de un vector de expresión*

El vector de expresión pET3c (Novagen) se digirió con NdeI y BamHI con el fin de recoger el fragmento de aproximadamente 4600 bp. Por otra parte, el pT7-apM1 obtenido en la etapa anterior 1) se digirió con NdeI y BamHI con el fin de recobrar un fragmento de aproximadamente 700 bp. Dichos fragmentos se ligaron y el vector de expresión así obtenido se denominó pET3c-apM1.

4) *Expresión en Escherichia coli*

La cepa huésped de *E. coli* BL21(DE3)pLysS se transformó con el pET3c-apM1 construido en la etapa anterior 3) y se cultivó en 2xT.Y.Amp. (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g y NaCl 5 g). Cuando el organismo hubo entrado en fase de crecimiento logarítmico, se añadió IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) con el fin de inducir la producción de un apM1 recombinante. Tanto las células de *E. coli* antes y después de esta inducción con IPTG como los cuerpos de inclusión (la fracción insoluble de *E. coli*) después de dicha inducción con IPTG se muestrearon y sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western con el fin de confirmar la expresión de apM1.

5) *Resultados y discusión*

El producto de expresión en *E. coli*, obtenido del modo anterior, consistió en una proteína de 230 residuos correspondiente con ¹⁵Gly a ²⁴⁴Asn, exclusive de la secuencia señal, de la secuencia de aminoácidos de apM1, con la adición de Met derivada del codon de iniciación en el N-terminal. Dicha secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID n°2.

El *E. coli* obtenido mediante el proceso anterior se analizó mediante SDS-PAGE. Como resultado, se pudo confirmar una banda de aproximadamente 30 kD en las células de *E. coli* y cuerpos de inclusión después de la inducción con IPTG.

A continuación, se realizó una transferencia Western utilizando dos tipos de anticuerpos [anticuerpos policlonales (péptidos sintéticos)]. Los dos anticuerpos reaccionaron con dicha banda de aproximadamente 30 kD, mientras que no se detectó reacción en absoluto con el huésped *E. coli*.

La proteína de aproximadamente 30 kD anterior se escindió con el fin de investigar la secuencia de sus 10 aminoácidos N-terminales. La secuencia fue la misma que la secuencia esperada, con la delección de la metionina N-terminal que se encontró en una población menor.

Se hizo evidente a partir de los resultados anteriores que la apM1 recombinante se había expresado como una proteína de aproximadamente 30 kD. La mayor parte de la apM1 expresada se había acumulado intracelularmente como un cuerpo de inclusión.

ES 2 285 786 T3

(2) Purificación de la apM1 recombinante a partir de *E. coli*

La purificación de apM1 a partir de *E. coli* se realizó utilizando el siguiente proceso de 5 etapas.

1) Cultivo de *E. coli*

E. coli BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformada con el vector de expresión pET3c-apM1 se pre-cultivó en 2xT.Y.Amp.Cm. (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, cloranfenicol 25 µg/ml y NaCl 5 g) (37°C, cultivo agitado). Al día siguiente, se diluyó el cultivo con 100 volúmenes de 2xT.Y.Amp. y se incubó adicionalmente. Después de 2 a 3 horas de incubación cuando la OD550 del fluido del cultivo fue de entre 0,3 y 0,5, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM con el fin de inducir la producción de apM1 recombinante. Aproximadamente entre 3 y 5 horas después de la adición de IPTG, el fluido del cultivo se centrifugó (5000 rpm, 20 min., 4°C) y el precipitado de *E. coli* así obtenido se almacenó congelado.

2) Preparación de un cuerpo de inclusión de *E. coli*

El precipitado de *E. coli* se suspendió en 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) y se trató con lisozima a 37°C durante 1 hora. A continuación, se añadió Triton X-100 (Katayama Kagaku) a una concentración final del 0,2%. Esta disolución se sonicó (Branson Sonifier, control de salida 5, 30 segundos) y se centrifugó (12.000 rpm, 30 min. 4°C) y se recuperó el precipitado. Este precipitado se suspendió en 25 ml de 0,2% Triton X-100 suplido con 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) y se sonicó la suspensión (en las mismas condiciones anteriores).

La disolución resultante se centrifugó y el precipitado se lavó mediante el mismo proceso anterior. El precipitado así obtenido se consideró el cuerpo de inclusión.

3) Replegamiento del cuerpo de inclusión

El cuerpo de inclusión se disolvió con una pequeña cantidad de 7 M guanidina HCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) y 1% 2ME. Esta disolución se mezcló con un exceso de 200 veces el volumen de urea 2 M, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) con el fin de diluir y se dejó reposar durante 3 noches a 4°C.

