



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 338 210**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00974894 .8**

(96) Fecha de presentación : **10.11.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1234875**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

(54)

Título: **Metaloproteasa novedosa que tiene actividad agrecanasa.**

(30)

Prioridad: **11.11.1999 JP 11-321740**
16.05.2000 JP 2000-144020

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2010

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2010

(73)

Titular/es: **ASTELLAS PHARMA Inc.**
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8411, JP
KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE

(72)

Inventor/es: **Yamaji, Noboru;**
Nishimura, Kouichi;
Abe, Kunitake;
Ohara, Osamu;
Nagase, Takahiro y
Nomura, Nobuo

(74)

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 338 210 T3

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

DESCRIPCIÓN

Metaloproteasa novedosa que tiene actividad agrecanasa.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a una metaloproteasa novedosa que tiene una actividad agrecanasa y que provoca enfermedades articulares (que se denominará en lo sucesivo en este documento “agrecanasa de enfermedad articular”), a un gen que codifica esta “agrecanasa de enfermedad articular”, a un método para producir la “agrecanasa de enfermedad articular”, a un método para seleccionar una sustancia capaz de inhibir la actividad agrecanasa con el uso de la “agrecanasa de enfermedad articular”, a una composición farmacéutica para inhibir la degradación de proteoglicanos, que comprende la sustancia capaz de inhibir la actividad agrecanasa como el ingrediente activo y un gen promotor de la “agrecanasa de enfermedad articular”.

15 **Antecedentes de la técnica**

Las enfermedades articulares son enfermedades que muestran daño y degeneración del cartílago articular como las patologías principales. Aunque una enfermedad que tiene la cantidad más frecuente de pacientes entre las enfermedades articulares es la osteoartritis (OA), los fármacos analgésicos antiinflamatorios y preparaciones de ácido hialurónico se usan en el método terapéutico actual simplemente como una terapia sintomática con el propósito de aliviar dolores acompañados por la degeneración del cartílago y la destrucción de hueso por debajo del cartílago, de forma que no se puede decir que los mismos ejercen efectos terapéuticos suficientes.

El cartílago articular es un tejido compuesto principalmente de colágeno de tipo II y agrecano que es un proteoglicano específico de cartílago y en las enfermedades articulares se observa la degradación y degeneración de ambos. Debido a esto, se ha considerado durante mucho tiempo que el control de la degradación y degeneración de estos componentes de matriz extracelular conduciría al tratamiento de enfermedades articulares, de forma que se han realizado positivamente intentos para identificar las proteasas relacionadas con la degradación (colagenasa y agrecanasa) y seleccionar su inhibidores y desarrollarlos como medicamentos.

Debido a que las proteasas tienen actividades colagenasa, las metaloproteasas de matriz (MMP1, MMP8, MMP13, MMP14 y similares) se han identificado y se han descubierto sus inhibidores selectivos. Sin embargo, a pesar de los intentos por desarrollar una gran cantidad de inhibidores de MMP que tengan actividades de inhibición de colagenasa como fármacos terapéuticos para enfermedades articulares incluyendo OA y artritis reumatoide (RA), los inhibidores de MMP que se tienen que usar en estas enfermedades como indicación no se han colocado en el mercado. En tales circunstancias, la atención se ha dirigido hacia agrecanasa que degrada selectivamente el agrecano que es otro componente principal que constituye el cartílago articular.

Se ha descrito un papel relacionado con la enfermedad articular de una enzima agrecanasa que escinde agrecano en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ en los informes de Sandy *et al.* y Lohmander *et al.*, que indican que todos los fragmentos principales de agrecano digeridos encontrados en el líquido sinovial de pacientes humanos con artritis se generaron mediante escisión en el sitio de digestión de agrecanasa (Sandy J. D. *et al.*, J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. *et al.*, Arthritis Rheum., 36, 1214-1222, 1993). Por otra parte, se ha sabido que, en un sistema de cultivo de explante *in vitro* de cartílago articular, la degradación de agrecano ocurre en primer lugar mediante la inducción de IL-1 y después la degradación de colágeno de tipo II se acelera (Dingle L. T. *et al.*, Ann. Rheum. Dis., 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. *et al.*, Arthritis Rheum., 40, 164-174, 1997). Se ha indicado que la degradación de agrecano también tiene prioridad con respecto a la degradación de colágeno de tipo II en un modelo de artritis de ratón (van Meurs J. B. *et al.*, Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999). Estos informes sugieren una posibilidad de que la degradación de colágeno de tipo II se pueda controlar inhibiendo la degradación de agrecano anterior.

Sin embargo, la entidad de la agrecanasa que provoca enfermedades articulares (“agrecanasa de enfermedad articular”) no ha estado clara durante mucho tiempo, aunque sus propiedades bioquímicas se han esclarecido, concretamente es una metaloproteasa, la misma existe fuera de las células, una cadena lateral de glicosaminoglicano está implicada en su reconocimiento de sustrato, su actividad está inducida por IL-1, TNF y ácido retinoico y similares. Recientemente, ADAMTS4 (agrecanasa-1: Tortorella M. D. *et al.*, Science, 284, 1664-1666, 1999) y ADAMTS11 (agrecanasa-2: Abbaszade I. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) se han indicado como proteasas que tienen una actividad agrecanasa. Sin embargo, se ha descrito que las mismas no son la “agrecanasa de enfermedad articular”, debido a que su expresión génica en cartílago humano de OA no está aumentada y su expresión génica en un sistema de cultivo de explante *in vitro* de cartílago articular de rodilla humana no está inducida por IL-1, TNF y ácido retinoico que inducen la actividad agrecanasa que provoca las enfermedades articulares (Flannery C. R. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999). Como se ha descrito anteriormente, la “agrecanasa de enfermedad articular” no se ha obtenido.

65 **Descripción de la invención**

En tales circunstancias, los presentes inventores han conducido estudios exhaustivos y, como resultado, han tenido éxito en el aislamiento de un gen que codifica una metaloproteasa novedosa que tiene la actividad agrecanasa, que es

ES 2 338 210 T3

la “agrecanasa de enfermedad articular”, determinando su secuencia de ORF de longitud completa y, de ese modo, han conseguido la producción de una proteína recombinante.

5 También se han establecido un vector que comprende este gen, una célula hospedadora que comprende este vector y un método para producir la proteína novedosa usando esta célula hospedadora.

También, los inventores han tenido éxito en la proporción de un método de selección que usa esta proteína y han encontrado que un compuesto seleccionado llevando a cabo este método de selección inhibe de forma significativa la “actividad agrecanasa” (concretamente, la actividad de esta proteína para escindir el sustrato extracelular agrecano de forma selectiva en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴) y se puede convertir en un medicamento útil para prevenir y/o tratar enfermedades articulares.

Además, se ha aislado un gen promotor de la proteína, que es útil para seleccionar un medicamento para prevenir y/o tratar enfermedades articulares, dando como resultado la consecución de la presente invención.

15 Por consiguiente, la invención se refiere a:

1. Una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos de
 - 20 a) desde la 213^a posición hasta la 583^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 en la que se sustituyen, suprimen y/o insertan de 1 a 10 restos aminoacídicos o
 - 25 b) desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 en la que se sustituyen, suprimen y/o insertan de 1 a 10 restos aminoacídicos o
 - 30 c) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 687^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 950^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 687^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, o una cualquiera de estas secuencias en las que se sustituyen, suprimen y/o insertan de 1 a 10 restos aminoacídicos.
- 35 2. Un gen que codifica una secuencia de aminoácidos de la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en el artículo 1.
- 40 3. Un vector que comprende el gen descrito en el artículo 2.
4. Una célula hospedadora que comprende el vector descrito en el artículo 3.
5. Un método para producir la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en el artículo 1, que comprende el uso de la célula hospedadora descrita en el artículo 4.
- 45 6. Un anticuerpo frente a la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en el artículo 1.
7. Un método para seleccionar una sustancia capaz de inhibir una actividad agrecanasa de una metaloproteasa, que comprende permitir que la metaloproteasa tenga una actividad agrecanasa descrita en el artículo 1 para ponerla en contacto con un compuesto que se tiene que ensayar.
- 50 8. Una composición farmacéutica para inhibir la degradación de proteoglicanos, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de inhibir la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en el artículo 1 como un ingrediente activo.
- 55 9. Un gen representado por las SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 o un gen representado por las SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 en el que se sustituyen, suprimen y/o insertan de 1 a 10 bases, que tiene una actividad promotora de agrecanasa de enfermedad articular.
- 60

Modo para realizar la invención

A continuación se describen las expresiones usadas en la invención. El término “agrecanasa” como se usa en este documento se refiere a una metaloproteasa que tiene una secuencia de consenso de unión a cinc (HExxH) y también tiene una actividad para escindir agrecano que existe en el cartílago articular selectivamente en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴, concretamente la “actividad agrecanasa”. También, a menos que se indique lo contrario, a la “agrecanasa” se le denomina “proteína”.

ES 2 338 210 T3

La “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención es cualquiera de una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente de la metaloproteasa.

5 También, la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención es preferiblemente una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente de la metaloproteasa, donde “equivalente” es como se ha definido más adelante.

10 Más preferiblemente, es una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 950ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una
15 secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente de la metaloproteasa (como se ha definido más adelante).

A través de toda esta memoria descriptiva, se debe aplicar la siguiente descripción:

20 Con respecto al “equivalente de la metaloproteasa”, (1) en el caso de un equivalente de la metaloproteasa que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es una metaloproteasa en la que de 1 a 10 restos aminoacídicos, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en las posiciones 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en la secuencia
25 de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición, y que tiene la actividad agrecanasa, (2) en el caso de un equivalente de la metaloproteasa que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es una metaloproteasa en la que 10 restos aminoacídicos, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en las posiciones 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en la secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición, y que
30 tiene la actividad agrecanasa o (3) en el caso de un equivalente de la metaloproteasa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 950ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una
35 secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es una metaloproteasa en la que de 1 a 10 restos aminoacídicos, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en una a 10 posiciones, más preferiblemente de 1 a 5 en secuencias respectivas, y que tiene la actividad agrecanasa.

40 El origen de la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención no se limita a seres humanos. Por ejemplo, el mismo incluye una metaloproteasa que tiene la actividad agrecanasa que se origina a partir de un organismo diferente a un ser humano (por ejemplo, ratón, rata, hámster y perro) y provoca enfermedades articulares. También se incluye una proteína modificada artificialmente mediante un medio de ingeniería genética basándose en la secuencia
45 de “agrecanasa de enfermedad articular” descrita en SEC ID N°: 1.

También, el gen que codifica la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención es cualquier gen que codifica la “agrecanasa de enfermedad articular”, concretamente un gen que codifica una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la
50 secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente de la metaloproteasa.

También, el gen que codifica la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención puede ser cualquier gen que codifique una metaloproteasa que tenga una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente
55 de la metaloproteasa.

Además, puede ser cualquier gen que codifique una metaloproteasa que tenga una actividad agrecanasa, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos
60 desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 950ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 687ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o un equivalente de la metaloproteasa.

