



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 016**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99913613 .8**

86 Fecha de presentación : **09.04.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1070758**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2001**

54 Título: **Estañocalcina humana y usos de la misma para inhibir la adipogénesis.**

30 Prioridad: **10.04.1998 JP 10-99741**
28.08.1998 JP 10-243355

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Daiichi Sankyo Company, Limited**
3-5-1, Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es: **Goto, Masaaki;**
Tomoyasu, Akihiro;
Yano, Kazuki;
Kobayashi, Fumie;
Nakagawa, Nobuaki;
Yasuda, Hisataka;
Yamaguchi, Kyoji;
Kinosaki, Masahiko;
Mochizuki, Shin-Ichi;
Nakakarumai, Tadashi;
Morinaga, Tomonori;
Tsuda, Eisuke y
Higashio, Kanji

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Estañocalcina humana y usos de la misma para inhibir la adipogénesis.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un factor inhibidor de la adipogénesis (ADIF) que es una nueva proteína que tiene una actividad de supresión de la diferenciación y/o maduración de adipocitos, y a métodos para producir la misma.

10 La proteína de la presente invención es útil como una composición farmacéutica para prevenir o tratar la obesidad o como un antígeno para establecer un diagnóstico inmunológico.

Técnica antecedente

15 La obesidad es un factor de riesgo de enfermedades tales como la diabetes mellitus, hipertensión, y enfermedad cardíaca, que amenazan la salud de la gente de países avanzados. La obesidad significa afecciones físicas en las que los tejidos adiposos se han acumulado de forma anormal. Los tejidos adiposos son órganos especiales en los que se almacena *in vivo* el excedente de energía como grasa o triglicéridos, y está construido de fibroblastos que incluyen adipocitos y sus precursores, macrófagos, células que rodean los vasos sanguíneos, células sanguíneas, y similares.

20 Se dice que los adipocitos representan 1/3 a 2/3 de las células que están presentes en tejidos adiposos y acumulan grasas o triglicéridos. Los adipocitos se diferencian y maduran a través del proceso que comienza desde las células madre multipotenciales mesenquimáticas, y que crecen en lipoblastos que han adquirido una base como adipocitos, adipocitos precursores sin gotas de lípidos pero que tienen marcadores iniciales de adipocitos, adipocitos inmaduros
25 que contienen gotas de lípidos, y finalmente en adipocitos maduros que contienen gran cantidad de grasas acumuladas. Los adipocitos de los adultos que sufren ligera obesidad crecen hipertróficamente debido al aumento en la cantidad de triglicéridos acumulados. La cantidad de adipocitos aumenta según el grado de obesidad llega a ser visible. Por lo tanto, disminuyendo la cantidad de adipocitos controlando la diferenciación y maduración o suprimiendo la hipertrofia de adipocitos madurados se espera que se detenga el progreso de la obesidad suprimiendo el aumento en la cantidad
30 de grasas acumuladas, y para tratar la obesidad. Se ha demostrado que el control de la diferenciación de adipocitos *in vivo* sucede positiva o negativamente de acuerdo con varios factores derivados de factores ambientales tales como la ingestión, ejercicio, y etc. Como citoquinas que controlan la diferenciación de los adipocitos a partir de precursores de adipocitos, se presentan el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α : Torti F. M. *et al.*, Science, Vol. 229, p 867 (1985)), factor de crecimiento transformante- β (Ignatz R. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p 8530 (1985)), factor de preadipocitos-1 (Pref-1: Smas CM. *et al.*, Cell, Vol. 73, p 725 (1993)), y similares. Además, se ha informado de
35 que la leptina, el producto de traducción de un gen ob que se ha clonado recientemente, posiblemente disminuye la cantidad de ingesta y el peso de los tejidos adiposos mediante el sistema nervioso central (Levin N. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93. P 1726, 1996).

40 Además, el péptido intracerebral-neuropéptido Y que muestra un fuerte efecto de estimulación del apetito y su receptor están atrayendo la atención como materiales para el desarrollo de un compuesto farmacéutico para suprimir la obesidad (Sainsburg A. *et al.*, Diabetologia, Vol. 39, p 353, 1996). Se espera que estas citoquinas lleguen a ser un agente terapéutico para la obesidad debido a su acción de depresión de adipocitos sobre la acumulación de la grasa. Están en curso ensayos clínicos como agentes terapéuticos o preventivos de la obesidad sobre algunas de estas
45 citoquinas tales como la leptina.

Actualmente, está disponible en el mercado un agente terapéutico o preventivo de la obesidad en los Estados Unidos como el Redux™ (American Home Products Co.). Otros fármacos tales como Meridia (Kunol Co.) y Xenical (Roche Co.) se aprobarán como un agente de tratamiento de la obesidad o un inhibidor de la absorción de grasa en los
50 Estados Unidos. El método de tratamiento que usa estos compuestos farmacéuticos, sin embargo, no son necesariamente satisfactorios en los efectos y resultados terapéuticos. Se ha deseado el desarrollo de un nuevo agente que esté disponible y muestre para estos compuestos farmacéuticos mayor efecto curativo y menos efectos secundarios, útil.

55 El documento WO 96/15147 y Chang *et al.*, molecular and cellular vol. 141, p. 95-99, 1998 se refieren a la identificación de los polipéptidos estañocalcina- α y estañocalcina-2 [que tienen secuencias de aminoácidos similares a las proteínas estudiadas en la presente invención.

Descripción de la invención

60 Como resultado de la exploración extensiva para descubrir un nuevo compuesto que tenga un efecto anti-obesidad o un efecto de control de la obesidad, en la presente invención se ha descubierto una proteína que muestra una actividad inhibidora de la adipogénesis, que es una actividad para suprimir la diferenciación y/o maduración de adipocitos, en un caldo de cultivo de fibroblasto pulmonar fetal humano IMR-90 (depositado con ATCC, N° de depósito CCL186). En la presente invención se ha descubierto adicionalmente un proceso para acumular esta proteína en una concentración
65 elevada cultivando las células que usan trozos de cerámica de alúmina como una matriz celular y para purificar la proteína de forma eficaz. Además, en la presente invención también se ha establecido un método eficaz para aislar la proteína del caldo de cultivo mencionado anteriormente repitiendo la absorción y elución secuencialmente con una columna de intercambio iónico, columna de afinidad, y columna de fase inversa.

Específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un factor inhibidor de la adipogénesis (ADIF) que sea una nueva proteína que tenga actividad de supresión de la diferenciación y/o maduración de adipocitos, y a un proceso para producir la proteína a partir de un caldo de cultivo obtenido cultivando fibroblastos humanos.

5 La presente solicitud proporciona un ADNc que codifica la proteína de presente invención y un proceso para producir la proteína usando el ADNc.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a un factor inhibidor de la adipogénesis (a partir de ahora llamado "ADIF" de vez en cuando) que es una nueva proteína que tiene una actividad de supresión de la diferenciación y/o maduración de adipocitos, y a un proceso para producir la proteína.

La proteína de la presente invención es una proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1.

15 El método para obtener la proteína de la presente invención comprende cultivar fibroblastos pulmonares fetales humanos en trozos de cerámica de alúmina y purificar el caldo de cultivo por cromatografía usando una columna de intercambio iónico, columna de afinidad a heparina, y columna de fase inversa.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra el perfil de elución de la proteína ADIF en bruto (fracción de Superose 12 en el Ejemplo 3, vii); Muestra 7) de una columna de heparina 5PW.

La Figura 2 muestra el perfil de elución de la proteína ADIF en bruto (fracción de heparina 5PW en el Ejemplo 3, viii); Muestra 8) de columna Polycat-A.

25 La Figura 3 muestra el perfil de elución de la proteína ADIF (fracciones de Polycat-A en el Ejemplo 3, ix) de una columna de fase inversa.

La Figura 4 muestra una actividad ADIF del pico de la fracción 5 de una columna de fase inversa.

30 La Figura 5 muestra la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de la proteína ADIF finalmente purificada en condiciones reductoras y no reductoras.

Explicación de los símbolos

35 Carril 1: Marcador de peso molecular (SDS-PAGE en condiciones no reductoras)

Carril 2: ADIF (SDS-PAGE en condiciones no reductoras)

40 Carril 3: Marcador de peso molecular (SDS-PAGE en condiciones reductoras)

Carril 4: ADIF (SDS-PAGE en condiciones reductoras)

45 La Figura 6 muestra SDS-PAGE después de que el producto finalmente purificado se haya tratado con N-glicanasa.

Explicación de los símbolos

Carril 1: Marcador de peso molecular

50 Carril 2: ADIF no tratado

Carril 3: ADIF que se trató para retirar las cadenas de azúcar tipo unión N por N-glicanasa

55 La Figura 7 muestra la actividad ADIF del Ejemplo 16.

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se refiere a una proteína ADIF que tiene actividad de supresión de la diferenciación y/o maduración de adipocitos, que se origina a partir de fibroblastos humanos, que tiene un peso molecular por SDS-PAGE de aproximadamente 45 kD en condiciones no reductoras, aproximadamente 28 kD y/o 23 kD en condiciones reductoras, y que muestra afinidad a heparina. La proteína ADIF de la presente invención tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 18 kD por SDS-PAGE en condiciones reductoras si se retiran las cadenas de azúcar tipo unión N por tratamiento con N-glicanasa. La proteína ADIF de la presente invención suprime el proceso de diferenciación y/o maduración de lipoblastos, precursores de adipocitos o adipocitos inmaduros, en adipocitos madurados que contienen gran cantidad de grasas acumuladas. La proteína ADIF de la presente invención difiere claramente de factores inhibidores de la adipogénesis conocidos en el peso molecular o la secuencia de aminoácidos N-terminal.

ES 2 288 016 T3

La presente invención se refiere a un proceso para producir la proteína ADIF que comprende cultivar fibroblastos pulmonares fetales humanos en trozos de cerámica de alúmina aplicando el caldo de cultivo a una columna de heparina, eluyendo las fracciones adsorbidas, cargando las fracciones en una columna de intercambio catiónico y eluyendo las fracciones adsorbidas, y tratando adicionalmente las fracciones con una columna de intercambio iónico, columna de filtración en gel, y columna de fase inversa, purificando y recogiendo de este modo la proteína ADIF.