4) Concentración de la disolución replegada

Después del anterior replegamiento la disolución se centrifugó (9.000 rpm, 30 min., 4°C) y el sobrenadante se concentró a aproximadamente 1/100 mediante ultrafiltración utilizando una membrana Amicon YM-10. Este concentrado se dializó contra 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) y el dializado se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

5) HPLC de intercambio iónico DEAE-5PW

La muestra obtenida en la anterior etapa 4) se purificó por fraccionamiento mediante cromatografía de alto rendimiento de intercambio iónico (HPLC) con DEAE-5PW (Tosoh Corporation). Como tampón inicial se utilizó 20 mM Tris-HCl (pH 7,2) y se realizó la elución con un gradiente de NaCl (0 a 1 M NaCl/60 ml) con seguimiento de la absorbancia a 280 nm. El eluido se recogió en fracciones de 1 ml y cada una de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE.

6) Resultados y discusión

Debido a que la apM1 recombinante se había expresado como un cuerpo de inclusión en *E. coli*, su purificación se realizó mediante disolución y replegamiento del cuerpo de exclusión. Como consecuencia, la apM1 recombinante se disolvió y se separó en la columna de intercambio aniónico. Las fracciones del pico (fracciones n° 30 a 37) se juntaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Como resultado, se observó una banda de aproximadamente 30 kD. En este análisis, se detectó una ligera banda difusa en el fondo sin embargo la mayoría de la proteína se consideró que era la apM1 recombinante. Esta banda de aproximadamente 30 kD (apM1 recombinante) se utilizó como antígeno en la siguiente inmunización de conejos y ratones.

(3) Preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-apM1

1) Preparación de anticuerpo monoclonal

El apM1 recombinante, 100 µg/cuerpo, se mezcló con adyuvante completo en una proporción 1:1 y se inmunizaron 5 conejos con la mezcla, 8 veces a intervalos de 2 semanas con el fin de obtener un anticuerpo policlonal anti-apM1 (código de identificación: OCT9101-OCT9105).

2) Preparación de anticuerpo monoclonal

ApM1 recombinante, 20 µg/cuerpo, se mezcló con adyuvante completo en una proporción de 1:1 y se inmunizaron los ratones con la mezcla 3 veces por semana a intervalos de 2 semanas. A continuación, la inmunización final se

ES 2 285 786 T3

realizó sin el adyuvante, 3 días antes de la fusión de células. La fusión entre las células de bazo de ratón y las células de mieloma se realizó mediante el procedimiento del PEG y se seleccionó el hibridoma en medio HAT.

La selección de la línea celular productora del anticuerpo apM1 se realizó mediante ELISA utilizando las placas recubiertas del antígeno (apM1) y se clonó el hibridoma mediante el procedimiento de dilución límite.

Del modo anteriormente descrito, se obtuvieron 11 líneas de hibridoma productoras de anticuerpo anti-apM1, denominadas KOC09101-KOC09111. Uno de los hibridomas, de entre estos, se depositó con el National Institute of Bioscience and Human Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japón (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) el 8 de Junio de 1998 (fecha del depósito original) (código de identificación asignado por el depósito: KOC09108) y la solicitud de conversión al depósito bajo el Tratado de Budapest se registró el 7 de Octubre de 1998. Número de acceso del depósito final: FERM BP-6542.

Los hibridomas, en forma de clones individuales se administraron respectivamente intraperitonealmente a ratones previamente tratados con pristane y se cosechó el fluido ascítico (códigos de identificación: ANOC9101-9111).

3) Purificación de los anticuerpos

El antisuero de conejo (anticuerpo policlonal) y el fluido ascítico de ratón (anticuerpo monoclonal) se purificó, respectivamente, utilizando una columna de proteína- A.

4) Expresión de apM1 en las células de animales

El ADNc de apM1 se escindió con EcoRI y se insertó en el lugar EcoRI del vector de expresión pCIneo (Promega Corp.). Las células COS-1 (ATCC CRL 1650) se transfectaron con el anterior pCIneo-apM1 utilizando LipofetAMINE, GIBCO BRL y se cosechó el sobrenadante del cultivo y las células, respectivamente, después de 72 horas.

5) Transferencia Western de apM1

Primero, se sometió el extracto de tejido adiposo, las células COS-1, el sobrenadante de los cultivos COS-1, plasma humano sano y apM1, a 2 ME(+) SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa.

Esta membrana se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-apM1 (ANOC9104) y, a continuación, con un anticuerpo marcado con HRP, y la detección se realizó con ECL (Western blot detecting reagent, Amersham).

Como resultado, se detectó una banda de aproximadamente 35 kD en el extracto de tejido adiposo, en las células pCIneo-apM1/COS-1 y en el suero humano sano pero no se observó en las células pCIneo/COS-1 o en el sobrenadante del cultivo de pCIneo/COS-1.

Con el sobrenadante de los cultivos de células pCIneo/COS-1 se pudo detectar una banda de 35 kD, aunque la banda tubo una intensidad demasiado débil como para ser fácilmente distinguible.

Ejemplo 2

Determinación de apM1 en muestras

1) Transferencia Western de apM1

Se diluyó plasma humano sano 1:10 con PBS y 5 µl de la dilución se sometió a 2ME(+), (-) SDS-PAGE y se transfirió a un filtro de nitrocelulosa. Una vez bloqueado, el filtro se hizo reaccionar con una dilución de 1.000 veces del anticuerpo policlonal anti-apM1 (OCT9101 a 9105) o con 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-apM1 (ANOC9101-1) y además con anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP o con anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP y se detectó utilizando ECL.