65 Con respecto al “gen que codifica un equivalente de la metaloproteasa”, (1) en el caso de un gen que codifica un equivalente de la metaloproteasa que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es un gen que codifica una metaloproteasa en

la que de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en la secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 583^a posición y que tiene la actividad agrecanasa, (2) en el caso de un gen que codifica un equivalente de la metaloproteasa que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es un gen
 5 que codifica una metaloproteasa en la que de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en la secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 583^a posición y que tiene la actividad agrecanasa o (3) en el caso de un gen que codifica un equivalente de la metaloproteasa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 687^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 950^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 687^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es un gen que codifica una
 10 metaloproteasa en el que de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en secuencias respectivas y que tiene la actividad agrecanasa.

El gen que codifica la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención preferiblemente es un gen que consiste en desde la 1^a posición hasta la 1749^a posición, desde la 1^a posición hasta la 2061^a posición, desde la 1^a posición hasta la 2850^a posición, desde la 637^a posición hasta la 1749^a posición, desde la 637^a posición hasta la 2061^a posición o desde la 637^a posición hasta la 2850^a posición, de la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID N°: 2, más preferiblemente un gen que consiste en desde la 637^a posición hasta la 1749^a posición, desde la 637^a posición hasta la 2061^a posición o desde la 637^a posición hasta la 2850^a posición, de la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID N°: 2.
 20

El gen promotor de la invención es preferiblemente un gen que tiene una secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31. El “equivalente del gen descrito en SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31” es un gen en el que de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 se sustituyen, suprimen y/o insertan en preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 en la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 y que tiene una actividad promotora de “agrecanasa de enfermedad articular”. La expresión “actividad promotora”
 25 se refiere a una actividad que actúa como la región de inicio para transcribir de cadenas de ADN a cadenas de ARN.

De acuerdo con un resultado de BLAST (basic local alignment search tool) (S.F. Altschul *et al.*, (1990), J. Mol. Biol., 215, 403-410) que recupera de GENBANK y SwissProt, la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 1) (950 aminoácidos) de MDT56 como una de las “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención y la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 2) (2853 pares de bases) que codifica esta secuencia de aminoácidos son novedosas. Cuando se ha examinado la homología de la secuencia de aminoácidos con ADAMTS4 y ADAMTS11 descritos anteriormente, su similitud de secuencia era del 50% o menos.
 30

Una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que tiene homología elevada con la metaloproteasa que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, también está incluida en la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención. La metaloproteasa de homología elevada que satisface las características de las reivindicaciones y tienen una actividad agrecanasa es una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa que muestra una homología de secuencia de al menos el 70% o más, preferiblemente el 80% o más, más preferiblemente el 90% o más, más preferiblemente el 95% o más y particularmente preferiblemente el 99% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1. La homología se puede especificar usando el algoritmo de recuperación BLAST mencionado anteriormente.
 40

Además, la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención se puede usar para la selección de una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa que provoque enfermedades articulares. La sustancia que inhibe la actividad agrecanasa es útil como una composición para inhibir la degradación de proteoglicanos.
 45

Además, el gen promotor de la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención es digno de atención en el sentido de que el mismo se puede usar para seleccionar una sustancia que inhiba la actividad promotora. La expresión “una sustancia que inhibe la actividad promotora” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe la expresión de la “agrecanasa de enfermedad articular” inhibiendo la acción del promotor. Un método para seleccionar una sustancia capaz de inhibir la actividad promotora, que usa el gen promotor de la agrecanasa, y el uso de la sustancia capaz de inhibir la actividad promotora para prevenir y/o tratar enfermedades articulares también están incluidos dentro de la invención. Adicionalmente, el gen promotor de la “agrecanasa de enfermedad articular” existe en dos o más formas mutantes, concretamente polimorfismo genético. Por tanto, el mismo se puede usar para el análisis de correlación entre el polimorfismo genético y las enfermedades con respecto a las que la agrecanasa se está considerando de forma que, incluyendo enfermedades articulares, como resultado, existe una posibilidad de que se pueda usar como un marcador para el diagnóstico génico.
 50

Con respecto al gen que codifica la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención, el vector de la invención, las células hospedadoras de la invención, el método de la invención para producir la “agrecanasa de enfermedad articular”, el método de la invención para detectar la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de enfermedad articular”, el método de la invención para producir un anticuerpo que reaccione con la “agrecanasa de enfermedad articular”, el método de la invención para seleccionar una sustancia que inhiba la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de
 55

enfermedad articular”, el método de referencia para detectar la actividad promotora y el método de referencia para seleccionar una sustancia que modifique la actividad promotora se describen en los artículos siguientes 1) a 7). Todos los artículos descritos en 1) a 7) están incluidos en la invención. En los siguientes artículos 1) a 7), la “agrecanasa de enfermedad articular” se describe como “proteína”.

1) *Método de producción de gen de proteína*

a) *Primer método de producción - un método que usa PCR*

Se extrae una muestra de ARNm a partir de una célula o tejido humano que tiene la capacidad de producir la proteína novedosa de la invención. A continuación, usando este ARNm como el molde, se preparan dos cebadores que se interponen en el ARNm o una parte del ARNm de la proteína novedosa. Se puede obtener ADNc de longitud completa o una parte del mismo correspondiente a la proteína novedosa modificando la temperatura de desnaturalización, la condición de adición del agente desnaturalizante y similares y realizando una reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (denominada en lo sucesivo en este documento RT-PCR) adaptada para una proteína respectiva que comprende una parte de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 de la invención. Como alternativa, se puede obtener ADNc de longitud completa o una parte del mismo correspondiente a la proteína novedosa realizando una reacción en cadena de la polimerasa (denominada en lo sucesivo en este documento RT-PCR), usando un ADNc preparado usando transcriptasa inversa a partir de ARNm que se extrae de una célula o tejido humano que tiene la capacidad de producir la proteína novedosa de la invención o una preparación de ADNc disponible en el mercado obtenida de una célula o tejido humano, como el molde. A partir de entonces, la proteína novedosa se puede producir integrando el ADNc de longitud completa obtenido de este modo o una parte del mismo correspondiente a la proteína novedosa en un vector de expresión apropiado y expresándolo en una célula hospedadora.

En primer lugar, ARNm que comprende una secuencia codificante de la proteasa se extrae a partir de una célula o tejido humano que tiene la capacidad de producir la proteína novedosa de la invención mediante un método conocido. Como el método de extracción, se puede ilustrar un método de fenol de tiocianato de guanidina caliente, un método de tiocianato de guanidina-clorhidrato de guanidina y similares, pero preferiblemente se puede mencionar un método de cloruro de cesio de tiocianato de guanidina. La célula o tejido que tiene la capacidad de producir esta proteasa se puede especificar mediante, por ejemplo, técnica de transferencia de northern usando un gen o una parte del mismo que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa o técnica de una transferencia de western usando un anticuerpo específico para la proteasa.

La purificación de ARNm se puede realizar de acuerdo con un método habitual, por ejemplo, se puede purificar uniéndolo a una columna de celulosa oligo(dT) y después eluyéndolo. Como alternativa, se puede usar un ARNm extraído y purificado disponible en el mercado sin extraer el ARNm.

Posteriormente, se sintetiza ADNc monocatenario realizando una reacción de transcriptasa inversa del ARNm purificado en presencia de cebadores aleatorios, cebadores oligo(dT) o cebadores sintetizados de forma personalizada. Usando dos cebadores que se interponen en una parte del gen de interés, el ADNc monocatenario obtenido de este modo se somete a PCR para amplificar el ADN de la proteína novedosa de interés. Como alternativa, se puede usar una preparación de ADNc disponible en el mercado sin sintetizar el ADNc. El ADN obtenido de este modo se fracciona por un medio tal como electroforesis en gel de agarosa o similar. Si se desea, se puede obtener un fragmento de ADN de interés digiriendo este ADN con enzimas de restricción y similares y después ligando los fragmentos digeridos.

b) *Segundo método de producción*

Además del método de producción anterior, el gen de la invención se puede producir usando técnicas de ingeniería genética convencionales. En primer lugar, se sintetiza ADNc monocatenario usando transcriptasa inversa y usando el ARNm obtenido mediante el método anterior como el molde y después se sintetiza ADNc bicatenario a partir de este ADNc monocatenario. Como el método, se puede ilustrar el método de nucleasa S1 (Efstratiadis, A. *et al.*, Cell, 7, 279-288, 1976), el método de Land (Land, H. *et al.*, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981), el método de O. Joon Yoo (Yoo, O. J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 79, 1049-1053, 1983), el método de Okayama-Berg (Okayama, H. y Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) y similares.

A continuación, una cepa de *Escherichia coli* tal como una cepa DH5, cepa HB101, cepa JM109 o similar se transforma introduciendo un plásmido recombinante obtenido mediante el método mencionado anteriormente y se puede seleccionar un recombinante resultante usando la resistencia para un fármaco tal como tetraciclina, ampicilina, kanamicina o similares como un marcador. La transformación de una célula hospedadora, por ejemplo, cuando la célula hospedadora es *E. coli*, se puede realizar mediante el método de Hanahan (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983), concretamente, añadiendo el ADN recombinante a células competentes preparadas en la coexistencia de CaCl_2 y MgCl_2 o RbCl . Por supuesto, también se pueden usar células competentes disponibles en el mercado. Con respecto a esto, además de un plásmido, también se puede usar un vector de fago tal como un sistema lambda como un vector.

Con respecto al método para seleccionar ADN de la proteína novedosa de interés a partir de los transformantes obtenidos de este modo, se pueden emplear, por ejemplo, diversos métodos mostrados más adelante.

(i) *Un método de selección que usa una sonda de oligonucleótido sintética.*

Se sintetiza un oligonucleótido que corresponde a la proteína novedosa completa de la invención o una parte de la misma (en este caso, puede ser una secuencia de nucleótidos obtenida mediante el uso de codones o una combinación de dos o más secuencias de nucleótidos posibles y en el último caso, el número de sus tipos se puede reducir incluyendo inosina), el mismo se hibrida como una sonda (después de marcaje con ^{32}P o ^{33}P) con un filtro de nitrocelulosa o filtro de nylon sobre el que las muestras de ADN de los transformantes se desnaturalizan e inmovilizan y después las cepas positivas obtenidas de este modo se exploran y seleccionan.

(ii) *Un método de selección que usa una sonda preparada mediante reacción en cadena de la polimerasa*

Se sintetizan oligonucleótidos de un cebador sentido y un cebador antisentido correspondientes a una parte de la proteína novedosa de la invención y se realiza reacción en cadena de la polimerasa (Saiki, R. K. *et al.*, Science, 239, 487-491, 1988) usando estos cebadores, efectuando de este modo la amplificación de un fragmento de ADN que codifica la proteína novedosa completa de interés o una parte de la misma. Como el ADN de molde que se tiene que usar, se puede usar ADNc sintetizado por reacción de transcripción inversa a partir de ARNm de células que producen la proteína novedosa o ADN genómico. El fragmento de ADN preparado de este modo se marca con ^{32}P o ^{33}P y se usa como la sonda para realizar hibridación de colonia o hibridación de placa para seleccionar el clon de interés.