El tratamiento en columna en la presente invención incluye no solamente el tratamiento para provocar que un caldo de cultivo fluya a través de una columna de heparina sepharose o similares, sino también un tratamiento que consigue el mismo efecto que el tratamiento en columna tal como mezcla y agitación del caldo de cultivo con heparina sepharose o similares por un proceso discontinuo (en la presente invención "tratamiento de columna" se usa con este significado).

En la presente invención, la proteína también puede producirse de forma eficaz cultivando los fibroblastos pulmonares fetales humanos usando trozos de cerámica de alúmina como un vehículo de adhesión celular.

Además, la presente invención se refiere a un ADNc que codifica la proteína ADIF, estando obtenida la proteína ADIF por ingeniería genética usando el ADNc, y un proceso para producir la proteína ADIF.

ADIF que es la proteína de la presente invención puede aislarse y purificarse de forma eficaz a partir de un caldo de cultivo de fibroblastos pulmonares fetales humanos. Aunque no hay limitaciones específicas a los fibroblastos humanos usando como la célula de producción, es particularmente preferible el fibroblasto pulmonar de embrión humano IM R-90 (depositado con ATCC, N° de depósito CCL186). Se provoca que el fibroblasto pulmonar fetal humano se adhiera a trozos de cerámica de alúmina y se cultiva de forma estática en un Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) al que se añade suero de vacas neonatas en un matraz de tipo T o un frasco rotatorio durante una semana a diez días. La proteína ADIF de la presente invención se aísla y purifica de este caldo de cultivo. Como método de aislamiento y purificación, pueden realizarse diversos procesos de purificación usando las características físicas o químicas de la proteína ADIF diana de acuerdo con métodos convencionales que se usan para la purificación de proteínas a partir de muestras biológicas. Como método de concentración, pueden usarse métodos convencionales tales como ultrafiltración, secado por congelación, desalado, y similares. Como medio de purificación, pueden usarse diversas operaciones de purificación habitualmente usadas para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase inversa, electroforesis preparativa, y similares de forma independiente o en combinación. Puede añadirse un tensioactivo cuando la proteína de la presente invención se purifica a partir de un caldo de cultivo. Aunque no hay limitaciones específicas al tensioactivo usando en este caso, preferiblemente se usa CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato) al 0,1%, polisorbato 80 al 0,01%, o polisorbato 20 al 0,01%. De forma particularmente preferible, la proteína ADIF de la presente invención puede aislarse y purificarse procesando el caldo de cultivo en el orden de una columna de heparina, columna de intercambio catiónico-SP, columna de intercambio aniónico-Q, columna de filtración en gel, columna de heparina, columna de intercambio catiónico débil, y columna de fase inversa. La proteína ADIF de la presente invención puede especificarse por las siguientes características biológicas y fisicoquímicas:

(a) Actividad: suprime la diferenciación y/o maduración de adipocitos,

(b) Peso molecular (por SDS-PAGE): tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kD en condiciones no reductoras, y aproximadamente 28 kD y/o 23 kD en condiciones reductoras,

(c) Afinidad: tiene afinidad a heparina,

(d) contiene azúcares,

(e) secuencia de aminoácidos N-terminal:

1	5	10	15												
Gln	His	Cys	Leu	Val	Asn	Ala	Gly	Asp	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Phe	Glu
20	25	30													
Cys	Phe	Glu	Asn	Asn	Xaa	Xaa	Glu								
35	40														

(Xaa indica un aminoácido no identificado).

La proteína ADIF de la presente invención también puede producirse por una técnica de ingeniería genética. Específicamente, se clona un ADNc que codifica esta proteína basada en la información de la secuencia de aminoácidos de ADIF natural obtenido de acuerdo con el método descrito anteriormente, y se provoca que este ADNc exprese un ADIF recombinante génico por una técnica de ingeniería genética. Más específicamente, la secuencia de aminoácidos N-terminal del ADIF natural obtenido por la presente invención se analiza y se prepara una mezcla de oligonucleótidos que pueden codificar esta secuencia. A continuación, se adquieren fragmentos de ADNc de ADIF por el método de PCR (preferiblemente el método de RT-PCR) usando la mezcla de oligonucleótidos como cebador. Puede obtenerse el ADNc de longitud completa de ADIF clonando la biblioteca de ADNc preparada a partir de células IMR-90 usando los fragmentos de ADNc como sonda (Tabla de Secuencias, SEC ID N° 12).

Puede obtenerse una proteína ADIF recombinante génica insertando el ADNc de longitud completa resultante en un vector de expresión para producir un plásmido de expresión de ADIF, insertando el plásmido en diversos microorganismos o células animales, y provocando el se exprese el ADIF. El ADIF recombinante génico obtenido de este modo tiene las mismas características fisicoquímicas que el ADIF natural descrito anteriormente y su secuencia de aminoácidos N-terminal se muestra del siguiente modo (se muestra la misma secuencia en la Tabla de Secuencias, SEC ID N° 3).

Secuencia de aminoácidos N-terminal (Esperada del ADNc):

Ser	Ser	Gln	Gln	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Thr	Ala	Glu	Ile
1				5					10					15	
Gln	His	Cys	Leu	Val	Asn	Ala	Gly	Asp	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Phe	Glu
				20					25					30	
Cys	Phe	Glu	Asn	Asn	Ser	Cys	Glu								
				35					40						

La actividad biológica de ADIF puede determinarse estimando los efectos de supresión de la adipogénesis inducida por dexametasona con retardo de la acumulación de triglicéridos usando una célula pre-adipocito de ratón como una diana de acuerdo con el método de Kodama H. *et al.* (Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, p 83 (1982)).

El factor inhibidor de la adipogénesis (ADIF) que es la proteína de la presente invención es útil como una composición farmacéutica para prevenir o tratar la obesidad o como un antígeno para establecer un diagnóstico inmunológico. ADIF puede administrarse de forma segura a seres humanos y animales. ADIF puede prepararse en una preparación y administrarse por vía oral o parenteral. Los ejemplos de la composición farmacéutica incluyen composiciones para inyección, infusión por goteo, supositorios, agente nasal, agente sublingual, agente de absorción percutánea, y similares. Estas composiciones se formulan de acuerdo con métodos de preparación farmacéutica conocidos usando excipientes, vehículos, estabilizadores, agentes colorantes y/u otros aditivos farmacéuticamente aceptables, y se preparan en preparaciones diana. Cuando se preparan composiciones para inyección, puede mezclarse una cantidad farmacológicamente eficaz del factor inhibidor de la adipogénesis de la presente invención con vehículos o agentes de activación farmacéuticamente aceptables, tales como aminoácidos, sacáridos, derivados de celulosa, y otros compuestos orgánicos/inorgánicos. Además, cuando se prepara una composición para inyección a partir del factor inhibidor de la adipogénesis de la presente invención y dichos vehículos o agentes de activación, puede añadirse un agente de ajuste del pH, agente tamponante, estabilizador, agente solubilizante, y similares, de acuerdo con un método convencional según sea necesario.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle a modo de ejemplos del siguiente modo. Sin embargo, debe observarse que los ejemplos simplemente muestran una ilustración y la invención no restringe a ellos.

Ejemplo 1

Preparación de caldo de cultivo de fibroblastos humanos IMR-90

Se cultivaron fibroblastos pulmonares fetales humanos IMR-90 (depositados en la ATCC, N° de depósito, CCL186) en 80 g de trozos de cerámica de alúmina (alúmina: 99,5%, fabricado por Toshiba Ceramic Corp.) y se cultivaron en frascos rotatorios (490 cm², 110 x 171 mm, fabricados por Corning Co.). El cultivo se realizó usando 40 frascos rotatorios, que contenían cada uno 500 ml de DMEM suplementado con suero sanguíneo de vacas neonatas al 5% y HEPES 10 mM (Gibco BRL), a 37°C en presencia de CO₂ al 5% durante 7 a 10 días sin rotar los frascos. Después de

cultivar, el caldo de cultivo se recogió y se añadió medio reciente para completar un ciclo de cultivo. Se obtuvieron 20 l de caldo de cultivo IMR-90 para cada ciclo de cultivo. El caldo de cultivo se denominó Muestra 1.

Ejemplo 2

Medida de la actividad supresora de la formación de adipocitos

La actividad del ADIF que es la proteína de la presente invención se midió de acuerdo con el método de Kodama H. *et al.* (Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, pág. 83, (1982)). Específicamente, la actividad supresora se determinó estimando la adipogénesis inducida por dexametasona con acumulación de triglicéridos usando una célula MC3T3-G2/PA6 de pre-adipocitos de ratón (RIKEN GENE BANK, RCB1127) como diana. Específicamente, se cargaron 50 μ l de una muestra diluida con α -MEM (Gibco BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las células MC3T3-G2/PA6 de pre-adipocitos de ratón se suspendieron en α -MEM que contenía dexametasona 2×10^{-7} M y suero bovino fetal al 10%, se inocularon en la placa de microtitulación a una concentración celular de $3 \times 10^3/50 \mu$ l/pocillo, y se incubaron durante una semana en condiciones de CO₂ al 5% a 37°C, y humedad del 100%. Después de siete días, se retiró el cultivo por aspiración y se secaron las células para medir la cantidad de triglicéridos acumulados en los adipocitos usando un kit de ensayo de triglicéridos (Triglyceride G-Test Wako, fabricado por Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). La reducción de la OD a 510 nm se tomó como la actividad ADIF.