Como resultado, con todos los anticuerpos policlinales se pudo confirmar una banda de apM1 de aproximadamente 35 kD en el caso de 2ME(+) y una de aproximadamente 70 kD en el caso de 2ME(-). De entre los anticuerpos monoclonales, ANOC9104 y ANOC9108 reaccionaron intensamente con la banda de apM1. Los resultados anteriores sugieren que como anticuerpos monoclonales para utilizar en ELISA, son adecuados ANOC9104 y ANOC9108.

2) Construcción del sistema ELISA para apM1

El anticuerpo monoclonal anti-apM1 (ANOC9108) se recubrió sobre una inmunoplaaca y, una vez bloqueado cada uno de los pocillos, se añadió la muestra estándar de apM1 y se incubó. Después de lavar cada uno de los pocillos, se añadió una dilución del anticuerpo policlonal anti-apM1 (OCT9104) y se incubó. Una vez lavados todos los pocillos de la placa, se añadió una dilución del anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP y se incubó. Una vez se hubo lavado cada pocillo, se añadió OPD a cada pocillo con el fin de teñir y se midió la absorbancia a 492 nm. Como estándar de apM1, se utilizó la apM1 recombinante expresada en *E. coli*, purificada y cuantificada para proteína mediante un ensayo de proteínas que utiliza BSA como referencia.

Como resultado, el ámbito de detección con la anterior combinación de ANOC9108 y OCT9104 estuvo comprendido entre 0,1 ng/ml y 20 ng/ml.

3) Filtración mediante gel y transferencia Western de plasma humano sano

Quando se midió plasma humano sano mediante el anterior ELISA a apM1, no se pudo obtener la concentración esperada de los resultados del análisis mediante transferencias Western. Por consiguiente, se sometió el plasma humano sano a filtración por gel en Superose 12 (Pharmacia) y cada fracción se sometió a SDS-PAGE y se analizó mediante transferencia Western con ANOC9104. Los marcadores de peso molecular también se sometieron a filtración por gel y se analizaron mediante transferencia Western y se compararon sus posiciones con la posición de elución de apM1.

Como resultado, se encontró que apM1 se había eluido ampliamente en las fracciones correspondientes a una masa molecular no inferior a 290 kD. El descubrimiento anterior sugiere que apM1 en la sangre se encuentra asociada con otros componentes del plasma formando moléculas grandes de peso molecular no inferiores a 290 kD de modo que queda enmascarado el lugar de reconocimiento por el anticuerpo. Teniendo en cuenta que el plasma tratado con un tampón que contiene SDS puede hacer reaccionar al anticuerpo con apM1, se realizaron los siguientes estudios.

4) Tratamiento de las muestras de plasma

Se hirvió el plasma en un tampón con SDS y se estudiaron las condiciones de tratamiento (tiempo de ebullición, proporción de mezcla de plasma y tampón SDS). En relación al tiempo de ebullición, se diluyó plasma humano sano 10 veces con tampón de SDS y se hirvió durante 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 3 minutos, 5 minutos o 10 minutos y después de una dilución final de 5.000 veces del plasma original, se realizó el ensayo de apM1. En lo que se refiere a la proporción de mezcla de plasma a tampón SDS se hirvió durante 5 minutos una dilución de 2, 3, 5, 10 y 20 veces de plasma humano sano en tampón SDS y, después de una dilución final de 10.000 veces, se realizó el ensayo de apM1.

Como resultado se pudieron detectar niveles de apM1 del mismo orden que los resultados de transferencia Western del plasma humano sano. La comparación de las diferentes condiciones de tratamiento anteriores sugiere que fue apropiado diluir el plasma 10 veces en tampón SDS y hervir la dilución durante 5 minutos.

5) Dilución de las muestras de plasma

En vista del descubrimiento de que el rango de detección de ELISA de apM1 está comprendido entre las concentraciones de 70 pg/ml y 20 ng/ml y que la concentración en sangre de apM1 es del orden del μg , se consideró que el suero (plasma) se debe diluir antes del ensayo. Por consiguiente, con el fin de determinar el factor de dilución adecuado, se realizaron diluciones seriadas de apM1 tratada con tampón SDS y se ensayó apM1 en cada una de las diluciones. Así, el plasma humano sano se trató con SDS y a continuación se realizaron diluciones seriadas entre 200 y 10×10^4 veces y se ensayó apM1.

Como resultado, dentro del rango de medición de este ELISA, se detectó apM1 en proporción al factor de dilución y, en consideración con la absorción, entre otras condiciones, se consideró apropiado realizar los ensayos a una dilución final de aproximadamente 5.000 veces.