(iii) *Un método de selección en el que la proteína novedosa se produce mediante otras células animales*

Un transformante se cultiva para amplificar un gen, una célula animal se transfecta con el gen (en este caso, el vector puede ser un plásmido de replicación autónoma que comprende una región promotora de transcripción o un plásmido que se puede integrar en el cromosoma de la célula animal) y la proteína codificada por el gen se produce en el resto extracelular. Mediante la detección de la proteína novedosa usando un anticuerpo específico para la proteína novedosa de la invención, se selecciona una cepa que comprende ADNc que codifica la proteína novedosa de interés a partir de los transformantes originales.

(iv) *Un método de selección que usa un anticuerpo específico para la proteína novedosa de la invención*

Mediante la integración del ADNc en un vector de expresión por adelantado, se producen proteínas en sobrenadantes de cultivo, dentro de las células o en la superficie de las células de transformantes y la cepa de interés se selecciona detectando la cepa productora de la proteína novedosa de interés usando un anticuerpo específico para la proteína novedosa de la invención y un anticuerpo secundario frente a este anticuerpo.

(v) *Un método que usa un sistema de hibridación-traducción selectivo*

Muestras de ADNc obtenidas a partir de transformantes se transfieren a un filtro de nitrocelulosa o similar, ARNm preparado a partir de las células productoras de proteína novedosa de la invención se hibrida con el mismo y después el ARNm hibridado al ADNc se disocia y se recupera. Las muestras de ARNm recuperadas de este modo se traducen en proteínas en un sistema de traducción de proteínas, por ejemplo, un sistema en el que las mismas se inyectan en ovocitos de *Xenopus* o un sistema sin células tal como un lisado de reticulocitos de conejo, germen de trigo o similares. La cepa de interés se selecciona detectándola usando un anticuerpo frente a la proteína novedosa de la invención.

El método para recoger ADN que codifica la proteína novedosa de la invención a partir del transformante obtenido de este modo de interés se puede realizar de acuerdo con manuales de experimentos de manipulación génica tales como los de un método conocido (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) y similares. Por ejemplo, se puede conseguir separando una fracción correspondiente a ADN plasmídico a partir de células y después cortando la región de ADNc del ADN plasmídico.

c) *Tercer método de producción*

El gen de proteína novedosa de la invención también se puede producir conectando fragmentos de ADN producidos mediante un método de síntesis química. Cada ADN se puede sintetizar usando una máquina de síntesis de ADN [por ejemplo, Oligo 1000M DNA Synthesizer (fabricado por Beckman), 394 DNA/RNA Synthesizer (fabricado por Applied Biosystems) o similares].

d) *Cuarto método de producción*

El gen de proteína novedosa de la invención también se puede producir basándose en la información de la proteína novedosa, por ejemplo, mediante síntesis química de ácidos nucleicos de acuerdo con un método convencional tal como un método de triéster de fosfito (Hunkapiller, M. *et al.*, Nature, 10, 105-111, 1984) o similares. Con respecto a esto, los codones de aminoácidos deseados se conocen bien, se pueden seleccionar opcionalmente y se pueden determinar de acuerdo con un método convencional (Crantham, R. *et al.*, Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981), tomando en consideración el uso de codones del hospedador que se tiene que usar. Además, la modificación parcial de codones de estas secuencias de nucleótidos se puede realizar de la manera habitual de acuerdo con la mutagénesis específica de sitio (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81, 5662-5666, 1984) o similar que usa cebadores comprendidos de oligonucleótidos sintéticos que codifican la modificación deseada.

La determinación de secuencias de ADN obtenidas mediante los métodos anteriores a) a d) se puede realizar, por ejemplo, mediante el método de modificación química de Maxam-Gilbert (Maxam, A. M. y Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980), el método de terminación de cadena de nucleótido didesoxi (Messing, J. y Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) y similares.

2) Métodos para la producción del vector de la invención, la célula hospedadora de la invención y la proteína recombinante de la invención

El fragmento aislado de esta manera que contiene el gen que codifica la proteína novedosa de la invención se puede transformar en células hospedadoras eucariotas o procariotas integrándolo de nuevo en un ADN de vector apropiado. Además, es posible expresar el gen en células hospedadoras respectivas introduciendo un promotor apropiado y una secuencia implicada en la expresión génica en estos vectores.

Por ejemplo, las células hospedadoras eucariotas incluyen células de un vertebrado, un insecto, una levadura y similares y células COS como una célula de mono (Gluzman, Y., Cell, 23,175-182,1081), una cepa sin dihidrofolato reductasa de células de ovario de hámster Chino (CHO) (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77, 4216-4220, 1980), célula HEK293 obtenida de riñón fetal humano, célula 293-EBNA en la que se introduce el gen EBNA-1 del virus de Epstein-Barr en la misma célula (fabricada por Invitrogen) y similares se usan frecuentemente como las células de vertebrado, aunque limitadas a las mismas.

Como el vector de expresión para células de vertebrado, se puede usar un vector que tenga un promotor, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de la transcripción y similares colocados generalmente cadena arriba del gen que se tiene que expresar y el mismo puede tener además un origen de replicación según sea necesario. Los ejemplos del vector de expresión incluyen pSV2dhfr que tiene el promotor temprano de SV40 (Subramani, S. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981), pEF-BOS que tiene promotor de factor de alargamiento humano (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990), pCEP4 que tiene promotor de citomegalovirus (fabricado por Invitrogen) y similares, aunque sin estar limitados a estos.

En el caso del uso de células COS como la célula hospedadora, se puede usar un vector de expresión que tiene un origen de replicación SV40, puede realizar replicación autónoma en células COS y tiene un promotor de transcripción, una señal de terminación de la transcripción y un sitio de corte y empalme de ARN y sus ejemplos incluyen pME18S (Maruyama, K. y Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990), pEF-BOS (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990), pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) y similares. El vector de expresión se puede incorporar en células COS mediante un método de DEAE-dextrano (Luthman, H. y Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983), un método de co-precipitación de ADN con fosfato de calcio (Graham, F. L. y van der Ed, A. J. Virology, 52, 456-457, 1973), un método que usa Reactivo de Transfección FuGENE™6 (fabricado por Boehringer Mannheim) un método de electroporación (Neumann, E. *et al.*, EMBO J., 1, 841-845, 1982) y similares, permitiendo de ese modo obtener una célula transformante deseada.

También, cuando se usa una célula CHO como la célula hospedadora, se puede obtener una célula transformante que puede producir de forma estable la proteína novedosa co-transfectando un vector capaz de expresar gen neo que funciona como un marcador de resistencia G418, tal como pRSVneo (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989), pSV2-neo (Southern, P. J. y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) o similares, junto con un vector de expresión y después seleccionando una colonia resistente a G418. También, cuando se usan células 293-EBNA como la célula hospedadora, se puede obtener una célula transformante deseada usando un vector de expresión que tiene un origen de replicación del virus de Epstein-Barr y puede realizar replicación autónoma en la célula 293-EBNA, tal como pCEP4 (fabricado por Invitrogen) o similares.

La célula transformante de interés obtenida de este modo se puede cultivar de acuerdo con un método convencional y la proteína novedosa de la invención se produce en el resto extracelular mediante este cultivo. Como el medio a usarse en el cultivo, se pueden seleccionar opcionalmente diversos medios usados convencionalmente dependiendo de la célula hospedadora empleada. En el caso de, por ejemplo, las células COS, se puede usar un medio de RPMI-1640, medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o similares que se pueden complementar, según la necesidad, con un componente de suero tal como suero fetal bovino (FBS) o similares. También, en el caso de las células 293-EBNA, se puede usar un medio tal como medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o similar complementado con un componente de suero tal como suero fetal bovino (FBS) o similar y complementarse adicionalmente con G418.

La proteína novedosa de la invención producida de este modo en el resto extracelular de la célula transformante se puede separar y purificar mediante diversas técnicas de separación conocidas que utilizan las características físicas, las características bioquímicas y similares de la proteína novedosa. Los ejemplos ilustrativos de tales técnicas incluyen tratamiento de un caldo de cultivo que contiene la proteína novedosa con un precipitante de proteína habitual, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y similares, diálisis y combinaciones de los mismos.

Cuando la proteína novedosa de la invención se expresa después de que está en fase, se hacen posibles la fusión con una secuencia marcadora, la expresión, verificación, purificación y similares de la proteína novedosa. Los ejemplos de la secuencia marcadora incluyen epítipo FLAG, etiqueta de Hexa-Histidina, etiqueta de Hemaglutinina, epítipo myc y similares. También, cuando se inserta una secuencia de aminoácidos específica reconocible por proteasas tales como enteroquinas, factor Xa, trombina y similares entre una secuencia marcadora y la proteína novedosa, el resto de secuencia marcadora se puede cortar y retirar mediante estas proteasas.

3) Método para detectar la actividad agrecanasa de la proteína de la invención

La actividad agrecanasa de la proteína de la invención se puede detectar mezclando la agrecanasa de enfermedad articular de la invención con cada uno de los sustratos descritos más adelante en una solución tampón apropiada, permitiéndoles que reaccionen entre sí y después detectando el producto de reacción mediante un método adecuado para cada sustrato.

Como el sustrato, se puede usar agrecano purificado a partir de un cartílago o tejido de ser humano u otro animal, agrecano obtenido mediante recombinación genética, agrecano disponible en el mercado (fabricado por Seikagaku Kogyo) o una proteína parcial del mismo. La actividad agrecanasa se puede medir permitiendo que estos sustratos reaccionen con un caldo de cultivo celular o de tejido, un extracto celular o de tejido o una muestra purificada (parcialmente) que contiene una proteasa que se tiene que ensayar y después detectando un fragmento escindido entre el sitio Glu³⁷³-Ala³⁷⁴. El fragmento escindido en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ se puede detectar mediante un método en el que se determina una secuencia N-terminal o una secuencia C-terminal del fragmento digerido de acuerdo con un método convencional o, más convenientemente, mediante un método inmunológico tal como un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) que usa un anticuerpo anti-neoepítipo capaz de reconocer específicamente NITGE³⁷³ C-terminal y ³⁷⁴ARGSV N-terminal generados por el corte entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴, una transferencia de western o similar. Preferiblemente, el mismo se puede realizar mediante los métodos descritos en los Ejemplos 7 y 9.

4) Método para preparar anticuerpo que reacciona con la proteína novedosa de la invención

El anticuerpo que reacciona con la proteína novedosa de la invención, tal como un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, se puede obtener administrando directamente la proteína novedosa o un fragmento de la proteína novedosa a diversos animales. El mismo también se puede obtener mediante un método de vacuna de ADN (Raz, E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. *et al.*, J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) usando un plásmido en el que se introduce un gen que codifica la proteína novedosa de la invención.

Se produce un anticuerpo policlonal a partir de un suero o huevo de un animal tal como un conejo, rata, cabra, aves domésticas o similares que se sensibiliza inmunizando el animal con la proteína novedosa o un fragmento de la misma emulsificada en un adyuvante apropiado tal como adyuvante de Freund completo mediante su inyección peritoneal, subcutánea, intravenosa o similar. El anticuerpo policlonal producido de este modo se puede separar y purificar mediante técnicas de aislamiento y purificación de proteínas habituales y los ejemplos de las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas habituales incluyen centrifugación, diálisis, remoción de sales con sulfato de amonio y una cromatografía usando DEAE-celulosa, hidroxipatita, proteína A agarosa o similares.