Ejemplo 3

Purificación de ADIF

i) *Purificación en una columna de heparina-sepharose CL-6B*

Se filtraron aproximadamente 60 l de caldo de cultivo IMR-90 (Muestra 1) con un filtro de 0,22 μ m (Hydrophilic Millidisk, 2.000 cm², fabricado por Millipore Co.) y se dividió en tres partes. Cada parte (20 l) se aplicó a una columna de heparina-sepharose CL-6B (5 x 4,1 cm, volumen de gel 80 ml) equilibrada con un tampón Tris-HCl 10 mM que contenía NaCl 0,3 M (pH 7,5). Después de lavar la columna con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) (a partir de ahora llamado "Tris-HCl") a un caudal de 500 ml/h, la muestra se eluyó con Tris-HCl que contenía NaCl 2 M (pH 7,5) para obtener 1,5 l de una fracción adsorbida en heparina-sepharose CL-6B, que se denomina Muestra 2.

ii) *Purificación en una columna de HiLoad-SP/HP*

La fracción adsorbente de heparina-sepharose (Muestra 2) se dializó frente a Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), suplementado con CHAPS a una concentración final del 0,1%, se incubó a 4°C durante una noche y se dividió en seis partes. Cada parte después se aplicó a una columna de intercambio catiónico (HiLoad-SP/HP, 2,6 x 10 cm, Amasham-Pharmacia Biotech Co.) equilibrada con Tris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 7,5). Después de lavar la columna con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1%, la proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,5 M en 120 minutos a un caudal de 6 ml/min y se recogieron fracciones de 12 ml de tamaño. Usando 30 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se obtuvieron fracciones activas de ADIF (936 ml) eluidas a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,15 a 0,25 M que se obtuvieron y se denominaron Muestra 3.

iii) *Purificación en una columna de HiLoad-Q/HP*

La Muestra 3 resultante se diluyó con 1900 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1% y se dividió en seis partes. Cada parte se aplicó a una columna de intercambio catiónico (HiLoad-Q/HP, 2,6 x 10 cm, Amasham-Pharmacia Biotech Co.) equilibrada con Tris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 7,5). Después de lavar la columna con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1%, la proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,5 M en 120 minutos a un caudal de 6 ml/min y se recogieron fracciones de 12 ml de tamaño. Usando 30 μ l de cada fracción se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción (936 ml) eluida con concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,1 a 0,18 M tenía actividad ADIF y se denominó Muestra 4.

iv) *Purificación en una columna de HiLoad-SP/HP*

La Muestra 4 resultante se diluyó con 1900 ml de BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1% y se dividió en tres partes. Cada parte se aplicó a una columna de intercambio catiónico (HiLoad-SP/HP, 2,6 x 10 cm, Amasham-Pharmacia Biotech Co.) equilibrada con BisTris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 6,0). Después de lavar la columna con BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1%, la proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,1 a 0,6 M en 100 minutos a un caudal de 6 ml/min y se recogieron fracciones de 12 ml de tamaño. Usando 30 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción (460 ml) eluida a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,3 a 0,45 M tenía actividad ADIF y se denominó Muestra 5.

v) *Purificación en una columna de Resource S*

La Muestra 5 resultante se diluyó con 1.080 ml de BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1% y se dividió en tres partes. Cada parte se aplicó a una columna de intercambio catiónico (Resource S, 0,5 x 5 cm, Amasham-Pharmacia Biotech Co.) equilibrada con BisTris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 6,0) en tres partes. Después de lavar la columna con BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1 %, la proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,6 M en 40 minutos a un caudal de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml de tamaño. Usando 10 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción (30 ml) eluida a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,2 a 0,3 M tenía actividad ADIF y se denominó Muestra 6.

vi) *Purificación en una columna de Superose 12*

La Muestra 6 resultante se concentró usando un concentrador de centrifugación (Centricon 10, Millipore Co.) a aproximadamente 600 μ l y se dividió en tres partes. Cada parte se aplicó a una columna de filtración en gel (Superose 12, 1,0 x 60 cm, Amasham-Pharmacia Biotech Co.) equilibrada con Tris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% y NaCl 0,5 M (pH 7,5). Las proteínas se revelaron con Tris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% CHAPS y NaCl 0,5 M NaCl (pH 7,5) a un caudal de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml de tamaño. Usando 10 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción (9 ml) revelada entre aproximadamente 25 a 30 minutos tenía actividad ADIF y se denominó Muestra 7.

vii) *Purificación en una columna de Heparina 5PW*

La Muestra 7 resultante se diluyó con 41 ml de BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1%, y se aplicó a una columna de afinidad de heparina (Heparina 5PW, 0,5 x 5 cm, Tosoh Corporation) equilibrada con BisTris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 6,0). Después de lavar la columna con BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1%, se eluyó la proteína adsorbida con un gradiente lineal de NaCl 0,2 a 0,8 M en 120 minutos a un caudal de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml de tamaño. Usando 10 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción (16 ml) eluida a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,2 a 0,3 M tenía actividad ADIF y se denominó Muestra 8.

viii) *Purificación a una columna de Polycat A*

La Muestra 8 resultante se concentró usando un concentrador de centrifugación (Centricon 10, fabricado por Millipore Co.) a aproximadamente 300 μ l y se diluyó con 600 μ l de BisTris-HCl 50 mM que contenía CHAPS al 0,1% (pH 6,0) y se aplicó a una columna de intercambio catiónico débil (Polycat A, 0,46 x 20 cm, Poly LC Co.) equilibrada. Después de lavar la columna con BisTris-HCl 50 mM (pH 6,0) que contenía CHAPS al 0,1%, se eluyó la proteína adsorbida con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,4 M en 50 minutos a un caudal de 1,0 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml de tamaño (Fig. 2). Usando 10 μ l de cada fracción, se midió la actividad ADIF de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Se descubrió que una fracción de número de fracción 37 a 46 eluida a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,3 a 0,4 M tenía actividad ADIF.

ix) *Purificación en una columna de fase inversa*

Se acidificó un ml de la fracción Polycat A resultante N° 43 con 10 μ l de TFA (ácido trifluoroacético) al 20% y se aplicó a una columna de fase inversa (C4, 2,1 x 250 mm, VYDAC Co.) que se equilibró con acetonitrilo al 30% que contenía TFA al 0,1%. La proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo del 30 al 55% en 50 minutos a un caudal de 0,2 ml/min, y se recogió cada pico de proteína (Figura 3). La actividad ADIF se midió de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 usando 35 μ l de cada fracción de pico. El pico 5 muestra una actividad ADIF dependiente de la concentración.

Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 4

55 *Determinación del peso molecular de la proteína ADIF*

Se sometieron cien μ l de la fracción del pico 5 que muestra la actividad ADIF a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras. Específicamente, se concentraron 50 μ l de la fracción del pico 5 al vacío y se disolvieron en 1,5 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 8) que contenía EDTA 1 mM, SDS al 2,5%, y azul de bromofenol al 0,01%, y se incubaron a 37°C durante una noche en condiciones reductoras (en presencia de 2-mercaptoetanol al 5%) o en condiciones no reductoras a 37°C durante noche, y cada 1 μ l de muestra se analizó por gel en SDS-poliacrilamida por electroforesis. La electroforesis se realizó usando un gel de gradiente de acrilamida del 10-15% (Amasham Pharmacia Biotech Co.) y un dispositivo de electroforesis Phast System (Amasham Pharmacia Biotech Co.).

Se usaron fosforilasa b (94 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), y α -lactalbúmina (14,4 kDa) como marcadores de peso molecular. Después

de la electroforesis, se realizó tinción con plata usando el kit Phast Gel Silver Stain (Amasham Pharmacia Biotech Co.). El peso molecular de la proteína del pico 5 se determinó del siguiente modo. Específicamente, la distancia recogida desde el extremo superior del gel de separación se midió cuando se sometió a electroforesis cada marcador de peso molecular. Se produjo una línea recta patrón representando la distancia recorrida de cada marcador frente al peso molecular (en logaritmo). El peso molecular de la proteína del pico 5 se determinó aplicando la distancia de movimiento medida de la proteína a la línea recta patrón. Los resultados se muestran en la Figura 5. Como puede observarse a partir de los resultados, se detectó una única banda de proteína de 45 kDa en condiciones no reductoras, y se detectaron bandas de proteínas a aproximadamente 28 kDa y 23 kDa en condiciones reductoras.

Ejemplo 5

Retirada de cadenas de azúcar de tipo de unión N de ADIF y determinación del peso molecular

Se concentró una muestra que contenía aproximadamente 0,2 μ g de ADIF purificado usando la columna de fase inversa de acuerdo con el método del Ejemplo 3, ix) al vacío. Se añadió un μ l de tampón fosfato sódico 0,5 M (pH 8,6), 1 μ l de 2-mercaptoetanol 0,5 M, 1 μ l de agua, y 1 μ l de 250 U/ml de solución N-glicanasa (Genzyme Co.) a la muestra. La muestra se agitó minuciosamente y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de la adición de 2 μ l de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 2 mM, SDS al 5%, azul de bromofenol al 0,02%, y 2-mercaptoetanol al 5%, la mezcla se agitó minuciosamente y se incubó a 37°C durante 24 horas. Un μ l de la muestra resultante se sometió a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida de acuerdo con el método del Ejemplo 4, seguido por tinción con plata. Como control, 0,2 μ l de ADIF no tratado preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3, ix) se sometió a la misma electroforesis y tinción con plata. Los resultados se muestran en la Figura 6. Como resultado, el peso molecular aparente de la proteína ADIF que no contiene cadenas de azúcar de tipo de unión N medido por SDS-PAGE en condiciones reductoras fue aproximadamente 18 kD. Como el peso molecular aparente de la proteína ADIF no tratada medido por SDS-PAGE en condiciones reductoras era aproximadamente 23 kD y/o 28 kD, se demostró que ADIF era una glicoproteína que contenía cadenas de azúcar de tipo de unión N en la molécula. La diferencia entre 23 kD y 28 kD en los pesos moleculares aparentes de la proteína ADIF no tratada medidos por SDS-PAGE en condiciones reductoras puede considerarse que se debe a la cantidad de uniones de las cadenas de azúcar de tipo de unión N.

Ejemplo 6

Determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

La muestra de las fracciones de Polycat A N° 37-46 obtenidas en el Ejemplo 3, viii) se concentró usando un concentrador de centrifugación (Centricon 10, Millipore Co.) a aproximadamente 500 μ l, se acidificó con 10 μ l de TFA al 20% y se aplicó a una columna de fase inversa (C4, 2,1 x 250 mm, VYDAC Co.) equilibrada con acetonitrilo 30% que contenía TFA al 0,1%. La proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo del 30 al 55% en 50 minutos a un caudal de 0,2 ml/min y se recogió la fracción proteica correspondiente al pico 5. El pico 5 resultante se concentró al vacío usando un concentrador de centrifugación. La fracción concentrada se disolvió en 0,5 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 8) que contenía EDTA 1 mM, SDS al 2,5%, y azul de bromofenol al 0,01%, y se incubó en condiciones reductoras (en presencia de 2-mercaptoetanol al 5%) a 37°C durante una noche, y se aplicaron 4 μ l de la fracción a gel de SDS-poliacrilamida para electroforesis. La electroforesis se realizó usando gel de gradiente de acrilamida del 10-15% (Amasham Pharmacia Biotech Co.) en un dispositivo de electroforesis Phast System (Amasham Pharmacia Biotech Co.). Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de PVDF (ProBlot, Perkin Elmer Co.) a 20 V y 25 mA usando un dispositivo de transferencia Phast Transfer (Amasham Pharmacia Biotech Co.). Después de la transferencia, la proteína se tiñó con azul de Coomassie al 2%/metanol al 40%/solución de ácido acético al 10%, y se destiñó con una solución de metanol al 60% para retirar los colores excesivos. Las bandas de aproximadamente 23 kDa y 28 kDa se cortaron, y se sometieron a análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal usando un secuenciador de proteínas (Procise, tipo 492, fabricante por Perkin Elmer Co.). Los resultados se muestran en la Tabla de Secuencias SEC ID N° 1.