6) Estudio de las condiciones de muestreo de sangre

El muestreo de sangre de sujetos sanos se realizó en múltiples condiciones: suero, heparina y EDTA y se investigaron las diferencias en el título de apM1 según las diferentes condiciones de muestreo. Así, se realizó el muestreo de sangre en 10 sujetos sanos y cada muestra de suero (plasma) se trató con SDS y se ensayó para apM1 a una dilución final de 5.000 veces.

Como resultado, los niveles de apM1 en los 10 sujetos sanos no mostraron diferencias sustanciales debidas al procedimiento de muestreo de la sangre.

7) Estudio de las condiciones de almacenamiento de las muestras

Las condiciones de almacenamiento de las muestras destinadas a los ensayos de apM1 se estudiaron con muestras plasma y plasma tratado con SDS. En lo que se refiere a las condiciones de almacenamiento del plasma, se trataron con SDS y se ensayó apM1 en diluciones finales de 5.000 veces de muestras que se dejaron a 4°C, a temperatura ambiente o a 37°C durante 1, 2, 3 y 6 días, respectivamente, y con el fin de investigar la influencia del procedimiento de congelación-descongelación sobre el plasma, se sometieron las muestras a 1, 2, 4 y 8 ciclos de congelación y descongelación, respectivamente y se trataron con SDS y se ensayó apM1 a una dilución final de 5.000 veces. En lo que se refiere a las muestras tratadas con SDS, el plasma se diluyó 10 veces con tampón de SDS, se hirvieron durante 5 minutos, se diluyeron 10 veces y se sometieron al mismo experimento anterior.

Como resultado, en las condiciones anteriores, se detectó poca influencia sobre los valores de apM1 medidos. Aunque se investigó la influencia del proceso de congelación-descongelación utilizando muestras de plasma y plasma tratado con SDS, se detectó poca influencia.

8) *Estudio de las oscilaciones diurnas y circadianas*

Se estudiaron las oscilaciones diurnas y circadianas en los valores de apM1 medidos en el suero (plasma) de pacientes sanos. En lo que se refiere a las oscilaciones diurnas, se ensayó la misma muestra 8 veces y se calculó CV. En lo que se refiere a las oscilaciones circadianas la misma muestra se ensayó 4 veces en días diferentes y se calculó CV.

Como resultado, el CV de las oscilaciones diurnas fue del 5% y el CV de las oscilaciones circadianas se encontró dentro del 10%.

9) *Estudio de especificidad*

Suero de cerdo, bovino, equino, cabra, rata y ratón se sometió a ELISA de apM1 y se estudió la especificidad del sistema de ensayo. El suero de cada especie animal se trató con tampón SDS y se ensayó apM1 en una serie de diluciones finales comprendidas entre 100 y 8.100 veces.

Como resultado, mientras que se encontró una sensibilidad cruzada de aproximadamente el 10% entre sueros bovinos y equinos, sustancialmente no se encontró sensibilidad cruzada alguna entre las demás especies animales.

Ejemplo 3

Efecto de apM1 inhibidor del crecimiento del músculo liso

Se sembró una placa con células de músculo liso arterial humano (Clontech) a una concentración de $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ y se dejó reposar durante la noche en DMEM (Gibco) suplido con 10% FBS (Gibco), 100 IU/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina y, a continuación, se incubaron en 5% CO_2 + 95% aire a 37°C .

La síntesis de ADN en las células de músculo liso arterial humano se cuantificó de acuerdo con la adquisición de [metil ^3H]-timidina (4 replicas).

Así, las células sembradas en las placas de 96 pocillos se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de apM1 y/o, como control, 10 ng/ml de HB-EGF (factor de crecimiento semejante a HB-EGF que se une a heparina, recombinante humano, R&D Systems) en 2% FBS-DMEM durante 24 horas. A continuación, se añadió [metil ^3H] timidina, 1 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$, durante 5 horas. A continuación las células se trataron con tripsina y, utilizando un cosechador automático de células, se recogieron en filtros de fibra de vidrio. A continuación, la cantidad de [metil ^3H]-timidina adquirida se midió directamente en un contador β .

Los resultados se muestran en la Figura 3. Esta gráfica de barras se construyó utilizando la proporción relativa de síntesis de ADN en el eje de la ordenada contra (sin adición de fármaco ensayo), adición de apM1 (la presente invención), adición de HB-EGF (control) y la adición de apM1 + HB-EGF (la presente invención) en la abscisa.

Es evidente de la gráfica que apM1 antagoniza la síntesis de ADN en las células de músculo liso (crecimiento de músculo liso). Por consiguiente, mediante la adición de apM1, se puede inhibir significativamente la síntesis de ADN mediante la adición de apM1 ($p < 0,001$) e incluso se puede inhibir significativamente ($p < 0,001$) la síntesis de ADN incrementada por HB-EGF.

Estos resultados indican que apM1 es un efectivo inhibidor del crecimiento del músculo liso.

Ejemplo 4

Determinación de los niveles sanguíneos de apM1 en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria

Se recogió la sangre de pacientes, 24 machos y 10 hembras, comprobados de tener estenosis de no menos del 75% mediante angiografía (indicado como CAD(+)) y 66 pacientes macho y 39 pacientes hembra con una estenosis inferior al 75% (indicado como CAD(-)), la sangre se recogió y se determinó la concentración plasmática de apM1 mediante el procedimiento de la presente invención tal como se describió en el Ejemplo 2.