Los expertos en la materia pueden producir fácilmente un anticuerpo monoclonal mediante el método de fusión celular de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C, Nature, 256, 495-497, 1975).

Es decir, un ratón se inmuniza emulsificando la proteína novedosa de la invención o un fragmento de la misma en un adyuvante apropiado tal como adyuvante de Freund completo e inoculando la emulsión varias veces en intervalos de unas pocas semanas mediante su inyección peritoneal, subcutánea, intravenosa o similar. Después de la inmunización final, se extraen células de bazo y se fusionan con células de mieloma para preparar hibridomas.

Como las células de mieloma para obtener hibridomas, se usa una célula de mieloma que tiene un marcador (por ejemplo, supresión de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, supresión de timidina quinasa o similares), tal como una célula de mieloma de ratón de cepa P3X63Ag8.U1. También, se usa polietilenglicol como el agente de fusión. Como el medio para preparar hibridomas se usa medio esencial mínimo de Eagle, medio esencial mínimo de Dulbecco, RPMI1640 o similares complementándolos opcionalmente con suero fetal bovino del 10 al 30%. Las cepas fusionadas se seleccionan mediante el método de selección de HAT. La selección de hibridomas se realiza usando sobrenadantes de cultivo mediante métodos bien conocidos de ELISA, tinción inmunológica de tejido o similares o mediante el método de selección mencionado anteriormente y se selecciona un clon de hibridoma que secreta el anticuerpo de interés. También, la naturaleza monoclonal del hibridoma se confirma repitiendo la subclonación por dilución limitante. Mediante el cultivo del hibridoma obtenido de este modo en un medio durante varios días o en la cavidad abdominal de un ratón BALB/c pre-tratado con pristano durante 10 a 20 días, el anticuerpo se produce en una cantidad de purificación posible. El anticuerpo monoclonal producido de esta manera se puede separar y purificar a partir del sobrenadante de cultivo o del líquido ascítico mediante técnicas de purificación y aislamiento de proteínas habituales.

Los fragmentos de anticuerpo activos que contienen una parte del anticuerpo, tales como F(ab')₂, Fab, Fab' y Fv, se pueden obtener digiriendo el anticuerpo separado y purificado de esta manera con una enzima proteolítica tal como pepsina, papaína o similar de la manera convencional y después separando y purificando los fragmentos mediante técnicas de purificación y aislamiento de proteínas habituales.

Adicionalmente, es posible obtener el anticuerpo que reacciona con la proteína novedosa de la invención como Fv o Fab monocatenario mediante los métodos de Clackson *et al.* y Zebedee *et al.* (Clackson. T. *et al.*, Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89, 3175-3179, 1992). Además, es posible obtener un anticuerpo humano inmunizando un ratón transgénico en el que se reemplaza un gen de anticuerpo de ratón por un gen de anticuerpo humano (Lonberg, N. *et al.*, Nature, 368, 856-859, 1994).

5) *Método para seleccionar una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención*

Esta se puede seleccionar mediante un método similar al método de detección de actividad agrecanasa descrito en 3). También, se puede usar el método de ELISA o similar ilustrado en el Ejemplo 10-2, en el que el agrecano añadido, el agrecano recombinante, el agrecano disponible en el mercado o una proteína parcial del mismo que desaparece o disminuye por su degradación cuando se permite reaccionar con la proteína novedosa de la invención se mide usando un anticuerpo que reconoce específicamente polipéptidos de los restos laterales N-terminal y laterales C-terminal de la región escindida con agrecanasa. También es útil un método en el que se permite la que proteína novedosa de la invención reaccione con un agrecano recombinante en el que se añade una etiqueta FLAG en el extremo N y una etiqueta His en el extremo C, como se ilustra en el Ejemplo 7-1 y el agrecano recombinante añadido que desaparece o disminuye por su degradación se mide mediante ELISA o un método similar usando anticuerpos anti-etiqueta FLAG y anti-etiqueta His. Las etiquetas en este caso no se limitan a etiquetas FLAG y etiquetas His y el agrecano recombinante no se limita al Ejemplo 7-1 y puede ser una proteína parcial o proteína modificada de agrecano que se escinde en el sitio de digestión de agrecanasa por esta proteína. Con respecto a la sustancia que se tiene que ensayar para determinar su actividad agrecanasa, como la sustancia que se tiene que ensayar se pueden usar compuestos o péptidos que se conoce generalmente que tienen actividad de inhibición de metaloproteasa pero sus actividades para inhibir la actividad agrecanasa de la proteína novedosa no están claras o diversos compuestos y péptidos conocidos, compuestos sintetizados usando técnicas de química combinatoria (Terrett, N. K. *et al.*, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) o técnicas de síntesis general o péptidos aleatorios preparados aplicando un método de presentación en fago (Felici, F. *et al.*, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) y similares. Además, también son objeto de la selección los extractos y sobrenadantes de cultivo de microorganismos, componentes naturales obtenidos de plantas y organismos marinos, extractos de tejido animal y similares. O posiblemente, también se pueden usar compuestos o péptidos preparados mediante la modificación de estructura química o biológica a partir de compuestos o péptidos seleccionados por el método de selección de la invención.

Para la selección de sustancias que inhiben la actividad agrecanasa de la proteína novedosa de la invención (compuesto, péptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo) se puede usar cualquier sustancia que pueda ser el sustrato de la proteína novedosa de la invención o un péptido parcial de la misma y los sustratos descritos en el artículo 3) mencionado anteriormente son deseables.

6) *Método para detectar degradación y liberación de proteoglicano*

Un método ilustrado del Ejemplo 11-12 en el que se usa $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ como un indicador, un método en el que se usa un anticuerpo de proteoglicano, un método en el que los fragmentos degradados se detectan mediante filtración en gel (Methods in Cartilage Research, Academic Press, 1990; Joint Cartilage Degradation, Marcel Dekker, Inc., 1993), un método colorimétrico (Goldberg R. L y Kolibas L. M., Connect. Tissue Res., 24, 265-275, 1990) que usa azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB) y similares se usan para la detección y medición de la degradación y liberación de proteoglicano de cartílago, aunque sin limitación a los mismos.

7) *Método para seleccionar una sustancia que inhibe la actividad promotora de la invención*

En la selección de una sustancia que inhibe la actividad promotora de la invención, es conveniente un método en el que se usa un plásmido de gen informador que contiene las secuencias mostradas en el Ejemplo 13 (SEC ID N°: 24 y 31) y secuencias parciales del mismo como el método para detectar la actividad promotora. El gen informador se refiere a un gen que codifica una proteína que se puede determinar mediante medios habituales (por ejemplo, métodos de determinación bien conocidos por los expertos en la materia tales como medición de actividades enzimáticas y similares) y con frecuencia se usan genes de cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina, aunque sin limitación a éstos. Con respecto a un vector para construir un plásmido de gen informador, no existe limitación y se pueden usar los vectores de plásmido disponibles en el mercado tales como pGV-B2 (fabricado por Toyo Ink), pSEAP2-Basic (fabricado por Clontech) y similares. Mediante la construcción de un plásmido de gen informador en el que la secuencia se inserta en la dirección primaria cadena arriba del gen informador de estos vectores y la medición de la cantidad de la proteína informadora expresada en células transformadas con este plásmido, mediante un método adecuado para el caso respectivo, se pueden conocer la presencia y fuerza de la actividad promotora de la secuencia y se puede detectar la acción de una sustancia que se tiene que ensayar ante esta actividad promotora añadiendo la sustancia que se tiene que ensayar a un caldo de cultivo de las células transformadas.

Para la selección de sustancias que inhiben la actividad promotora que posee la secuencia de la ID de Secuencia N° de la invención y una secuencia parcial de la misma (compuestos, péptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo), se puede usar un método similar al método de detección de actividad promotora mencionado anteriormente. Con respecto a la sustancia que se tiene que ensayar, se pueden usar compuestos o péptidos que generalmente se conoce que tienen actividad de inhibición del promotor pero que sus actividades para inhibir la actividad promotora que poseen las secuencias de SEC ID N°: 24 y 31 y las secuencias parciales de las mismas no están claras o diversos compuestos y

péptidos conocidos, compuestos sintetizados usando técnicas de química combinatoria (Terrett, N. K. *et al.*, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) o técnicas de síntesis general y péptidos aleatorios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo preparados aplicando un método de presentación en fago (Felici, F. *et al.*, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991). Además, también pueden ser objeto de la selección los extractos y sobrenadantes de cultivo de microorganismos, componentes naturales obtenidos a partir de plantas y organismos marinos, extractos de tejido animal y similares. O posiblemente, también se pueden usar compuestos o péptidos preparados mediante modificación de estructura químicamente o biológicamente a partir de compuestos o péptidos seleccionados mediante el método de selección de la invención.

Un medicamento que comprende como el ingrediente activo una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de enfermedad articular” y se selecciona mediante el método de selección mencionado anteriormente (un compuesto, péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) está incluido en la invención, y una composición farmacéutica para inhibir la degradación de proteoglicanos es particularmente deseable como el medicamento. Los ejemplos de la sustancia que inhibe significativamente la actividad de la “agrecanasa de enfermedad articular” incluyen N^α-[2-(1-hidroxycarbamoil-2-sulfaniletil)-4-metilpentanoil]-N,O-dimetiltirosina amida (que se denominará en lo sucesivo en este documento compuesto A), N^α-[2-(1-hidroxycarbamoil-2-sulfaniletil)-4-metilpentanoil]-N-metil fenilalanina amida (que se denominará en lo sucesivo en este documento compuesto B), N^α-[2-(1-hidroxycarbamoil-2-fenilsulfaniletil)-4-metilpentanoil]-N,O-dimetiltirosina amida (que se denominará en lo sucesivo en este documento compuesto C), N^α-[2-(1-hidroxycarbamoil-2-metilsulfaniletil)-4-metilpentanoil]-N,O-dimetiltirosina amida (que se denominará en lo sucesivo en este documento compuesto D) y similares, seleccionado mediante el sistema de selección mostrado en el Ejemplo 10-2. El compuesto A, compuesto B, compuesto C y compuesto D son compuestos incluidos en las reivindicaciones del documento WO 90/05719, pero en la invención no están incluidos sólo los medicamentos que comprenden estos compuestos como el ingrediente activo sino también todos los medicamentos que comprenden sustancias capaces de inhibir significativamente la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de enfermedad articular”. Con relación a esto, el compuesto A, compuesto B, compuesto C y compuesto D son compuestos que se pueden sintetizar de la misma manera que los compuestos descritos en el documento WO 90/05719 de acuerdo con los métodos de producción descritos en el documento WO 90/05719.

El medicamento que comprende una sustancia (un compuesto, péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que inhibe significativamente la actividad agrecanasa de la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención como el ingrediente activo se puede preparar usando vehículos, cargas y otros aditivos usados habitualmente para su preparación, como respuesta a cada tipo del ingrediente activo.

Los ejemplos de su administración incluyen administración oral usando comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, subtales finos, polvos, soluciones orales y similares y administración parenteral usando inyecciones intravenosa, intramuscular, intraarticular y similares, supositorios, preparaciones percutáneas, preparaciones transmucosales y similares. Particularmente en el caso de péptidos que se digieren en el estómago, es deseable la administración parenteral tal como inyección intravenosa o similares.