Cada fracción de las fracciones 37 a 46 de Polycat A obtenidas del mismo modo que se ha descrito anteriormente de aproximadamente 80 l de medio de cultivo IMR-90 se acidificó con 10 μ l de TEA al 20 % y se aplicó a una columna de fase inversa (C4, 2,1 x 250 mm, VYDAC Co.) equilibrada con acetonitrilo al 30% que contenía TFA al 0,1% diez veces. La proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo del 30 al 55% en 55 minutos a un caudal de 0,2 ml/min, y se recogió la fracción proteica correspondiente al pico 5. La proteína resultante del pico 5 estaba piridiletalada en condiciones reductoras y se sometió a análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal usando un secuenciador de proteínas (Procise, tipo 492, fabricante por Perkin Elmer Co.) Como resultado, pudo determinarse una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal al número 40. Los resultados se muestran en la Tabla de Secuencias, SEC ID N° 2.

Ejemplo 7

Clonación de fragmentos de ADNc de ADIF

5 i) Aislamiento de poli(A) + ARN de células IMR-90

Se aislaron aproximadamente 10 µg de poli(A) + ARN de 1 x 10⁸ células IMR-90 usando el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitro Gene Co.) de acuerdo con el manual del kit.

10 ii) Preparación del cebador mixto

Se sintetizaron los siguientes dos cebadores mixtos basados en la secuencia de aminoácidos N-terminal obtenida en el Ejemplo 6 y descrita en la Tabla de Secuencias, SEC ID N° 2. Específicamente, se sintetizaron todos los oligonucleótidos (cebador mixto, TAE/F) que pueden codificar la secuencia de aminoácidos desde el resto 13 (Thr) hasta el resto 19 (Cys) desde el extremo N. Además, se sintetizaron todos los oligonucleótidos complementarios (cebador mixto, CFE/R) que puede codificar la secuencia de aminoácidos desde el resto 29 (Gly) al resto 35 (Glu) desde el extremo N. Las secuencias de bases de los cebadores mixtos usados se muestran en la Tabla 1.

20 TABLA 1

	= TAF/F=ACTGCTGAAA TTCAACACTG					
25		C	C	G	C	G T
		A	A		A	
30		G	G		G	
	= CFE/R=TCAAAACACT CAAAAACACC					
35		G	G	T	G	G G
					C	C
40					T	T

iii) Amplificación de fragmentos de ADNc ADIF por PCR

Se generó un ADNc monocatenario usando el kit de síntesis de ADNc Superscript II (Gibco BRL Co.) y 1 µg de poli(A) + ARN obtenido en el Ejemplo 7, i) de acuerdo con el protocolo de Gibco BRL Co. El fragmento de ADN que codifica ADIF se obtuvo por PCR usando el ADNc y el molde y los cebadores descritos en el Ejemplo 8, ii). La composición de la solución de reacción es la siguiente.

50	Tampón Ex Taq 10X (Takara Shuzo Co., Ltd.)	10 µl
	dNTP 2,5 mM	8 µl
	Solución de ADNc	2,5 µl
	Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.)	1 µl
	Agua destilada	73,5 µl
55	Cebador TAE/F 20 µM	2,5 µl
	Cebador CFE/R 20 µM	2,5 µl

Las soluciones anteriores se mezclaron en un tubo de microcentrífuga y se realizó la PCR en las siguientes condiciones. Después del pre-tratamiento a 95°C durante 3 minutos, se repitió 40 veces una reacción de 3 etapas compuesta por las etapas a 95°C durante 30 segundos, a 50°C durante 30 segundos, y a 72°C durante un segundo. Después, la mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 72°C. Se analizó una parte de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se acidificó un fragmento de ADNc de aproximadamente 68 pb que se esperaba de la secuencia de aminoácidos N-terminal.

Ejemplo 8

Clonación del fragmento de ADNc de ADIF amplificado por PCR y determinación de su secuencia de ADN

- 5 El fragmentos de ADNc obtenido en el Ejemplo 7, iii) se insertó en el Tvector pT7 (Novagen Co.) usando un kit de ligamiento de ADN Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) y se transformó *Escherichia coli* XL2Blue (Stratagene Co.) con la reacción de ligamiento. Los transformantes resultantes se amplificaron y se purificó el plásmido que contenía el ADNc de ADIF (aproximadamente 68 pb) de acuerdo con un método convencional. Este plásmido se llamó pBSADIF. La secuencia de ADNc de ADIF en este plásmido se determinó usando un kit de secuenciación de ADN (Perkin Elmer).
- 10 La secuencia de aminoácidos de los 23 aminoácidos predichos a partir de esta secuencia podría encontrarse en la secuencia de aminoácidos N-terminal (Tabla de Secuencias, SEC ID N° 2) de ADIF que se usó para diseñar los cebadores mixtos. En base a los resultados anteriores, se confirmó que el ADNc de 68 pb clonado era un fragmentos de ADNc de ADIF.

15 Ejemplo 9

Preparación de sonda de ADN

- 20 El fragmento de ADNc de ADIF se amplificó por PCR en las condiciones del Ejemplo 6, iii) usando el fragmento de ADNc de ADIF de 68 pb insertado en el plásmido preparado en el Ejemplo 8 como molde. El fragmento de ADNc de ADIF con aproximadamente 68 pb se sometió a una electroforesis en gel de agarosa preparativa, y se purificó usando un kit de aislamiento QIAEXIIDNA (Qiagen Co.). Este ADNc se marcó con plásmido [α 32P]dCTP usando un kit de marcaje de ADN megaprime (Amasham Pharmacia Biotech Co.) y se usó como sonda para seleccionar el ADNc de ADIF de longitud completa.

25 Ejemplo 10

Preparación de biblioteca de ADNc

- 30 Se sintetizó al ADNc usando 2,5 μ g de la poli (A) + ARN obtenido en el Ejemplo 7, i) cebador oligo (dT), y el kit de síntesis de ADNc Greatlength (fabricado por Clonetech Co.) de acuerdo con el protocolo de Clonetech Co., se ligó el adaptador *EcoRI-SalI-NotI* al ADNc y se separó el ADNc por fraccionamiento de tamaño. Se precipitó el ADNc purificado con etanol y se disolvió en 10 μ l de una solución tampón TE. El ADNc resultante con el adaptador (0,1 μ l) se insertó por ADN ligasa T4 en un vector de expresión λ ZAP (Stratagene Co.) que se había digerido previamente con *EcoRI*. El ADN del fago recombinante resultante que contenía el ADNc se empaquetó in vitro usando Gigapack Gold II (Stratagene Co.) y se preparó una biblioteca de fagos de expresión de λ ZAP recombinante.

Ejemplo 11

40 *Selección de fago recombinante*

- El fago recombinante obtenido en el Ejemplo 10 se infectó con *Escherichia coli* XL1-Blue MRF (Stratagene Co.) durante 15 minutos a 37°C. Las células de *Escherichia coli* infectadas se añadieron a un medio NZY a 50°C que contenía agar al 0,7% y se sembraron en placas de agar NZY. Después de incubación a 37°C durante una noche, se unió Hybond N (Amasham Pharmacia Biotech Co.) a la superficie de la placa que contenía Plague durante aproximadamente 30 minutos. El filtro se desnaturalizó en solución alcalina, se neutralizó, y se lavó en 2XSSC de acuerdo con un método convencional. El ADN del fago se inmovilizó en el filtro por reticulación con UV (Stratagene Co.). El filtro se incubó en un tampón de hibridación rápida que contenía 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón (Amasham Co.) a 65°C durante 1 hora y después se incubó durante una noche en el mismo tampón que contenía 2 x 10⁵ cpm/ml de sonda de ADN desnaturalizada preparada en el Ejemplo 9. Después de la reacción, se lavó el filtro dos veces con 2XSSC, dos veces con 0,1XSSC, y dos veces con una solución de SDS al 0,1%, cada una a 65°C durante 10 minutos. El filtro lavado se unió a un película de rayos X y se dejó reposar durante una noche a -80°C. Los clones positivos se seleccionaron por revelado de la película de rayos X. Algunos clones positivos obtenidos se purificaron seleccionando una vez más. Entre estos clones, se usaron los que contienen un inserto de ADN de aproximadamente 2,0 kb en los siguientes experimentos. El fago purificado y el fago auxiliar ExAssisi (Stratagene Co.) se introdujeron por infección en *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene Co.) usando un kit de clonación de expresión λ ZAP (Stratagene Co.) de acuerdo con el protocolo de Stratagene Co. Se preparó el caldo de cultivo de XLI-Blue MRF' infectadas. El caldo que contenía los fagómidos escindidos se introdujo por infección en *Escherichia coli* XL0LR (Stratagene Co.) y se obtuvo el transformante que tiene el plásmido que contiene pBKADIF que consta de pBKCMV (Stratagene Co.) con el inserto de 2,0 kb mencionado anteriormente recogiendo las colonias resistentes a kanamicina. El transformante se depositó en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, el 11 de agosto de 1998, con el número de depósito FERM BP-6459 con el nombre de XL0LR/pBKADIF. La solución madre de transformante que tiene este plásmido se amplificó y se purificó el plásmido de acuerdo con el protocolo convencional.

65

Ejemplo 12

Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc de ADIF que codifica la región codificante completa

La secuencia de nucleótidos del ADNc de ADIF obtenida en el Ejemplo 11 se determinó usando un kit de secuenciación de ADN (Perkin Elmer Co.). Los cebadores usados fueron los cebadores T3, T7 (Stratagene Co.) y cebadores sintéticos diseñados de acuerdo con la secuencia de ADNc de ADIF, cuyas secuencias se muestran en la Tabla de Secuencias, SEC ID N° 4-11. La secuencia de nucleótidos del ADNc de ADIF determinada de este modo y la secuencia de aminoácidos correspondiente predicha por la secuencia de ADNc se muestran en las SEC ID N° 12 y 13 de la Tabla de Secuencias respectivamente.