A la vez, se realizó un escaneo CT de cada paciente a nivel umbilical y se calculó a partir de los resultados de CT la zona de grasa visceral (VFA, cm^2).

En una gráfica con los niveles de apM1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el eje de la ordenada y VFA en la abscisa, se analizó la correlación entre los valores medidos y los valores calculados y los valores medidos mediante la prueba t desemparejada para valores distintos de CAD (+) y CAD (-). Los resultados se muestran en la Figura 4.

Es evidente de la gráfica que los niveles de apM1 en los paciente con enfermedad de la arteria coronaria [grupo CAD(+)] fueron invariablemente bajos independientemente de la magnitud del área de grasa visceral (VFA), lo que indica que apM1 es efectiva en el diagnóstico de estenosis avanzada de la arteria coronaria.

También se descubrió que apM1 es un marcador importante del comienzo y la progresión de la aterosclerosis, lo que sugiere su utilidad en la terapia de la enfermedad.

Ejemplo 5

Efecto de apM1 inhibidor del inicio de la aterosclerosis

Se cultivaron (5% CO₂, 37°C) células endoteliales vasculares de aorta humana (HAEC, de Clontech) sembradas en placas de 96 pocillos con medio de cultivo para células vasculares endoteliales. Utilizando "Biocoat"TM, de Becton Dickinson, se continuó el cultivo hasta que el crecimiento se hizo confluyente, después de lo cual se cambió el medio a TCM 199 (Tissue culture medium 199; Osaka University Microbial Research-Nakalai Tesque] + 0,5% FCS (suero bovino fetal; Japan Biomaterials) + 3% BSA (albúmina de suero bovino, Sigma).

A continuación, el apM1 recombinante obtenido en el Ejemplo 1 se añadió en diferentes cantidades, es decir, 1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml, y se incubó el sistema durante 18 horas adicionales. A continuación, se añadió TNF-α recombinante humano (factor tumoral necrosante-α, R&D; 10 U/ml) y el sistema se incubó 6 horas adicionales (el grupo experimental con apM1 añadido).

Como control, se proporcionó el grupo sin la adición de dicho apM1 recombinante (solamente estimulado con TNF-α).

Utilizando el procedimiento de ELISA celular [Takami, S., *et al.*, *Circulation*, 97(8):721-728 (1998)], se analizó si apM1 suprimiría la expresión de moléculas de proteínas de adhesión, es decir VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares-1), ELAM (molécula de adhesión endotelio leucocito) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) sobre la superficie de HAEC estimulada por TNF-α. Como anticuerpo anti-ICAM-1, se utilizó el 6.5B5 de DAKO.

El grupo con apM1 añadida se comparó con el libre de apM1 y las diferencias se ensayaron para determinar su significancia mediante la prueba de Student.

Los resultados de VCAM-1 se muestran en la Figura 5.

En la Figura 5, la abscisa representa el nivel de adición de apM1 (µg/ml, - indica no adición) mientras que la ordenada representa el nivel relativo de expresión de la molécula de proteína de adhesión (VCAM-1) en cada uno de los grupos experimentales o el grupo control, tomando como unidad (1) el nivel de expresión de VCAM-1 en la superficie de las HAEC en ausencia de estimulación con TNF-α.

Lo que sigue a continuación se puede deducir de la Figura 5. Así, comenzando con la concentración de 1 µg/ml, apM1 inhibió la expresión de la molécula VCAM-1 incrementada por TNF-α en las HAEC de modo significativo (p<0,05) y en modo dependiente de la dosis.

También se descubrió que la expresión de las demás moléculas de adhesión ELAM y CAM-1 fueron inhibidas de un modo semejante mediante apM1.

Se ha publicado que las heridas en las células endoteliales vasculares y la resultante adhesión de los monolitos son factores cardinales en la patogénesis de la aterosclerosis [Ross, R., *Nature*, 362(6423):801-804 (1993)]. El descubrimiento de que apM1 inhibe la expresión de las moléculas de adhesión decisiva, en el comienzo de la aterosclerosis (VCAM-1, ELAM, ICAM-1 etc), indica que apM1 actúa de modo inhibitorio sobre el inicio de la aterosclerosis, siendo así efectiva como agente profiláctico de la aterosclerosis.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona una composición inhibidora del crecimiento del músculo liso y una composición destinada a inhibir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, que comprenden tanto la una como la otra apM1 como ingrediente activo. Estas composiciones de la presente invención son de utilidad en el ámbito farmacéutico. Además, la presente invención proporciona un procedimiento de ensayo de apM1 que comprende utilizar un anticuerpo específico a apM1 y mediante el cual se puede establecer un nuevo procedimiento de diagnóstico de la aterosclerosis.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización del factor secretorio apM1 específico del tejido adiposo o sales del mismo farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición destinada a inhibir el crecimiento del músculo liso.