En la composición sólida para uso en la administración oral de acuerdo con la presente invención, una o más sustancias activas se mezclan con al menos un diluyente inerte tal como lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa, almidón, polivinilpirrolidona, silicato de aluminio y magnesio o similares. De la manera habitual, la composición puede contener otros aditivos aparte del diluyente inerte, tales como un lubricante, un agente disgregante, un agente estabilizante, un agente de ayuda de solubilización o solubilizante o similares. Si es necesario, los comprimidos o píldoras se pueden recubrir con un azúcar o una película de una sustancia gástrica o entérica.

La composición líquida para administración oral incluye emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires y contiene un diluyente inerte usado generalmente tal como agua purificada o etanol. Además del diluyente inerte, esta composición puede contener agentes auxiliares tales como un agente humectante, un agente de suspensión, un edulcorante, un agente saporífero y un agente antiséptico.

Las inyecciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas asépticas. Los ejemplos del diluyente para uso en las soluciones y suspensiones acuosas incluyen agua destilada para inyección, solución salina fisiológica y similares. Los ejemplos del diluyente para uso en las soluciones y suspensiones no acuosas incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva o similares), alcohol (por ejemplo, etanol), Polisorbato 80 y similares. Una composición de este tipo puede contener además un agente humectante, un agente emulsificante, un agente de dispersión, un agente estabilizante, un agente de ayuda de solubilización o solubilizante, un antiséptico y similares. Estas composiciones se esterilizan mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, mezcla de un germicida o radiación. Como alternativa, los mismos se pueden usar en primer lugar volviendo a las composiciones sólidas estériles y disolviéndolas en agua estéril o un disolvente estéril para inyección antes de su uso.

La dosis clínica se decide opcionalmente tomando en consideración la fuerza o actividad del ingrediente activo seleccionado mediante el método de selección mencionado anteriormente, los síntomas, la edad, el sexo y similares de cada paciente que se tiene que tratar.

Por templo, la dosis es habitualmente de aproximadamente 0,1 a 1.000 mg, preferiblemente de 0,1 a 100 mg, por día por adulto (como 60 kg de peso corporal) en el caso de administración oral. En el caso de administración parenteral, es de aproximadamente 0,01 a 1.000 mg, preferiblemente de 0,01 a 100 mg por día en la forma de inyecciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una fotografía que muestra un resultado de la expresión de MDTs6TSP1 en una cepa de célula animal usando un sistema de detección de transferencia de western ECL, obtenida en el Ejemplo 6.

La Figura 2 es una fotografía que muestra un resultado de la detección de la actividad de MDTs6TSP1 para degradar un agrecano recombinante G1G2 usando un sistema de detección de transferencia de western ECL, obtenida en el Ejemplo 7-2.

La Figura 3 es una fotografía que muestra un resultado del análisis de un agrecano recombinante G1G2 degradado con MDTs6TSP1, mediante un anticuerpo anti-neoepítipo de agrecanasa, usando un sistema de detección de transferencia de western, obtenida en el Ejemplo 7-3.

La Figura 4 es una fotografía de patrón de electroforesis que muestra un resultado del examen de inducción de expresión de ARNm de MDTs6 mediante IL-1 β , obtenida en el Ejemplo 8.

La Figura 5 es una fotografía que muestra un resultado de la detección de degradación de agrecano de tipo natural mediante la proteína MDTs6, mediante un anticuerpo anti-neoepítipo de agrecanasa, usando un sistema de detección de transferencia de western, obtenida en el Ejemplo 9-2.

La Figura 6 es un gráfico que muestra un resultado de la detección de liberación de proteoglicanos a partir de células de cultivo primario de articulación de la rodilla de conejo mediante ácido retinoico todo *trans* e IL-1 β , obtenido en el Ejemplo 11-2.

La Figura 7 es una fotografía de un patrón de electroforesis que muestra un resultado del análisis de los cambios en la expresión génica de MDTs6 mediante RT-PCR cuando las células de cultivo primario de articulación de la rodilla de conejo se trataron con ácido retinoico todo *trans* e IL-1 β , obtenida en el Ejemplo 11-3.

La Figura 8 es un gráfico que muestra que la degradación y liberación de proteoglicano a partir de células de cultivo primario de la articulación de la rodilla de conejo mediante ácido retinoico todo *trans* está inhibida por el compuesto A y compuesto B, obtenido en el Ejemplo 12.

Mejor modo de realizar la invención

A continuación se describe la invención de forma más ilustrativa.

A menos que se indique de otra manera, los experimentos se realizaron de acuerdo con manuales de experimentos de manipulación génica tales como los de un método conocido (Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) y similares, pero la invención no se limita a los Ejemplos.

Ejemplo 1*Descubrimiento de secuencia parcial de un gen de ADAMTS novedoso de MDTs6*

Se construyó una biblioteca de ADNc de cerebro humano fraccionada estrictamente por el tamaño de secuencias de inserción como se muestra en una referencia (Ohara O. *et al.*, DNA Res., 4, 53-59, 1997). La distribución de tamaño de los fragmentos de ADNc en esta sub-biblioteca fue de 3 kbp a 8 kbp. Descifrando las secuencias de extremo 5' y 3' de clones que constituían esta biblioteca, se construyó un banco de datos de EST interno. A partir de esto se obtuvo una secuencia parcial de MDTs6.

Ejemplo 2*Determinación de secuencia ORF de longitud completa de MDTs6*

Mediante la determinación de secuencias de clones de ADNc de MDTs6, se obtuvo una secuencia desde la 832^a posición hasta la 2853^a posición de SEC ID N°: 2. La secuencia desde la 1^a posición hasta la 831^a posición de SEC ID N°: 2 se obtuvo repitiendo RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc) usando ADNc de cerebro humano y de placenta humana Marathon-ReadyTM fabricado por Clontech como el molde y LA-TaqTM (fabricado por Takara Shuzo) como la ADN polimerasa. Como resultado, se observó que la MDTs6 de longitud completa era una proteína novedosa compuesta de 950 aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 1. Su estructura de dominio estaba compuesta por una secuencia de señal de secreción, una región pro, una secuencia de reconocimiento de furina proteasa, un dominio de metaloproteasa, un dominio de disintegrina, una secuencia de repetición de tipo I de tromboespondina (a la que se denominará en lo sucesivo en este documento secuencia de repetición TSP-1), un dominio con alto contenido de restos Cys, una región intermedia y dos secuencias de repetición TSP-1, en orden desde el extremo N y era una molécula que pertenecía a la familia ADAMTS (Kuno, K. *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. *et al.*, FEBS Lett., 445, 223-225, 1999).

Ejemplo 3

Preparación de vector de expresión de tipo de adición de FLAG C-terminal

Se construyó un vector de expresión con la unidad de expresión EBNA1 retirada pCEP4d digiriendo pCEP4 (fabricado por Invitrogen) con enzimas de restricción *ClaI* y *NsiI*, haciendo extremos romos a los fragmentos resultantes y después realizando su ligamiento autónomo. Este vector se digirió con enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* y se extrajo a partir de un gel de agarosa para obtener un fragmento de aproximadamente 7,7 kbp y una hebra doble de oligonucleótido obtenida hibridando un ácido nucleico mostrado por la SEC ID N°: 3 y un ácido nucleico mostrado por SEC ID N°: 4 se insertó en el fragmento para seleccionar un clon que tenga la secuencia planificada que se denominó pCEP4d-FLAG. Usando este vector como el molde y oligoDNA mostrado por SEC ID N°: 5 y oligoDNA mostrado por SEC ID N°: 6 como cebadores, se realizó PCR usando ADN polimerasa PyroBest™. El fragmento de ADN generado de este modo de aproximadamente 0,4 kbp se digirió con una enzima de restricción *SpeI* y se insertó en pCEP4d-FLAG (aproximadamente 7,7 kbp) que se había digerido con *XbaI* y se seleccionó un clon en el que los sitios de clonación de secuencia de reconocimiento *XbaI*, *NheI*, *NotI* y *BamHI* y la etiqueta FLAG se dispusieron en ese orden desde el promotor como se pretendía, completando de ese modo pCEP4dE2-FLAG.

Ejemplo 4

Construcción de plásmido de expresión de proteína truncada MDTs6 (MDTs6TSP1)

Se construyó un plásmido de la siguiente manera para uso en la expresión de una secuencia desde la 1ª posición hasta la 583ª posición de SEC ID N°: 1 (un resto correspondiente a una región que contenía la secuencia de repetición TSP1 del extremo N de MDTs6 (a la que se denominará en lo sucesivo en este documento MDTs6TSP1)) como una proteína en la que se añadió FLAG al extremo C.

En primer lugar, un gen desde la 1ª posición hasta la 1749ª posición de SEC ID N°: 2 se obtuvo mediante PCR. Usando secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 como cebadores, ADNc de placenta humana Marathon-Ready™ (fabricado por Clontech) como el molde y LA-Taq™ (fabricado por Takara Shuzo) como ADN polimerasa, se repitió un ciclo de 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos 10 veces después de calentar a 94°C durante 1 minuto. Usando una solución de ADN preparada diluyendo 50 veces esta solución de reacción como el molde y usando ADN polimerasa PyroBest™, se realizó PCR en una condición de 94°C durante 2 minutos, 40 repeticiones de un ciclo de 98°C durante 10 segundos, 66°C durante 30 segundos y 74°C durante 4 minutos y posteriormente 72°C durante 10 minutos. El fragmento de interés generado de este modo en el que la secuencia de reconocimiento *XbaI* y la secuencia Kozak se añadieron al extremo 5' y la secuencia de reconocimiento *NotI* al extremo 3', se subclonó en PCR-Blunt para confirmar la secuencia y después se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* y *NotI* y se insertó en el sitio *XbaI-NotI* de pCEP4dE2-FLAG para completar pCEP-MDTs6TSP1-FLAG.

Ejemplo 5

Construcción de plásmido de expresión de proteína de longitud completa MDTs6

Se construyó un plásmido de la siguiente manera para uso en la expresión de una secuencia desde la 1ª posición hasta la 950ª posición de SEC ID N°: 1 como una proteína en la que se añadió FLAG al extremo C.

En primer lugar, un gen desde la 1534ª posición hasta la 2850ª posición de SEC ID N°: 2 se obtuvo por PCR. De forma ilustrativa, usando secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10 como cebadores, el ADN plasmídico del clon EST como el molde y ADN polimerasa PyroBest™ como ADN polimerasa, se repitió 20 veces un ciclo de 98°C durante 10 segundos, 50°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos después de calentar a 94°C durante 1 minuto, seguido por 7 minutos de reacción a 72°C. Con relación a esto, fue capaz de generar el fragmento de interés realizando PCR usando ADNc de placenta humana Marathon-Ready™ (fabricado por Clontech) como el molde, en lugar de usar el ADN plasmídico del clon EST como el molde y usar secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10 como cebadores en una condición de 94°C durante 2 minutos, 40 repeticiones de un ciclo de 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos y posteriormente 72°C durante 7 minutos. El fragmento de interés generado de este modo en el que la secuencia de reconocimiento *NotI* se añadió al extremo 3' se subclonó en PCR-Blunt para confirmar la secuencia y se usó como pCRB-MDTs6-3H.