Ejemplo 13

Producción de ADIF recombinante a partir de células 293/EBNA

15

i) Construcción del plásmido para expresar ADIF

El plásmido pBKADIF obtenido en el Ejemplo 10 se digirió con la enzima de restricción, Sall. El inserto de ADNc de ADIF se cortó, se separó por electroforesis en gel de agarosa, y se purificó usando un kit de aislamiento QIAEXIIDNA (Qiagen Co.). El ADNc de ADIF purificado se ligó usando un kit de ligamiento Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) al plásmido de expresión pCEP4 (Invivo Gene Co.) previamente digerido con la enzima de restricción *XhoI* y se transformó *E. coli* DH5 α (Gibco BRL Co.) tratado con fosfatasa alcalina con la mezcla de ligamiento. Los transformantes resultantes se cultivaron y se purificó el plásmido pCEPADIF que contenía el ADNc de ADIF usando QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen Co.). El plásmido de expresión de ADIF pCEPADIF se precipitó con etanol y el precipitado se disolvió en agua destilada esterilizada a usar para los siguientes experimentos.

ii) Expresión transitoria de ADNc de ADIF y análisis de la actividad biológica de ADIF recombinante

Se produjo ADIF recombinante usando el plásmido de expresión de ADIF pCEPADIF preparado en el Ejemplo 13, i) de acuerdo con el siguiente método y su actividad biológica medida se suspendieron 2×10^5 células 293/EBNA (Invitro Gene Co.) en IMDM (Gibco BRL Co.) que contenía suero bovino fetal al 10% (Gibco BRL Co.) y se inocularon en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. En el siguiente día, se mezclaron pCEPADIF y un reactivo de transfección FuGENETM6 (Roche Diagnostic Co.) previamente diluido con IMDM, y la mezcla se añadió a las células en cada pocillo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes adjunto al FuGENETM6. Se usaron 0,5 mg del pCEPADIF y 1 μ l de FUGENETM6 para cada transfección. Después de 72 horas, se recogió el medio condicionado y se usó para la determinación de la actividad ADIF. La actividad ADIF se determinó por el siguiente método. Específicamente, se midió la formación de adipocitos inducida por dexametasona mediante acumulación de triglicéridos usando preadipocitos de ratón MC3T3-G2/PA6 como células diana para determinar la actividad supresora. Más específicamente, se pusieron 50 μ l de la muestra diluida con α -MEM (Gibco BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se inocularon células preadipocitos de ratón MC3T3-G2/PA6 (3×10^3), suspendidas en 50 μ l de α -MEM que contenía dexametasona 2×10^{-7} M y suero bovino fetal al 10%, en la placa de microtitulación y se incubaron durante una semana en condiciones de CO₂ al 5% a 37°C y humedad del 100%. Después de siete días, se retiró el medio por aspiración y las células se secaron al aire para medir la cantidad de triglicéridos acumulados en los adipocitos usando un kit de ensayo de triglicéridos (Triglyceride G-Test Wako, N° de Código 274-69802, fabricado por Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). La disminución de la OD a 510 nm se tomó como la actividad ADIF. Como resultado, como se muestra en el Tabla 2, se confirmó que el caldo de cultivo de células 293/EBNA transfectadas con el gen de ADIF mostraba la misma actividad que ADIF natural previamente obtenido del caldo de cultivo de IMR-90.

50

TABLA 2

55

60

Proporción de dilución	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Gen de ADIF transfectado	0,141	0,130	0,109	0,089	0,067
Vector transfectado	-0,009	0,009	-0,007	0,005	0,015
No tratado	0,001	0,009	-0,018	0,013	0,016
(Disminución de la OD a 510 nm, $\Delta 510$ nm)					

65

Ejemplo 14

Determinación de la actividad ADIF usando células 3T3/LI

La actividad ADIF se evaluó estimando los efectos de supresión de la adipogénesis inducida por dexametasona y 1-metil-3-isobutil-xantina con acumulación de triglicéridos usando células preadipocitos precursores de ratón 3T3-LI (Depositadas en la ATCC, N° de Depósito CL173) como células diana. Específicamente, se pusieron 50 μ l de la muestra diluida con α -MEM (Gibco BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se suspendieron las células de reserva preadipocitos de ratón 3T3-LI (5×10^3) en 50 μ l de medio α -MEM que contenía dexametasona 4×10^{-7} M, 1-metil-3-isobutil-xantina 2×10^{-5} M, y suero bovino fetal al 10%, se inocularon en la placa de microtitulación y se incubaron durante una semana en condiciones de CO₂ al 5% a 37°C y humedad del 100%. Después de siete días, se retiró el medio por aspiración y las células se secaron al aire para medir la cantidad de triglicéridos acumulados en los adipocitos usando un kit de ensayo de triglicéridos (Triglyceride G-Test Wako, N° de Código 274-69802, fabricado por Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). La disminución de la OD a 510 nm se tomó como la actividad ADIF. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, también se confirmó que el caldo de cultivo de las células 293/EBNA transfectadas con el gen de ADIF mostraba la actividad ADIF cuando se usaban células 3T3-LI como célula diana.

TABLA 3

Proporción de dilución	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Gen de ADIF transfectado	0,106	0,103	0,079	0,065	0,053
Vector transfectado	-0,042	-0,021	0,013	0,011	0,010
No tratado	0,045	-0,034	0,002	-0,030	-0,004
(Disminución de la OD a 510 nm, Δ 510 nm)					

Ejemplo 15

Preparación de ADIF-FLAG(+ XhoI)

(I) Adición de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI y la secuencia codificante de FLAG

Se añadieron una secuencia que reconoce la enzima de restricción XhoI y una secuencia que codifica FLAG inmediatamente después de la secuencia que codifica la Arg 265 que es el extremo C de la secuencia de aminoácidos de ADIF descrita en la SEC ID N° 13. Se añaden diez aminoácidos, Leu, Glu, Asp, Tyr, Lys, Asp, Asp, Asp, y Lys, después la Arg 265 por esta secuencia. La mutagénesis se realizó por el método de PCR. Las secuencias de los cebadores usados para la mutagénesis se muestran en la Tabla 4 y las SEC ID N° 14-19.

TABLA 4

ADFY1Hd	5'-GGGGGAAGCTTGCGGCGAAGGAGGAAGAGG-3'
ADFL2R	5'-GGCTCGAGGGCATGGGCGTTTGGGTGG-3'
ADFL3R	5'-GGCTCGAGTGCTTCCCCGTGGTGGGCC-3'
ADFL4R	5'-GGCTCGAGGGTGCAGAAGCTCAAGATG-3'
ADFL5R	5'-GGCTCGAGCCCACAGGTCAGCAGCAAG-3'
ADFL6R	5'-GGGGGTGCGAGGTTCTCCTGGGCAGCCGCGCACAG-3'

La PCR se realizó en las siguientes condiciones.

ES 2 288 016 T3

Después de la reacción durante 3 minutos a 95°C, 1 minuto a 55°C, y 3 minutos a 72°C, se repitió 25 veces una reacción de 3 etapas compuesta por las reacciones durante un minuto a 96°C, un minuto a 55°C, y tres minutos a 72°C. Después, se incubó la mezcla de reacción durante cinco minutos a 72°C. La composición de la solución de reacción de PCR se muestra a continuación.

La solución de reacción de PCR para mutagénesis

Ex Taq polimerasa (Takara Shuzo Co., Ltd.)	0,5 μ l
Tampón Ex Taq 10x (Takara Shuzo Co., Ltd.)	10 μ l
Solución dNTP 2,5 mM	8 μ l
Vector plasmídico molde (pCEPADIF 40 ng/ μ l)	1 μ l
Cebador 0,1 M (ADFY1 Hd)	1 μ l
Cebador 0,1 M (ADFLSXR)	1 μ l
Agua destilada esterilizada	78,5 μ l

El ADN obtenido por PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa y se extrajo con 20 μ l de agua destilada esterilizada usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII (Qiagen Co.). Se trataron diez μ l de una solución que contenía el ADN extraído con la enzima de restricción *Hind*III (Takara Shuzo Co., Ltd.) y *Sal*I (Takara Shuzo Co., Ltd.) para digerir el ADN. La solución de ADN se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1,5% y el ADN diana se extrajo con 20 μ l de agua destilada esterilizada usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII (Solución de ADN 1).

(II) Construcción del vector de expresión ADIF-FLAG(+ *Xho*I)

Se digirió pCEP4 con la enzima de restricción *Hind*III y *Xho*I (Takara Shuzo Co., Ltd.) y se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1,0%. Se extrajo un fragmento de ADN con aproximadamente 10 kpb usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII (Solución de ADN 2).

Se añadieron cuatro μ l de la solución del kit de ligamiento de ADN Ver. 2I (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 3 μ l de Solución de ADN 1 y 1 μ l de Solución de ADN 2, y la mezcla se sometió a una reacción de ligamiento manteniéndola a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *Escherichia coli* DH5 α usando la solución de reacción resultante. La estructura de ADN de *Escherichia coli* transformado que era resistente a ampicilina se analizó para seleccionar los transformantes que tenían el plásmido diana. El análisis de la estructura de ADN se realizó midiendo la longitud del fragmento obtenido por digestión con enzima de restricción y determinando la secuencia de ADN. El vector de expresión se llamó pCEP4 ADIF-FLAG(+ *Xho*I).

(III) Preparación de vector de expresión mutante

Se cultivó *Escherichia coli* que tenía pCEP4-ADIF-FLAG (+*Xho*I) en 25 ml de medio LB (bacto-triptona al 1%, bacto-extractos de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) y se purificó por el kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen Co.). el vector de expresión se precipitó con etanol y se disolvió el precipitado en 50 μ l de agua destilada esterilizada a usar para el siguiente experimento.

Ejemplo 16

Preparación de mutante de delección C-terminal

(I) Mutagénesis del mutante de delección C-terminal

Se prepararon mutantes que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la SEC ID N° 13, pero está delecionada en las secuencias de Arg 236 a Arg 265, de Gly 206 a Arg 265, de Ser 176a Arg 265, de Glu 146 a Arg 265, o de Thr 116a Arg 265. Los mutantes con delección de las secuencias de Arg 236 a Arg 265, de Gly 206 a Arg 265, de Ser 176 a Arg 265, de Glu 146a Arg 265, y de Thr 116a Arg 265se llamaron respectivamente ADIF-R1, ADIF-R2, ADIF-R3, ADIF-R4, y ADIF-R5.