2. Utilización del factor secretorio apM1 específico del tejido adiposo o sales del mismo farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición destinada a la profilaxis o el tratamiento terapéutico de la aterosclerosis.

10 3. Utilización del factor secretorio apM1 específico del tejido adiposo o sales del mismo farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición destinada a la profilaxis o el tratamiento terapéutico de la restenosis post angioplastia.

15 4. Utilización de un anticuerpo contra el factor secretorio apM1 específico del tejido adiposo para la preparación de un agente diagnóstico de la aterosclerosis.

20 5. Procedimiento destinado al diagnóstico de la aterosclerosis que comprende cuantificar apM1 en una muestra *in vitro* mediante un anticuerpo anti-apM1 y comparar el valor encontrado de este modo con los valores medidos en sujetos sanos y pacientes de aterosclerosis.

25

30

35

40

45

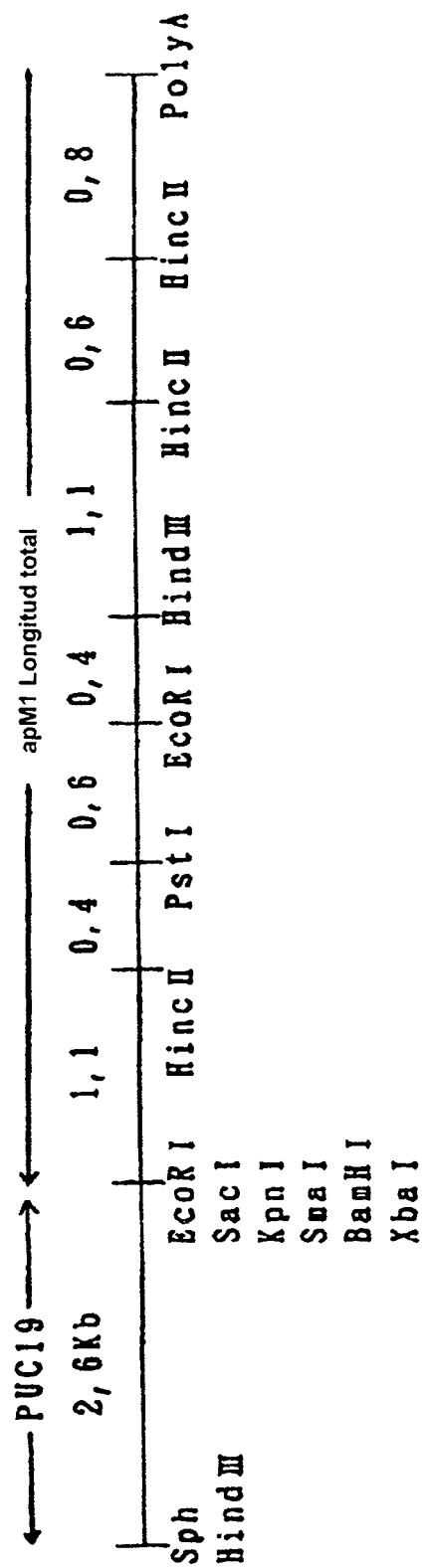
50

55

60

65

F I G. 1



F I G. 2