Aprovechando la presencia de una secuencia de reconocimiento *BamHI* en una secuencia desde la 1566ª posición hasta la 1571ª posición de SEC ID N°: 2, pCEP-MDTs6TSP1-FLAG se digirió con enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* y el fragmento de ADN generado de esta manera de aproximadamente 1,6 kbp se conectó a un fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kbp generado digiriendo pCRB-MDTs6-3H con *BamHI* y *NotI* y se insertó en el sitio *XbaI-NotI* de pCEP4dE2-FLAG para completar pCEP-MDTs6F-FLAG.

Ejemplo 6

Expresión de proteínas de longitud completa MDTS6TSP1 y MDTS6 por cepa de célula animal

El plásmido de expresión preparado en el Ejemplo 4 usando pCEP4dE2-FLAG como estructura principal se introdujo en una célula HEK293-EBNA (fabricada por Invitrogen) usando Reactivo de Transfección FuGENE™6 (fabricado por Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Después de la introducción del plásmido, la presencia de la proteína de interés en un sobrenadante de cultivo obtenido mediante 1 a 2 días de cultivo se confirmó mediante transferencia de western usando un anticuerpo frente a etiqueta FLAG añadido al extremo C (un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG (M2; fabricado por Sigma)). Es decir, el sobrenadante de cultivo se sometió a electroforesis usando SDS/gel de acrilamida del 10% al 20% (fabricado por Daiichi Pure Chemicals) y después se transfirió a una membrana de PVDF usando un aparato de transferencia. Después de la transferencia la membrana de PVDF se sometió a bloqueo añadiendo Block Ace (fabricado por Dainippon Pharmaceutical) y después se dejó que reaccionara con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG (M2; fabricado por Sigma) y un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (fabricado por Zymed o TAGO) en ese orden. Como alternativa, después del bloqueo, se permitió que reaccionara con anticuerpo M2 biotinilado (fabricado por Sigma) y un conjugado de estreptoavidina-peroxidasa de rábano picante (fabricado por Amersham) en ese orden. Después de la reacción, la expresión de la proteína se confirmó usando un sistema de detección de transferencia de western ECL (fabricado por Amersham Pharmacia) (Figura 1). El peso molecular de la proteína expresada MDTS6TSP1 fue más pequeño que el valor calculado a partir de la secuencia de aminoácidos por un factor de aproximadamente 23 K. Aprovechándose del hecho de que la etiqueta FLAG se añade al extremo C de la proteína MDTS6TSP1 expresada por las células HEK293-EBNA como se ha descrito anteriormente, la proteína MDTS6TSP1 se purificó por afinidad mediante el método del Ejemplo 7-1 y después se transfirió a una membrana de PVDF y la secuencia N-terminal de la proteína MDTS6TSP1 teñida con Ponceau S se determinó mediante análisis con Secuenciador Peptídico de Tipo 494 fabricado por ABI. Como resultado, se demostró que el mismo comienza desde la 213ª posición Phe de SEC ID N°: 1 y, similar al caso de otras moléculas de ADAMTS, se vuelve una proteína madura (desde la 213ª posición hasta la 583ª posición de SEC ID N°: 1) escindiéndose en la secuencia de reconocimiento de furina proteasa existente entre la región pro y el dominio de metaloproteasa. También, la proteína de longitud completa MDTS6 se obtuvo de la misma manera que en el caso de la expresión de proteína MDTS6TSP1 anterior usando el plásmido de expresión obtenido del Ejemplo 5 y similar al caso de MDTS6TSP1, se confirmó que se vuelve una proteína madura (de la 213ª posición a la 950ª posición de SEC ID N°: 1) escindiéndose en la secuencia de reconocimiento de furina proteasa existente entre la región pro y el dominio de metaloproteasa.

Ejemplo 7

Detección de actividad enzimática de proteína MDTS6TSP1 expresada en célula hospedadora animal

Ejemplo 7-1

Preparación de agrecano recombinante G1G2

Usando secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12 sintetizadas basándose en la secuencia de gen informador de agrecano humano (Doege K. *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 18, 200-202, 1990) como cebadores, ADNc de placenta humana Marathon-Ready™ como el molde y ADN polimerasa PyroBest™ como ADN polimerasa, se realizó la reacción de 94°C durante 1 minuto, 40 repeticiones de un ciclo de 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos y posteriormente 68°C durante 7 minutos. El fragmento de ADN generado de esta manera de digirió con una enzima de restricción BamHI y se insertó en el sitio BamHI de pCEP-SigFIIa, completando de este modo un plásmido de expresión pCEP-rAgg para uso en la expresión de una proteína en la que se añade etiqueta FLAG al extremo N y etiqueta His al extremo C, del dominio globular 1 (G1)-domino globular 2 (G2) de agrecano humano. El pCEP-SigFIIa es un vector de expresión que se prepara introduciendo la hebra doble de las secuencias de oligoDNA representadas por SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14 en el sitio Hindi-XhoI de pCEP4d y tiene la secuencia señal de secreción de hemaglutinina del virus de influenza descrita en el informe (Guan X-M. *et al.*, J. Biol. Chem., 267, 21995-21998, 1992), etiqueta FLAG y secuencia de reconocimiento BamHI en ese orden cadena abajo del promotor.

El plásmido pCEP-rAgg se introdujo en células HEK293-EBNA que se cultivaron posteriormente durante 3 a 7 días, logrando de ese modo la expresión y producción de la proteína de interés. La purificación de la proteína de interés a partir del sobrenadante de cultivo se realizó mediante purificación por afinidad aprovechándose de la adición de etiqueta FLAG al extremo N. Es decir, el sobrenadante de cultivo se aplicó a M2-agarosa (fabricado por Sigma) cargado en una columna, se lavó con Tris-HCl 20 mM (pH 7,4)/NaCl 150 mM (denominado en lo sucesivo en este documento TBS), se eluyó y se fraccionó con Gly-HCl 0,1 M (pH 3,0) y se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,0).

Ejemplo 7-2

Detección de actividad degradante de agrecano recombinante G1G2 de la proteína MDTs6TSP1

En el Ejemplo 6, el medio se reemplazó 12 a 16 horas después de la introducción del plásmido de expresión mediante un medio sin suero y el cultivo se continuó durante 32 a 36 horas para recuperar el sobrenadante de cultivo. Este sobrenadante de cultivo se mezcló con el agrecano recombinante preparado anteriormente y la mezcla se dejó que experimentara la reacción a 37°C durante una noche, se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de PVDF y se bloqueó mediante el método descrito en el Ejemplo 6 y después se permitió que reaccionara con un anticuerpo policlonal anti-Hisx6 (sc-803; fabricado por Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (fabricado por BML) en ese orden. Después de la reacción, el agrecano recombinante se detectó usando un sistema de transferencia de western ECL (fabricado por Amersham Pharmacia). Como resultado, se detectó el fragmento degradado del agrecano recombinante, que no se encontró en el control en el que sólo se introdujo el plásmido de expresión (Figura 2).

Ejemplo 7-3

Análisis mediante anticuerpo de anti-neoepítipo de agrecanasa

Agrecanasa es una metaloproteasa que escinde selectivamente agrecano en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴. Un anticuerpo capaz de reconocer un neoepítipo de extremo C generado por esta escisión se preparó de acuerdo con un método habitual repitiendo la inmunización de ratón con un conjugado del péptido sintético representado por SEC ID N°: 32 y KLH, 5 veces. Se permitió que una membrana de PVDF después de transferencia y bloqueo realizado de la misma manera que en el Ejemplo 7-2 reaccionara con este anticuerpo, se permitió que reaccionara con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa (fabricado por Tago) y después se detectó usando un sistema de detección de transferencia de western ECL (fabricado por Amersham Pharmacia). Como resultado, el producto degradado de agrecano recombinante generado por MDTs6 reaccionó con el anticuerpo anti-neoepítipo de agrecanasa y el peso molecular de la banda detectada es coherente con el peso molecular del producto degradado detectado en el Ejemplo 7-2 (Figura 3). El mismo resultado se obtuvo mediante el anticuerpo BC-3 que reconoce neoepítipo de agrecanasa (Hughes C. E. *et al.*, Biochemical J., 305, 799-804, 1995).

Ejemplo 8

Inducción de expresión de ARNm de MDTs6 mediante IL-1

Se conoce que una célula de ratón cepa ATDC5 se diferencia en una célula similar a condrocito mediante tratamiento con insulina (Atsumi T. *et al.*, Cell Differ. Dev., 30, 109-116, 1990). Las células ATDC5 se inocularon en porciones de 4×10^5 /pocillo en una placa de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (fabricada por Asahi Technoglass) y se cultivó durante 2 días usando medio DMEM/HamF12 (1:1)/FCS al 5%, el medio se cambió a DMEM/HamF12 (1:1)/FCS al 5% que contenía insulina (concentración final 30 ng/ml) y 50 µg/ml de ácido L-ascórbico y el cultivo se continuó durante 5 días y después las células resultantes se trataron durante 0, 1, 2, 4 u 8 horas añadiendo IL-1β (concentración final 5 ng/ml). ARN total se preparó a partir de cada uno de los grupos tratados usando ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) y se realizó RT-PCR usando una porción de 1 µg del mismo como el molde y usando un kit de PCR de ARN BcaBEST™ (fabricado por Takara Shuzo). La reacción de transcripción inversa se realizó usando Cebador Oligo dT-Adaptor como el cebador de acuerdo con las instrucciones adjuntas y se realizó PCR usando secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16 como cebadores, que se habían sintetizado basándose en la región de no traducción 3' de MDTs6, mediante la reacción de 94°C durante 2 minutos, 40 repeticiones de un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos y posteriormente 72°C durante 7 minutos. La solución de reacción se sometió a electroforesis con agarosa al 1% y se compararon las densidades de las bandas generadas de esa manera de aproximadamente 0,3 kbp. Como resultado, se observó que la expresión del ARNm de MDTs6 se induce de forma transitoria por IL-1 (Figura 4).