La mutagénesis para la preparación de los mutantes se realizó por el método de PCR. Los cebadores usados para la mutagénesis se muestran en la Tabla y las secuencias de los cebadores se muestran en las SEC ID N°. La PCR se realizó en las siguientes condiciones. Después de la reacción durante 3 minutos a 97°C, 1 minuto a 55°C, y 3 minutos a 72°C, se repitió 25 veces una reacción de 3 etapas compuesta por las reacciones durante un minuto a 96°C, un minuto a 55°C, y tres minutos a 72°C. Después, la mezcla de reacción se incubó durante cinco minutos a 72°C. La composición de la solución de reacción de PCR se muestra a continuación.

ES 2 288 016 T3

La solución de reacción de PCR para la mutagénesis de delección C-terminal

	Ex Taq polimerasa (Takara Shuzo Co., Ltd.)	0,5 μ l
5	Tampón Ex Taq 10x (Takara Shuzo Co., Ltd.)	10 μ l
	Solución dNTP 2,5 mM	8 μ l
	Vector plasmídico molde (pCEPADIF 40 ng/ μ l)	1 μ l
	Cebador 0,1 M (ADFY1 Hd)	1 μ l
10	Cebador de mutagénesis 0,1 M	1 μ l
	Agua destilada esterilizada	78,5 μ l

El ADN obtenido por el método de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa y se extrajo con 20 μ l de agua destilada esterilizada usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII. Se trataron diez μ l de una solución que contenía ADN extraído con la enzima de restricción *Hind*III y *Sal*I para digerir el ADN. La solución de ADN se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1,5% y se extrajo el fragmento de ADN diana con 20 μ l de agua destilada esterilizada usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII (Solución de ADN 3).

(II) Construcción del vector de expresión mutante

Se digirió pCEP4-ADIF-FLAG(+ *Xho*I) con la enzima de restricción *Hind*III y *Xho*I y se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1,0%. Se extrajo un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 10 kpb usando el kit de Extracción de Gel QIAEXII (Solución de ADN 4).

Se añadieron cuatro μ l de solución de kit de ligamiento de ADN Ver. 2I a 3 μ l de Solución de ADN 3 y 1 μ l de Solución de ADN 4, y la mezcla se sometió a una reacción de ligamiento manteniéndola a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *Escherichia coli* DH5 α usando la solución de reacción resultante. La estructura de ADN de *Escherichia coli* transformada que era resistente a ampicilina se analizó para seleccionar el transformante que tenía el plásmido diana. El análisis de la estructura de ADN se realizó midiendo la longitud del fragmento obtenido por digestión con enzima de restricción y determinando la secuencia de ADN. Los vectores de expresión para ADIF-R1, ADIF-R2, ADIF-R3, ADIF-R4 y ADIF-R5 se llamaron respectivamente pCEP4-ADIF-R1, pCEP4-ADIF-R2, pCEP4-ADIF-R3, pCEP4-ADIF-R4, y pCEP4-ADIF-R5.

(III) Preparación de vector de expresión mutante

Se cultivó *Escherichia coli* que tenía el vector de expresión mutante en 25 ml de medio LB y se purificó por el kit QIAGEN Plasmid Midi. Cada vector de expresión se precipitó con etanol y el precipitado se disolvió en 50 μ l de agua destilada esterilizada a usar para el siguiente experimento.

Ejemplo 17

Expresión transitoria de ADIF-FLAG(+ *Xho*I) y ADNc mutante

Se suspendieron 2 x 10⁶ células 293-EBNA en 20 ml de IMDM que contenía suero bovino fetal al 10%, se pagaron en un matraz de cultivo de 75 cm², y se cultivaron durante 24 horas en CO₂ a 37°C. Se añadieron cien ml de FuGENE6 (Roche Diagonostic) a 3,5 ml de medio IMDM libre de suero. La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió gota a gota a una solución que contenía 35 μ g de ADIF-FLAG (+ *Xho*I). La mezcla resultante se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió gota a gota a las células en los cinco matraces de 75 cm², de 700 μ l cada uno, introduciendo por transfección de este modo el vector de expresión en las células. Se aplicó el mismo procedimiento a los otros vectores de expresión mutantes. Las células transfectadas con los vectores de expresión se incubaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Después de cultivar, se añadieron 20 ml de IMDM libre de suero, reciente y las células se cultivaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante 48 horas. Se recogió el caldo de los matraces de cultivo, se añadieron 20 ml de IMDM libre de suero, reciente, a los matraces de cultivo, y se continuó cultivando las células en un incubador de CO₂ a 37°C durante 48 horas. El caldo de cultivo se recogió y combinó con el caldo de cultivo recogido previamente para obtener un total de 200 ml de caldo de cultivo.

Ejemplo 18

Purificación de ADIF-FLAG(+ *Xho*I) y mutantes

Se purificó ADIF-FLAG(+ *Xho*I) y mutantes de 200 ml del caldo de cultivo obtenido de las células de expresión transitoria. En la purificación, se adsorbieron específicamente ADIF-FLAG(+ *Xho*I) y mutantes en y se eluyeron de un vehículo de gel que contenía un anticuerpo anti-FLAG (M2, Sigma Co.) como ligando.

Se cargó un ml del gel suspendido en TBS/T (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,01% (Sigma Co.)) en 8 tubos de centrifuga (volumen: 50 ml). Se añadieron veinte ml del caldo de cultivo recogido a cada tubo y la mezcla se giró suavemente a 4°C durante 24 horas para provocar que se adsorbieran ADI F-FLAG(+ *Xho*I) y

los mutantes al anticuerpo. Los geles precipitados por centrifugación se recogieron en un tubo de centrifuga (Volumen: 15 ml). El gel se lavó suspendiéndolo en 10 ml de TBS/T y centrifugando la suspensión. Después de lavar tres veces, el gel se suspendió en 5 ml de un tampón de elución (Glicina-HCl 0,1 M (pH 2,8), NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,01%) y se centrifugó para recoger la solución eluida. Este procedimiento se repitió para obtener 10 ml de la solución eluida en total. La solución eluida se neutralizó con la adición de 100 μ l de Tris 3 M. La solución eluida se reemplazó con un tampón fosfato sódico (fosfato sódico 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,3 M) usando Centriplus 10 (Millipore Co.) y se ajustó la concentración de proteína a 32 μ g/ml con el mismo tampón.

Ejemplo 19

Análisis usando SDS-PAGE

El ADIF-FLAG (+ *Xho*I) purificado y los mutantes se sometieron a SDS-PAGE. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras usando Phast System (Amasham Pharmacia Biotech Co.). El ADIF-FLAG(+ *Xho*I) purificado y los mutantes, 60 ng cada uno, se sometieron a un gel de gradiente del 10-15% (Amasham Pharmacia Biotech Co.) para electroforesis.

Como resultado, cada peso molecular de ADIF-FLAG(+ *Xho*I) y los mutantes fue casi uniforme con el basado en las secuencias de nucleótidos. La pureza fue de más del 90%.

Ejemplo 20

Medida de la actividad

Se inocularon células 3T3-L1 suspendidas en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% (DMEM-FCS) a una concentración de 5×10^4 células/ml en una placa de 96 pocillos en la cantidad de 100 μ l/pocillo, y se cultivaron en un incubador de CO₂ durante 96 horas a 37°C. Para diferenciar las células confluentes en adipocitos, se reemplazó el medio en la placa de 96 pocillos con DMEM-FCS que contenía 1-metil-3-isobutil-xantina 5×10^{-4} M y dexametasona 1×10^{-6} M y las células se cultivaron durante 48 horas en un incubador de CO₂ a 37°C. Se añadió DMEM-FCS al medio de cultivo para preparar las concentraciones de ADIF-FLAG (+ *Xho*I) o los mutantes de 200 ng/ml a 6,4 μ g/ml. Después de cultivar durante 48 horas, se retiró el medio y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de DMEM-FCS que contenía ADIF-FLAG(+ *Xho*I) o los mutantes en la misma concentración que anteriormente. El cultivo se continuó en un incubador de CO₂ a 37°C durante cinco días, y las células se diferenciaron en adipocitos. Después de cultivar, se examinó la actividad inhibidora de la adipogénesis (actividad ADIF) de las células en la placa de 96 pocillos, que se secó minuciosamente después de retirar el caldo de cultivo, usando el Triglyceride-G Test Wako (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). La disminución de la absorbancia encontrada en una muestra a partir de la absorbancia a 510 nm en el pocillo en sin mutantes se tomó como la actividad ADIF de la muestra.

Los resultados se muestran en la Figura 7. La medida de la actividad se realizó dos veces para cada muestra y se muestra el valor medio de las dos medidas. Los mutantes ADIF-R1, ADIF-R2 y ADIF-R3 mostraron casi la misma actividad específica que ADIF-FLAG (+ *Xho*I). La actividad específica de ADIF-R4 fue menor de 1/30 de la de ADIF-FLAG (+ *Xho*I). ADIF-R5 no mostró actividad ADIF incluso a una concentración de 6,4 μ g/ml.

Aplicabilidad industrial

Se proporciona un factor inhibidor de la adipogénesis (ADI F) que es una nueva proteína que tiene una actividad que suprime la diferenciación y/o maduración de adipocitos; un proceso para producir la proteína cultivando fibroblastos humanos y purificándolos del caldo de cultivo usando cromatografía en columna de intercambio iónico, columna de afinidad, y columna de fase inversa; y un proceso para producir de forma eficaz la proteína cultivando los fibroblastos humanos usando trozos de cerámica de alúmina como un vehículo de adhesión celular. También se proporciona un ADNc que codifica la proteína y un proceso para producir la proteína usando el ADNc. La proteína de la presente invención es útil como una composición farmacéutica para prevenir o tratar la obesidad o como un antígeno para establecer un diagnóstico inmunológico.

Observaciones a microorganismos depositados

Nombre y dirección de la organización en la que se han depositado los microorganismos:

Nombre: National Institute of Bioscience and Human-Technology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries

Dirección: 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (Código Postal: 305-8566).