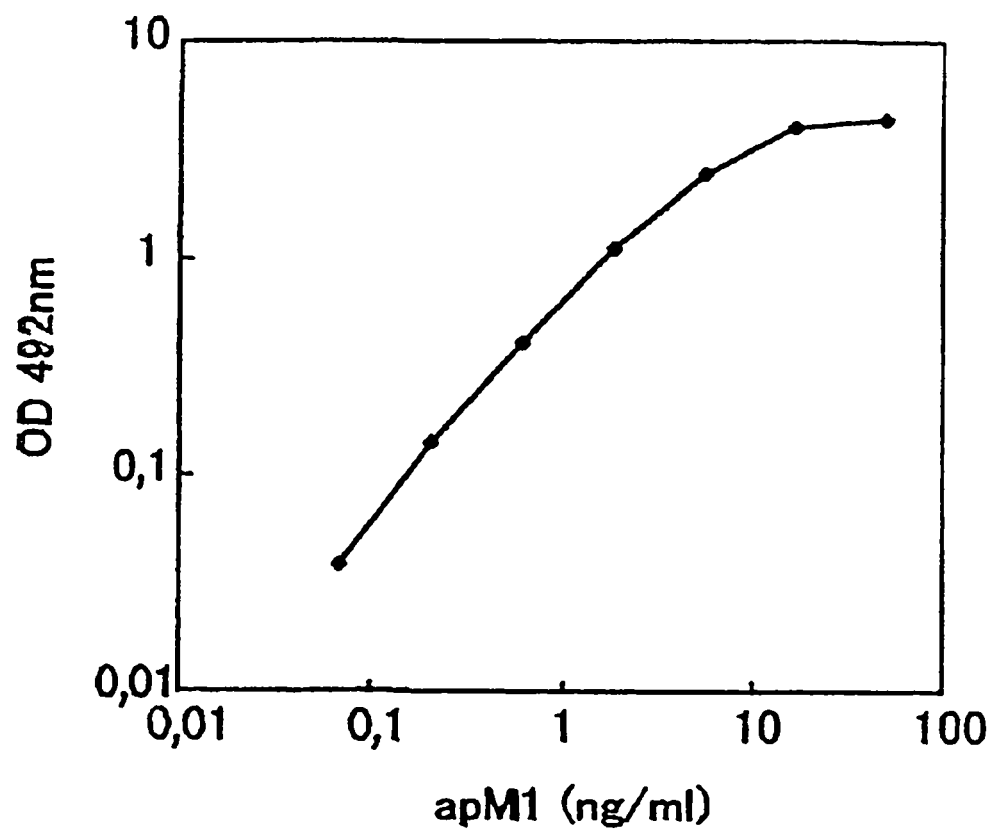


FIG. 3

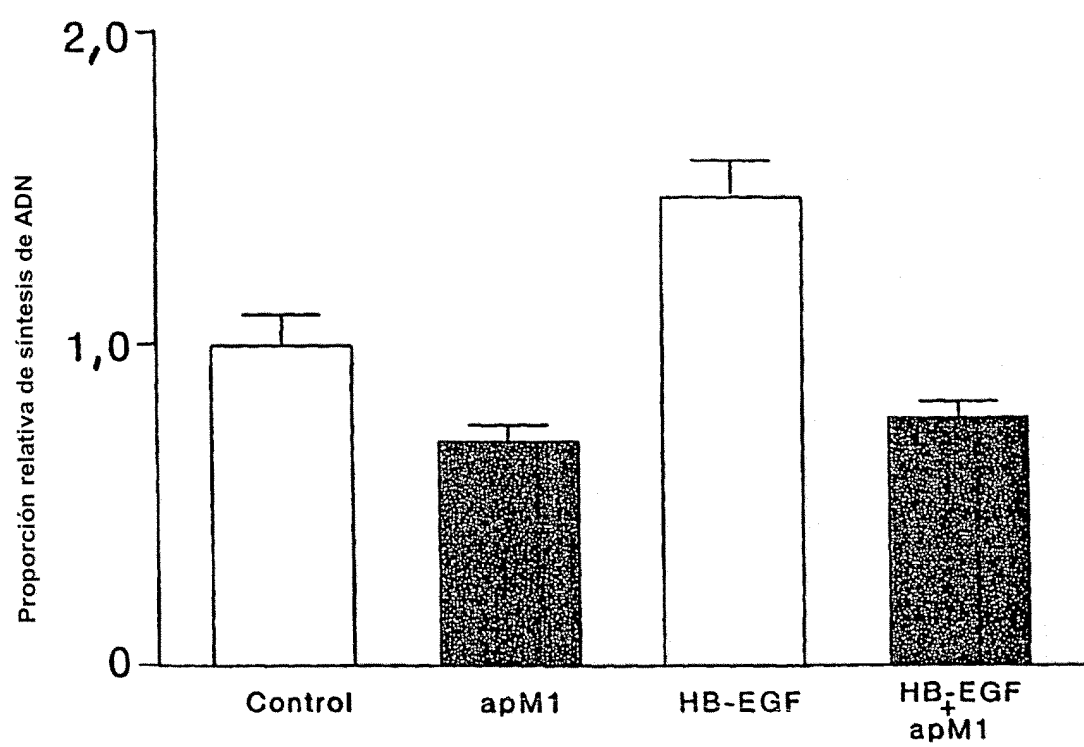


FIG. 4

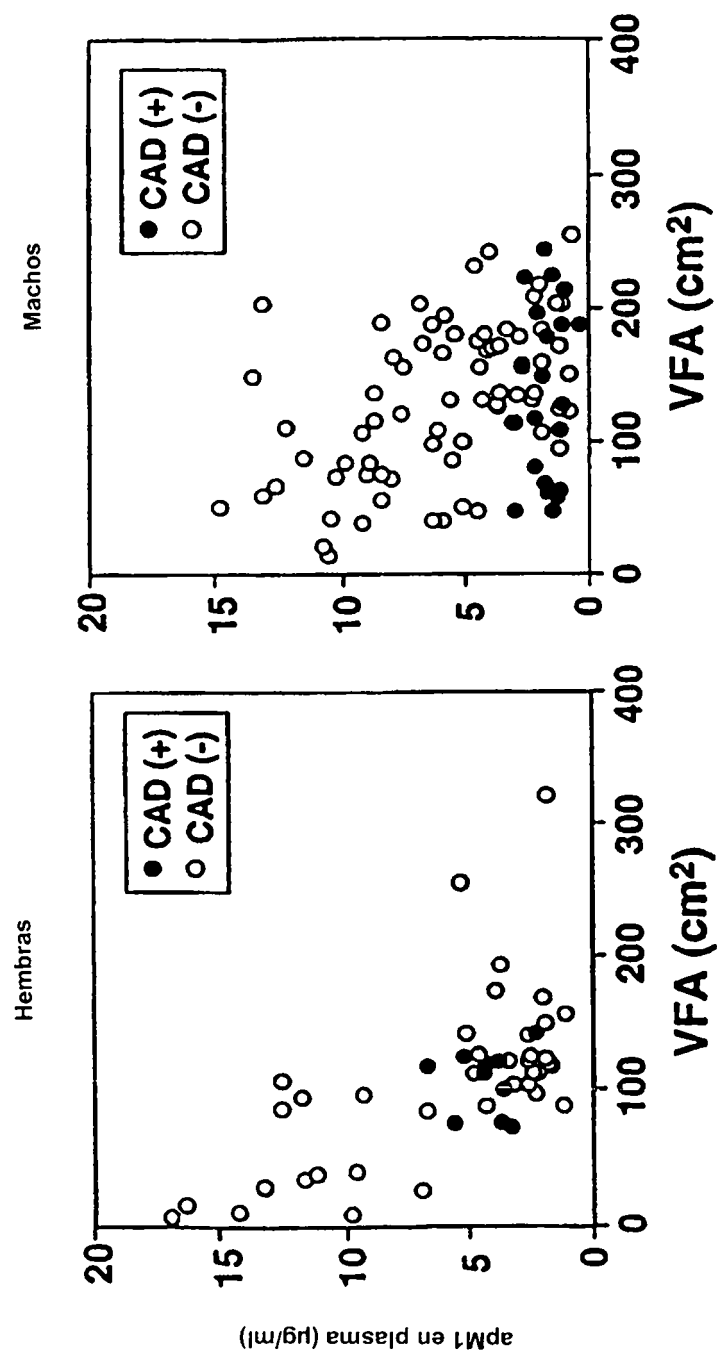
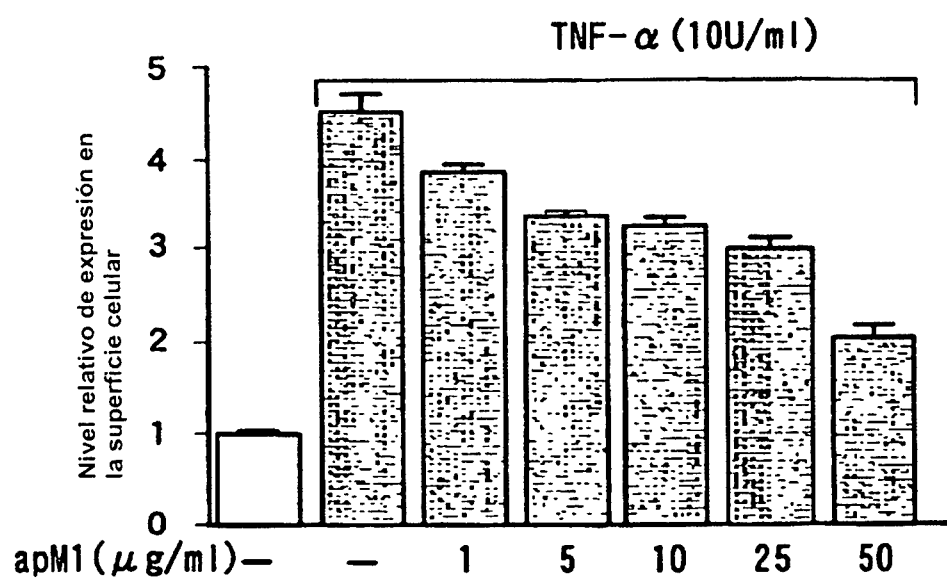


FIG. 5



ES 2 285 786 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Otsuka Pharamaceutical co., Ltd.
- 5 <120> Composición inhibidora del crecimiento del músculo liso, procedimiento de diagnosis de la aterosclerosis y equipo para el mismo.
- <130> P98-51
- 10 <140>
- <141>
- 15 <150> JP H9-297569
- <151> 1997-10-29
- <160> 4
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- 25 <211> 244
- <212> PRT
- <213> Tejido graso abdominal de mioma de útero
- 30 <400> 1

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

ES 2 285 786 T3

Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175
5 Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
10 195 200 205
Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
15 210 215 220
Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225 230 235 240
20 His Asp Thr Asn

<210> 2

<211> 231

25 <212> PRT

<213> Tejido graso abdominal de mioma de útero

30 <400> 2

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

65

ES 2 285 786 T3

	His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu	
	130 135 140	
5	Tyr Tyr Phe Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val	
	145 150 155 160	
10	Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr	
	165 170 175	
	Gln Glu Asn Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu	
15	180 185 190	
	Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg	
	195 200 205	
20	Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe	
	210 215 220	
25	Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn	
	225 230	
30	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia de cebador (directa) de apM1 para PCR	
35	<400> 3	
	AACATATGGG GCATGACCAG GAAACCACG	29
40	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia de cebador (inverso) de apM1 para PCR	
	<400> 4	
50	AAGGATCCTC AGTTGGTGTC ATGGTAGAG	29
55		
60		
65		