Ejemplo 9

Degradación de agrecano de tipo natural mediante MDTs6

Ejemplo 9-1

Expresión de diversas proteínas de MDTs6 de longitud completa y su actividad degradante de agrecano recombinante G1G2

El plásmido de expresión construido usando pCEP4dE2-FLAG como la estructura principal se introdujo en células HEK293-EBNA (fabricadas por Invitrogen) usando Reactivo de Transfección FuGENE™6 (fabricado por Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Después de la instrucción del plásmido, las células resultantes se cultivaron durante una noche y se lavaron con tampón PBS y después el medio se cambió a un medio sin suero y el cultivo se continuó durante 2 a 3 días. El caldo de cultivo resultante se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se usó como la fuente enzimática de MDTs6. En este caso, además de los plásmidos de expresión

descritos en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5, los plásmidos de expresión para tres proteínas, concretamente una proteína en la que un polipéptido representado por SEC ID N°: 33 se añadió al extremo C de los aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 447ª posición de SEC ID N°: 1 (que se denominará en lo sucesivo en este documento MDTS6Pro), una proteína en la que el polipéptido representado por SEC ID N°: 33 se añadió al extremo C de los aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 518ª posición de SEC ID N°: 1 (que se denominará en lo sucesivo en este documento MDTS6Dis) y una proteína en la que el polipéptido representado por SEC ID N°: 33 se añadió al extremo C de los aminoácidos desde la 1ª posición hasta la 687ª posición de SEC ID N°: 1 (que se denominará en lo sucesivo en este documento MDRS6Cys), se diseñaron como plásmidos de expresión para proteínas MDTS6 de longitud completa respectiva. Es decir, el plásmido de expresión de MDTS6Cys se construyó amplificando un gen mediante PCR usando el plásmido de expresión de proteína de longitud completa construido en el Ejemplo 5 como el molde y las secuencias oligoDNA representadas por SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 17 como cebadores y usando ADN polimerasa PuroBest, digiriendo el gen con enzimas de restricción *XbaI* y *NotI* y después insertando el fragmento resultante en el sitio *XbaI-NotI* de pCEP4dE2-FLAG. También, el plásmido de expresión de MDTS6Pro y el plásmido de expresión de MDTS6Dis se construyeron de la misma manera que el plásmido preparado usando la MDTS6Cys, ilustrativamente, digiriendo genes respectivos amplificados por PCR usando ADN polimerasa PyroBest con enzimas de restricción *XbaI* y *NotI* y después insertando los fragmentos resultantes en el sitio *XbaI-NotI* de pCEP4dE2-FLAG. Con la condición de que el oligoDNA representado por SEC ID N°: 7 y el oligoDNA representado por SEC ID N°: 34 se usaran en el caso de MDTS6Pro y una combinación del oligoDNA representado por SEC ID N°: 7 y el oligoDNA representado por SEC ID N°: 35 se usaran en el caso de MDTS6Dis, respectivamente.

Con respecto a la expresión de proteína de estas proteínas MDTS6 respectivas (MDTS6Cys, MDTS6Pro y MDTS6Dis), las mismas se expresaron de la misma manera que la expresión de proteínas de longitud completa MDTS6TSP1 y MDTS6 en una cepa de células animales descrita en el (Ejemplo 6). Cuando la actividad agreganasa de estas proteínas MDTS6 respectivas se examinó mediante el método del Ejemplo 7-3, la actividad agreganasa se detectó en el sobrenadante de cultivo en el que se expresaba MDTS6Cys, pero la actividad agreganasa no se detectó en los sobrenadantes de cultivo en los que se expresaba MDTS6Pro y MDTS6Dis. Con relación a esto, el peso molecular de la proteína principal expresada fue menor que el valor calculado a partir de la secuencia de aminoácidos por un factor de aproximadamente 23 K y, similar al caso de MDTS6TSP1 descrita en el Ejemplo 6, fue una proteína madura en la que la región pro se escindió y se retiró en la secuencia de reconocimiento de furina proteasa. Como resultado, se observó que la primera secuencia de repetición de TSP-1 contada desde el extremo N es esencial para ejercer la actividad agreganasa de MDTS6.

Ejemplo 9-2

Degradación de agregano de tipo natural

Una porción de 90 µl de la solución de enzima de MDTS6 preparada en el Ejemplo 9-1 se mezcló con una solución de 10 µg de agregano de tipo natural (fabricado por Seikagaku Kogyo)/10 µl de TBS en un tubo de ensayo y se permitió que experimentara la reacción a 37°C durante una noche. Este producto de reacción se secó usando SpeedVac y después se disolvió en 100 µl de tampón Tris-acetato 10 mM (pH 7,6) que contenía 0,06 unidades de Condroitinasa ABC (fabricado por Seikagaku Kogyo), 0,024 unidades de queratanasa I (fabricado por Seikagaku Kogyo), 0,0004 unidades de queratanasa II (fabricado por Seikagaku Kogyo), PMSF 5 µM y EDTA 10 mM y se permitió que la solución experimentara la reacción a 37°C durante una noche. Una porción de esta solución de reacción se sometió a SDS-PAGE y después el producto se detectó usando el anticuerpo de ratón anti-neoepítipo de agreganasa como se muestra en el Ejemplo 7-3. En este caso, el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa usado fue una preparación fabricada por Biosource. El mismo resultado se obtuvo mediante el anticuerpo BC-3 que reconoce neoepítipo de agreganasa (Hughes C. E. *et al.*, Biochemical J., 305, 799-804, 1995).

Como resultado, se detectó una banda de 80 a 90 KDa en el caso de MDTS6Cys además de una banda de aproximadamente 150 KDa. Este patrón de degradación es coherente con el patrón de moléculas principales (todas generadas por degradación de agreganasa) observado en los líquidos sinoviales de articulaciones de pacientes con enfermedades articulares incluyendo OA y RA (Sandy J. D. *et al.*, J. Clin. Invest, 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. *et al.*, Arthritis Rheum., 36, 1214-1222, 1993) y también es coherente con el patrón de moléculas principales que tienen neoepítipo de agreganasa que se generan después de 12 a 24 horas de tratamiento con IL-1 y ácido retinoico en un sistema de cultivo de explante de cartílago articular de rodilla humana (Little C. B. *et al.*, Biochemical J., 344, 61-68, 1999) (Figura 5).

Ejemplo 10

Sistema de selección de sustancias que modifican la actividad agreganasa

Ejemplo 10-1

Preparación de MDTS6Cys y sustrato

Usando el método de transferencia de western mostrado en el Ejemplo 9-2 se confirmó que el agregano recombinante G1G2 y el agregano de tipo natural se escinden en el sitio entre Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ (denominado en lo sucesivo en este

ES 2 338 210 T3

documento “sitio de agrecanasa”) por MDTs6Cys sin purificación pero al igual que el sobrenadante de cultivo preparado por el método del Ejemplo 9-1. También, la escisión en el “sitio de agrecanasa” se observó cuando se continuó el cultivo en el Ejemplo 9-1 con el medio que contenía FBS al 10% sin cambiar al medio sin suero. Por consiguiente, el agrecano recombinante G1G2 preparado en el Ejemplo 7-1 se usó como el sustrato.

Ejemplo 10-2

Sistema de selección

Aunque la selección se puede llevar a cabo mediante el método con asistencia de transferencia de western mostrado en el Ejemplo 7-2 usando el agrecano recombinante o el agrecano de tipo natural como el sustrato, se construyó el siguiente sistema de ELISA para seleccionar un número más grande de compuestos que se tienen que ensayar.

Un sobrenadante de cultivo de MDTs6Cys, el agrecano recombinante G1G2 y un compuesto que se tiene que ensayar se mezclaron y se permitió que se produjera la reacción a 37°C durante varias horas, el producto resultante se adhirió a una placa de 96 pocillos (Nunc-Immune' Plate MaxiSorp™ Surface N° 439454; fabricado por Nunc), se bloqueó con solución de BSA al 1%/TBS y después se permitió que reaccionara con un anticuerpo anti-neoepítipo de agrecanasa de ratón y un conjugado de HRP-anticuerpo anti-IgG de ratón (fabricado por Biosource) en ese orden y después, la detección se realizó usando el Kit TMB Peroxidase EIA Substrate (fabricado por Bio-Rad) en las condiciones descritas en las instrucciones adjuntas para calcular la fuerza inhibidora de la actividad agrecanasa del compuesto que se tiene que ensayar usando la inhibición coloreada como un marcador. También, como un método modificado del mismo, el agrecano recombinante se adhirió a la placa de 96 pocillos (fabricada por Nunc) y se bloqueó con solución de BSA al 1%/TBS por adelantado y después un sobrenadante de cultivo de MDTs6Cys y un compuesto que se tiene que ensayar se añadieron al mismo y se permitió que la reacción progresara a 37°C durante varias horas, el producto resultante se permitió que reaccionara con un anticuerpo anti-neoepítipo de agrecanasa de ratón y un conjugado de HRP-anticuerpo anti-IgG de ratón (fabricado por Biosource) en ese orden y después la detección se realizó usando el Kit TMB Peroxidase EIA Substrate (fabricado por Bio-Rad) para calcular la fuerza inhibidora de actividad agrecanasa del compuesto que se tiene que ensayar usando la inhibición coloreada como un marcador. El criterio para seleccionar una sustancia que inhibe la actividad agrecanasa es preferiblemente 10 μ M o menos, más preferiblemente 1,0 μ M o menos como la fuerza de actividad de inhibición (CI_{50}).

Mediante este sistema de selección, se pudo seleccionar el compuesto A, el compuesto B, el compuesto C y el compuesto D mencionados anteriormente. La fuerza de inhibición de actividad agrecanasa (CI_{50}) fue 0,6 μ M para el compuesto A, 1,0 μ M para el compuesto B, 2,9 μ M para el compuesto C y 2,7 μ M para el compuesto D.

Con respecto a esto, el compuesto A, el compuesto B, el compuesto C y el compuesto D se sintetizaron de la misma manera que en el método de producción descrito en la publicación PCT número WO 90/05719. El espectro de masa de los compuestos respectivos es el siguiente. El compuesto A es MS = 426 (MH^+), el compuesto B es MS = 396 (MH^+), el compuesto C es MS = 502 (MH^+) y el compuesto D es MS = 440 (MH^+).

Ejemplo 11

Ejemplo 11-1

Preparación de células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo

Después de sacrificar un conejo (especie blanca Japonesa, macho, 1,0 a 1,5 kg) por sobredosis de anestesia, se extirpó la articulación de la rodilla y la capa de cartílago sobre la superficie de la articulación se retiró y se cortó finalmente usando un cuchillo quirúrgico. Los trozos cortados se trataron con tripsina-EDTA (0,25%-1 mM; fabricado por GIBCO-BRL) a 37°C durante 1 hora y después se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos y el precipitado resultante se lavó con DMEM. Esto se trató con colagenasa A (0,15%; Boehringer-Mannheim)/DMEM a 37°C durante 3 a 4 horas y después una fracción pasada a través de un filtro de tamiz de nylon (100 μ M, fabricado por Falcon) se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos para lograr la precipitación de las células del cartílago. Las células se lavaron exhaustivamente con medio DMEM/FBS al 10%, se suspendieron en medio DMEM/FBS al 10% hasta una densidad de 2×10^5 células/ml y después se inocularon en porciones de 200 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (fabricada por Asahi Technoglass). Tres días a partir de entonces, el medio se cambió a 200 μ l de medio DMEM/FBS al 10% que contenía 50 μ g/ml de ácido ascórbico (medio de ácido ascórbico en lo sucesivo en este documento) y el cultivo se continuó durante 3 días. Cuando se usó una placa de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Asahi Technoglass), la suspensión celular se inoculó en porciones de 6 ml/pocillo y se cultivó realizando el mismo intercambio de medio. Estas células se usaron en el ensayo siguiente.