Fecha de deposición: 11 de agosto de 1998

Número de depósito dado por la organización de deposición: FERM BP-6459

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína aislada de fibroblastos pulmonares fetales humanos; que se purifica de un caldo de cultivo de fibro-
blastos pulmonares fetales humanos por cromatografía usando columna de intercambio iónico, columnas de afinidad
de heparina y columnas de fase inversa; y que se **caracteriza** por las siguientes propiedades:
 - a) tiene una actividad que suprime la diferenciación y/o maduración de adipocitos,
 - 10 b) tiene un peso molecular por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de aproximadamente 45 kD en condi-
ciones no reductoras, y aproximadamente 28 kD y/o 23 kD en condiciones reductoras,
 - c) muestra afinidad a heparina de acuerdo con un intervalo específico de concentraciones de NaCl,
 - 15 d) contiene cadenas de azúcar unidas a N, que se retiran para formar una proteína con PM de aproximadamente 18
kD por SDS-PAGE en condiciones reductoras, y
 - e) está compuesta por la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 13.
- 20 2. Un método para producir la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cultivar fibroblastos
pulmonares fetales humanos en trozos de cerámica de alúmina y purificar la proteína del caldo de cultivo por cromatografía usando columnas de intercambio iónico, columnas de afinidad de heparina y columnas de fase inversa.
- 25 3. Un polipéptido recombinante que comprende los restos aminoácídicos 1 a 175 de la secuencia de aminoácidos
de la SEC ID N° 13; tiene una actividad para suprimir la diferenciación y/o maduración de adipocitos; y se produce
usando la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 12 por una técnica de ingeniería genética.
4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene los restos aminoácídicos 1-175; 1-205; 1-235 ó 1-
265 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 13.
- 30 5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, que se produce en células de mamífero como células hospede-
doras por una técnica de ingeniería genética.
6. Una composición farmacéutica para suprimir la diferenciación y/o maduración de adipocitos, que comprende la
35 proteína de la reivindicación 1 o el polipéptido recombinante de las reivindicaciones 3, 4 ó 5.
7. Uso de la proteína de la reivindicación 1 o el polipéptido recombinante de las reivindicaciones 3, 4 ó 5 en la
fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la obesidad.

Fig. 1

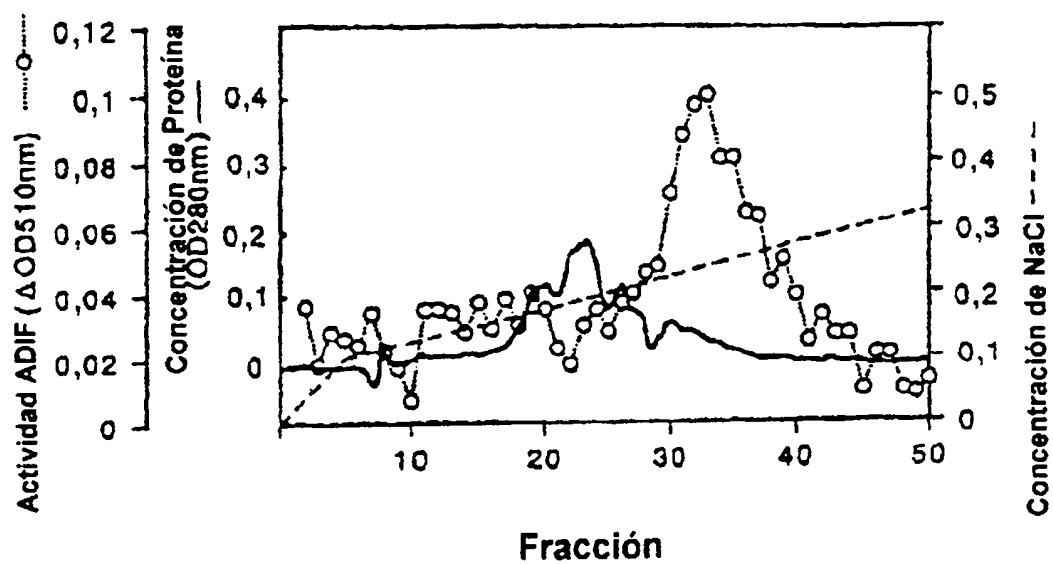


Fig. 2

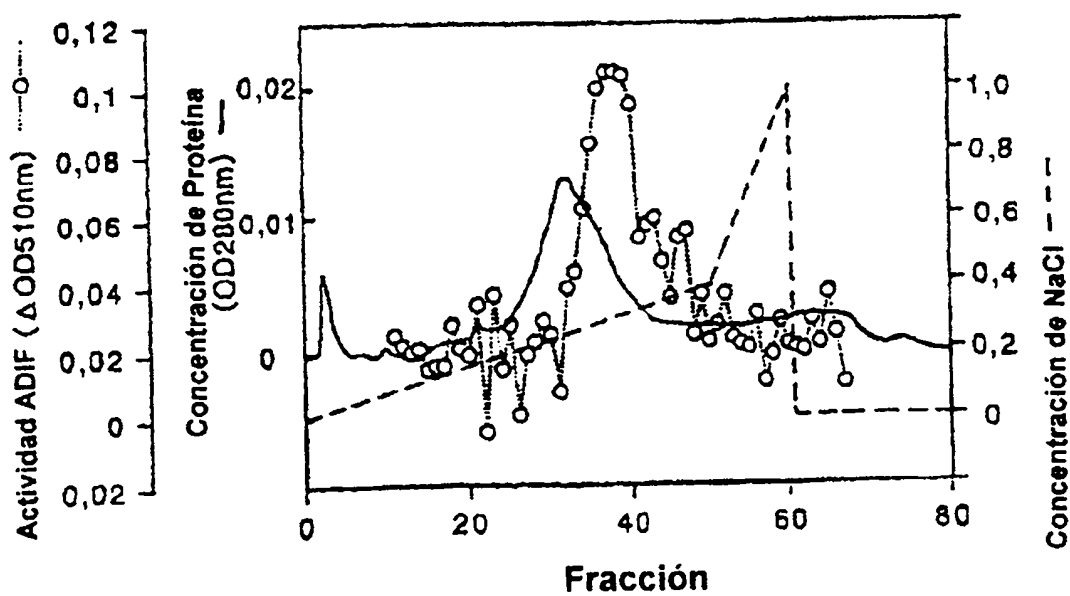


Fig. 3

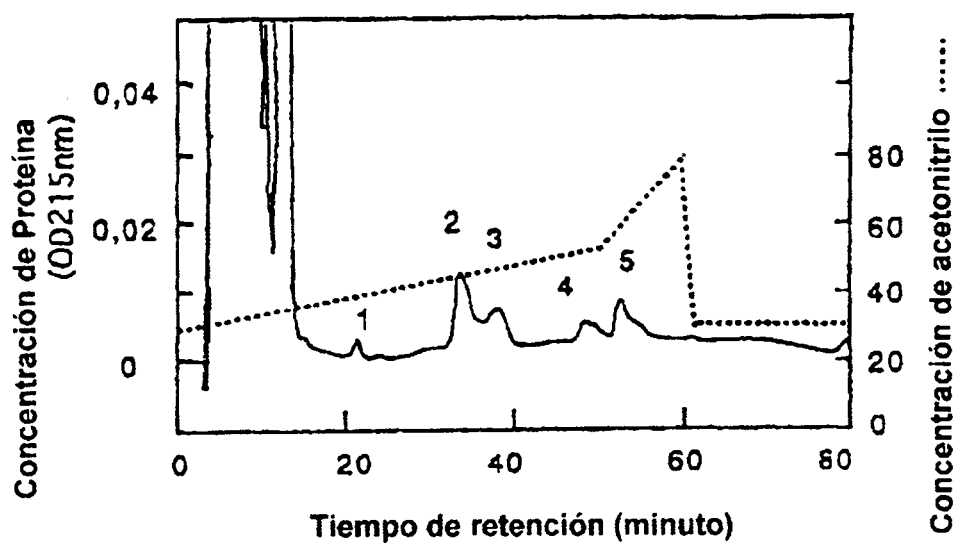


Fig. 4

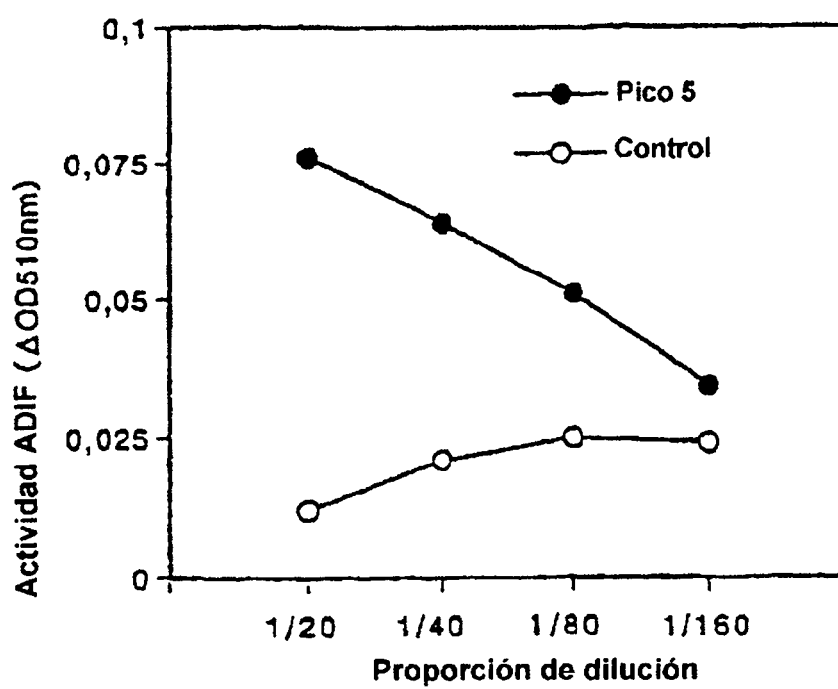


Fig. 5

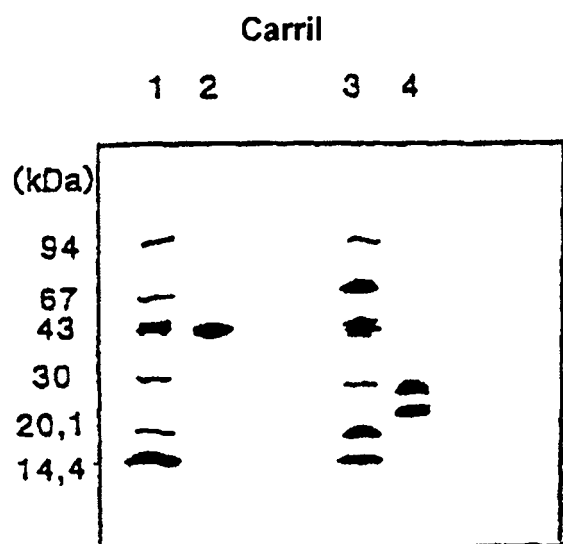


Fig. 6

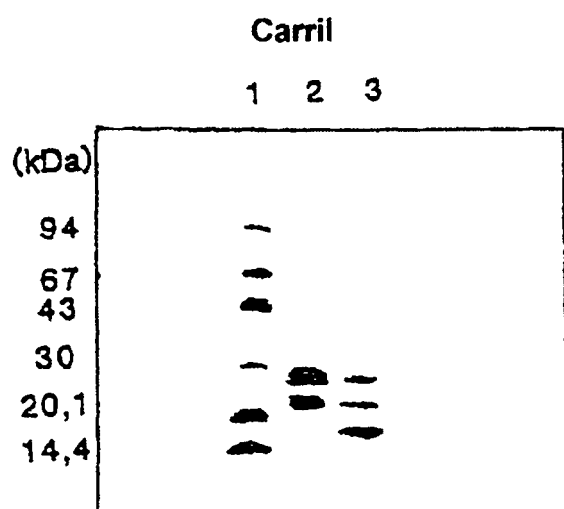
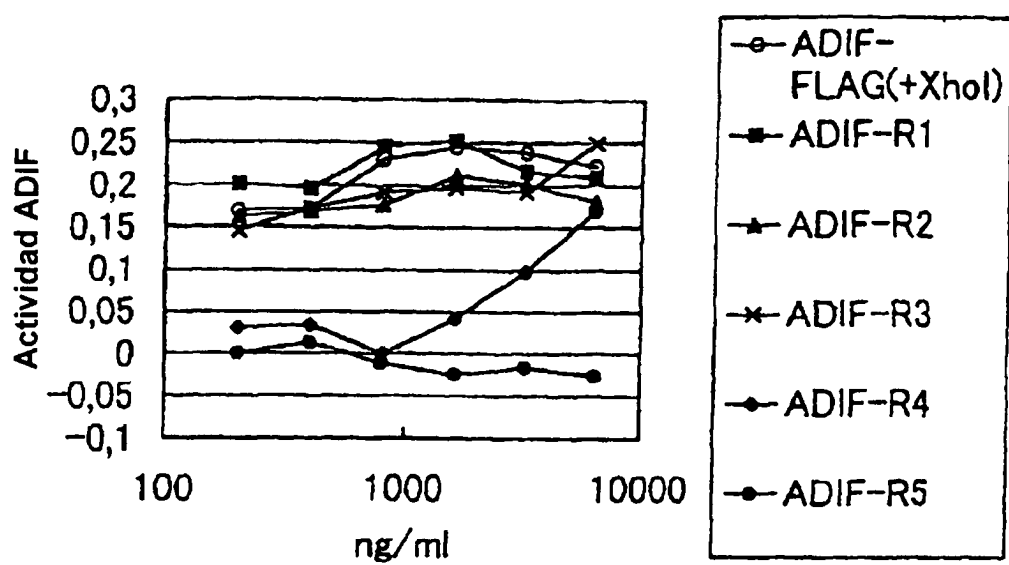


Fig. 7



ES 2 288 016 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

5 <120> Nueva proteína y procesos para producir la misma

<130> SNOW-126/42445

10 <140>PCT/JP99/01906

<141> 09-04-1999

<150> JP 10-99741

15 JP 10-243355

<151> 10-04-1998

28-08-1998

20 <160> 19

<210> 1

25 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

30 <400> 1

Xaa Xaa Gln Gln Xaa Gly Arg Leu Xaa Leu Gln Asn Thr Ala Glu Ile
1 5 10 15

35 Gln His Xaa Leu
20

<210> 2

<211> 40

40 <212>PRT

<213> *Homo Sapiens*

45 <400> 2

Xaa Ser Gln Gln Lys Gly Arg Leu Ser Leu Gln Asn Thr Ala Glu Ile
1 5 10 15

50 Gln His Cys Leu Val Asn Ala Gly Asp Val Gly Cys Gly Val Phe Glu
20 25 30

Cys Phe Glu Asn Asn Xaa Xaa Glu
35 40

55 <210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

60

65

ES 2 288 016 T3

<400> 3	Ser Ser Gln Gln Lys GLy Arg Leu Ser Leu Gln Asn Thr Ala Glu Ile 1 5 10 15 Gln His Cys Leu Val Asn Ala Gly Asp Val Gly Cys Gly Val Phe Glu 20 25 30 Cys Phe Glu Asn Asn Ser Cys Glu 35 40	
<210> 4	<211> 20	
<212> ADN	<213> Secuencia Artificial	
<220>	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
<400> 4	AATTAACCCCT CACTAAAGGG	20
<210> 5	<211> 22	
<212> ADN	<213> Secuencia Artificial	
<220>	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
<400> 5	GTAATACGAC TCACTATAGG GC	22
<210> 6	<211> 20	
<212> ADN	<213> Secuencia Artificial	
<220>	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
<400> 6	AAGAGGGGAG CACAAAGGAT	20
<210> 7	<211> 20	
<212> ADN	<213> Secuencia Artificial	
<220>	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	

ES 2 288 016 T3

	<400> 7	
	GTCCCTGCAG AATACAGCGG	20
5	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
15	<400> 8	
	CAAGGACTTG CTGCTGCACG	20
20	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado.	
30	<400> 9	
	TGGACGGCGT GGAGGAAAGA	20
35	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
45	<400> 10	
	GCTCAAGATG GAGCACAGGC	20
50	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
60	<400> 11	
	GTTGTGCAGA AAAGTCATGC	20
65	<210> 12	
	<211> 882	

ES 2 288 016 T3

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

5 <400> 12

```

10  ATGACCCTGG CTTTGGTGTT GGCCACCTTT GACCCGGCGC GGGGGACCGA CGCCACCAAC 60
    CCACCCGAGG GTCCCAAGA CAGGAGCTCC CAGCAGAAAG GCGCCTGTC CCTGCAGAAT 120
    ACAGCGGAGA TCCAGCACTG TTTGGTCAAC GCTGCGGATG TGGGGTGTGG CGTGTTTGAA 180
    TGTTCGAGA ACAACTCTTG TGAGATTCCG GGCTTACATG GGATTTCAT GACTTTTCTG 240
    CACAACGCTG GAAAATTTGA TGCCAGGGC AAGTCATTCA TCAAAGACGC CTTGAAATGT 300
    AAGGCCACG CTCTGCGGCA CAGGTTCCGC TGCATAAGCC GGAAGTGCCC GGCCATCAGG 360
    GAAATGGTGT CCCAGTTGCA GCGGGAATGC TACCTCAAGC ACGACCTGTG CGCGGCTGCC 420
15  CAGGAGAACA CCCGGGTGAT AGTGGAGATG ATCCATTTCAGGACTTGCT GCTGCACGAA 480
    CCCTACGTGG ACCTCGTGAA CTTGCTGCTG ACCTGTGGGG AGGAGGTGAA GGAGGCCATC 540
    ACCACAGCG TGCAGGTTCA GTGTGAGCAG AACTGGGGAA GCCTGTGCTC CATCTTGAGC 600
    TTCTGCACCT CGGCCATCCA GAAGCCTCCC ACGGCGCCCC CCGAGCGCCA GCCCCAGGTG 660
    GACAGAACCA AGCTCTCCAG GGCCACCAC GCGGAAGCAG GACATCACCT CCCAGAGCCC 720
20  AGCAGTAGGG AGACTGGCCG AGGTGCCAAG GGTGAGCGAG GTAGCAAGAG CCACCCAAAC 780
    GCCCATGCCG GAGGCAGAGT CGGGGGCCCTT GGGGCTCAGG GACCTTCCGG AAGCAGCGAG 840
    TGGGAAGACG AACAGTCTGA GTATTCTGAT ATCCGAGGT GA 882

```

25 <210> 13

<211> 293

<212> PRT

30 <213> *Homo Sapiens*

<400> 13

```

35  Met Thr Leu Ala Leu Val Leu Ala Thr Phe Asp Pro Ala Arg Gly Thr
    -28      -25      -20      -15
    Asp Ala Thr Asn Pro Pro Glu Gly Pro Gln Asp Arg Ser Ser Gln Gln
        -10      -5      -1  1
40  Lys Gly Arg Leu Ser Leu Gln Asn Thr Ala Glu Ile Gln His Cys Leu
    5      10      15      20
    Val Asn Ala Gly Asp Val Gly Cys Gly Val Phe Glu Cys Phe Glu Asn
        25      30      35
    Asn Ser Cys Glu Ile Arg Gly Leu His Gly Ile Cys Met Thr Phe Leu
        40      45      50
45  His Asn Ala Gly Lys Phe Asp Ala Gln Gly Lys Ser Phe Ile Lys Asp
    55      60      65
    Ala Leu Lys Cys Lys Ala His Ala Leu Arg His Arg Phe Gly Cys Ile
    70      75      80
50  Ser Arg Lys Cys Pro Ala Ile Arg Glu Met Val Ser Gln Leu Gln Arg
    85      90      95      100
    Glu Cys Tyr Leu Lys His Asp Leu Cys Ala Ala Ala Gln Glu Asn Thr
        105      110      115
55  Arg Val Ile Val Glu Met Ile His Phe Lys Asp Leu Leu Leu His Glu
    120      125      130
    Pro Tyr Val Asp Leu Val Asn Leu Leu Leu Thr Cys Gly Glu Glu Val

```

60

65

ES 2 288 016 T3

[illegible]

<210> 14

 $\langle 211 \rangle$ 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado

<400> 14

GGGGGAAGCT TGCGGCGAAG AGGAAGAGG

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado

<400> 15

GGCTCGAGGG CATGGGCGTT TGGGTGG

<210> 16

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado

<400> 16

GGCTCGAGTG CTTCCCCGTG GTGGGCC

ES 2 288 016 T3

	<210> 17	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
10	<400> 17	
	GGCTCGAGGG TGCAGAAGCT CAAGATG	27
15	<210> 18	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
25	<400> 18	
	GGCTCGAGCC CACAGGTCAG CAGCAAG	27
30	<210> 19	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintetizado	
40	<400> 19	
	GGGGGCTCGA GGTTCTCCTG GGCAGCCGCG CACAG	35
45		
50		
55		
60		
65		