Ejemplo 11-2

Degradación de proteoglicano de células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo

Las células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo de la placa de 96 pocillos descritas en el Ejemplo 11-1 se cultivaron durante 2 días usando 200 μ l del medio de ácido ascórbico complementado con 10

ES 2 338 210 T3

$\mu\text{Ci/ml}$ en concentración final de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ y se marcaron con el mismo, se lavaron 3 veces con 200 μl del medio de ácido ascórbico y después se cultivaron durante 1 día usando 200 μl del medio de ácido ascórbico. Después de la estimulación con IL-1 β o ácido retinoico todo *trans* y 0, 24 y 48 horas posteriores de cultivo, los sobrenadantes de cultivo se recuperaron en porciones de 20 μl y la radiactividad se midió usando Top Count (fabricado por Packard). Como resultado, el aumento de la radiactividad, concretamente la liberación de proteoglicano, se observó mediante la estimulación de 0,01 a 10 ng/ml de IL-1 β y el aumento en la radiactividad dependiente de concentración marcada, concretamente liberación de proteoglicano, se observó mediante la estimulación con ácido retinoico todo *trans* 0,1 a 10 μM (Figura 6).

Ejemplo 11-3

Inducción de expresión de ARNm de MDS6

Después de 3 días de cultivo con las células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo de placas de 6 pocillos descritas en el Ejemplo 11-1 cambiando el medio a medio de ácido ascórbico, se añadieron al mismo 10 ng/ml de IL-1 β o ácido retinoico todo *trans* 10 μM y se prepararon muestras de ARN total 2 y 6 horas a partir de entonces usando ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Cada una de las muestras se trató con DNasa I (fabricada por Nippon Gene), se sometió a tratamiento con fenol/cloroformo y después de recuperó mediante precipitación con etanol y el ARN total purificado de esta manera se disolvió en agua estéril tratada con DEPC. Usando hexámeros aleatorios como cebadores, 1 μg de este ARN total se sometió a una reacción de transcripción inversa y tratamiento de RNasa H usando el Sistema de RT-PCR Thermoscrip™ (fabricado por GIBCO-BRL, número de catálogo 11146-016) de acuerdo con las instrucciones adjuntas y el producto se diluyó 10 veces con agua estéril y se usó como una muestra de ADNc. Usando 5 μl de cada una de las muestras de ADNc obtenidas de este modo como el molde y las secuencias de oligoDNA representadas por SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 19 como cebadores, se realizó PCR en una condición de 94°C durante 2 minutos, 45 repeticiones de un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos y posteriormente 72°C durante 10 minutos. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en agarosa al 2% y se compararon las densidades de los fragmentos de ADN generados. Como resultado, la expresión del ARNm de MDS6 se indujo por IL-1 β y ácido retinoico todo *trans* y la fuerza de la expresión estaba relacionada con el grado de degradación de proteoglicano descrito en el Ejemplo 11-2 (Figura 7).

Ejemplo 12

Inhibición de degradación de proteoglicano en células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo mediante sustancias que inhiben la actividad agrecanasa

Cada uno de los compuestos A, B, C y D seleccionados mediante el sistema de selección del Ejemplo 10-2 se añadió al sistema de degradación de proteoglicano de células de cultivo primario de cartílago articular de rodilla de conejo antes de la estimulación con ácido retinoico todo *trans* 10 μM y se examinaron sus actividades inhibitoras de la degradación de proteoglicanos. Como resultado, los compuestos A y B mostraron la inhibición de degradación de proteoglicano de una manera dependiente de la concentración (Figura 8). La acción de inhibición de degradación de proteoglicanos (CI_{50}) de los compuestos C y D fue 6,3 μM para el compuesto C y 4,1 μM para el compuesto D. Por otra parte, la acción de inhibición de degradación de proteoglicano no se observó mediante compuestos que tienen la misma estructura principal de ácido hidroxámico pero muestran una inhibición de actividad agrecanasa débil, incluso a una concentración de 100 μM .

Ejemplo 13

Análisis de la secuencia de ADN de región promotora de MDS6

Un fragmento de ADN que corresponde a la región promotora de MDS6 se amplificó usando PCR a partir de las bibliotecas GenomeWalker DNA Sca I (Genome Walker™ Kits, CLONTECH número de catálogo K1803-1). Las secuencias de OligoDNA de los cebadores adaptadores AP-1 (SEC ID N°: 20) y AP-2 (SEC ID N°: 21) incluidos en el kit se usaron como cebadores directos y las secuencias de oligoDNA de SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 23 como cebadores inversos. El método ilustrativo fue como se ha descrito en las instrucciones adjuntas al kit, pero se usó TAKARA LA Taq (TAKARA LA Taq™, número de catálogo RR002A) en la PCR. La primera PCR se realizó usando las secuencias oligoDNA de SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 22 como cebadores en una condición de 7 repeticiones de un ciclo a 98°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, 32 repeticiones de un ciclo de 98°C durante 5 segundos y 67°C durante 3 minutos y 67°C durante 4 minutos. La segunda PCR se realizó en las mismas condiciones usando 5 μl de una solución preparada diluyendo la solución de reacción de la primera reacción 50 veces con tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) como el molde y las secuencias de oligoDNA de SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 23 como cebadores. Cuando el fragmento de ADN amplificado de esta manera de aproximadamente 3,7 kbp se sometió directamente a análisis de secuencia mediante método terminador de didesoxi usando el Secuenciador de ADN ABI377 (Applied Biosystems Inc.), se encontraron secuencias de ADN de aproximadamente 2,2 kbp, 0,36 kbp y 0,8 kbp divididas entre dos huecos no descifrables.

A continuación, para descifrar las secuencias de estos dos restos de hueso que no se pudieron descifrar mediante el análisis directo del fragmento de ADN amplificado por PCR, este fragmento de ADN se subclonó y la secuencia de nucleótidos de ADN se determinó. Como resultado, las secuencias de los restos de hueso fueron diferentes en los 8 clones determinados (SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31), de forma que se sugirió la presencia de polimorfismo génico. Con respecto a esto, se usó vector pZerO™-2 (Kit Zero Background/Kan Cloning, fabricado por Invitrogen, número de catálogo K2600-01) como el vector de clonación y la subclonación se realizó de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

Un plásmido preparado insertando el fragmento de ADN anterior en el sitio KpnI-XhoI de un plásmido informador pGV-B2 (fabricado por Toyo Ink) se introdujo en células HEK293 usando FuGene-6 y se midió la actividad de luciferasa después de 28 ó 48 horas de cultivo en condiciones de cultivo habituales usando un kit de color PicaGene (fabricado por Toyo Ink, número de catálogo PGK-L100). En este caso, el valor medido se normalizó mediante el valor de actividad de β -gal expresado por un plásmido de expresión de β -gal introducido simultáneamente pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech, número de catálogo 27-4508-01). La actividad de β -gal se midió usando el kit Galacto-Light Plus Kit (fabricado por TROPIX, número de catálogo BL300P). Como resultado, se observó un aumento marcado en la actividad de luciferasa que no se puede encontrar en el plásmido original pGV-B2. Este resultado indica que la actividad promotora está presente en el fragmento de ADN anterior.

Ejemplo 14

Expresión de MDTS6 en tejido articular de paciente con osteoartritis

Se preparó ARN total a partir de una parte afectada de un cartílago articular de rodilla de un paciente con osteoartritis (Adams M. E. *et al.*, Anal. Biochem., 202, 89-95, 1992) y la presencia de ARNm de MDTS6 se confirmó realizando RT-PCR usando el mismo como el molde de acuerdo con el Ejemplo 11-3. También, la presencia de proteína MDTS6 en la membrana sinovial y macrófagos se confirmó realizando tinción inmunológica de tejido usando un anticuerpo policlonal específico anti-MDTS6 humana de ratón.

Con respecto a esto, el anticuerpo policlonal específico anti-MDTS6 humana de ratón se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, la proteína MDTS6TSP1 preparada en el Ejemplo 6 se conjugó con KLH y los ratones se inmunizaron con la misma 4 a 5 veces para obtener una muestra de antisuero. A continuación, se preparó IgG a partir de este antisuero usando Protein G Sepharose 4 Fast Flow (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. A continuación, una columna en la que se fijó la proteína MDTS6TSP1 humana a Sepharose 4 Fast Flow activado por CNBr (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) se preparó de acuerdo con las instrucciones adjuntas. A partir de entonces, se preparó una fracción que se une a esta columna pero que no se une a una columna inmovilizada con proteína ADAMTS4TSP1 humana (agrecanasa-1; Tortorella M. D. *et al.* Science, 284, 1664-1666, 1999), proteína METH-1TSP1 (Vazquez F. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) o proteína METH-2TSP1 (Vazquez F. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999).

Aplicabilidad Industrial

La “agrecanasa de enfermedad articular” obtenida por la invención se caracteriza por que la misma se puede usar para la selección de una sustancia que inhibe significativamente la agrecanasa (un compuesto, un péptido, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo), debido a que la misma tiene una actividad agrecanasa. Con respecto al uso médico de la sustancia que inhibe significativamente la “agrecanasa de enfermedad articular”, se sugiere que la misma es eficaz para prevenir y tratar enfermedades que están causadas por anomalías (por ejemplo, aceleración, reducción, degeneración y similares) de la actividad agrecanasa o en la que se expresan las anomalías para provocar complicaciones, particularmente enfermedades articulares y enfermedades que muestran aceleración de la degradación de proteoglicano, más particularmente osteoartritis.

También, el gen promotor de la “agrecanasa de enfermedad articular” de la invención se caracteriza por que el mismo se puede usar para la selección de una sustancia que inhibe la actividad promotora del gen (un compuesto, un péptido, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo). Como el uso de la sustancia que inhibe la actividad promotora, se ha sugerido que es eficaz para prevenir y tratar enfermedades provocadas por la inhibición de la actividad promotora, particularmente enfermedades articulares como enfermedades que muestran aceleración de la degradación de proteoglicanos, más particularmente osteoartritis. Además, debido a que dos o más mutantes están presentes en el gen promotor, los mismos se pueden usar para su análisis de correlación con estas enfermedades.

REIVINDICACIONES

1. Una metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos de

- a) desde la 213^a posición hasta la 583^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 en la que de 1 a 10 restos aminoacídicos se sustituyen, suprimen y/o insertan o
- b) desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o que comprende una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 583^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 en la que de 1 a 10 restos aminoacídicos se sustituyen, suprimen y/o insertan o
- c) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 1^a posición hasta la 687^a posición de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 950^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una secuencia de aminoácidos desde la 213^a posición hasta la 687^a posición de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 o una cualquiera de estas secuencias en la que de 1 a 10 restos aminoacídicos se sustituyen, suprimen y/o insertan.

2. Un gen que codifica una secuencia de aminoácidos de la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en la reivindicación 1.

3. Un vector que comprende el gen descrito en la reivindicación 2.

4. Una célula hospedadora que comprende el vector descrito en la reivindicación 3.

5. Un método para producir la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en la reivindicación 1, que comprende usar la célula hospedadora descrita en la reivindicación 4.

6. Un anticuerpo frente a la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en la reivindicación 1.

7. Un método para seleccionar una sustancia capaz de inhibir una actividad agrecanasa de una metaloproteasa, que comprende permitir que la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en la reivindicación 1 se ponga en contacto con un compuesto que se tiene que ensayar.

8. Una composición farmacéutica para inhibir la degradación de proteoglicanos, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de inhibir la metaloproteasa que tiene una actividad agrecanasa descrita en la reivindicación 1 como un ingrediente activo.

9. Un gen representado por SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 o un gen representado por SEC ID N°: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 en el que de 1 a 10 bases se sustituyen, suprimen y/o insertan, que tiene una actividad promotora de agrecanasa de enfermedad articular.

FIG. 1

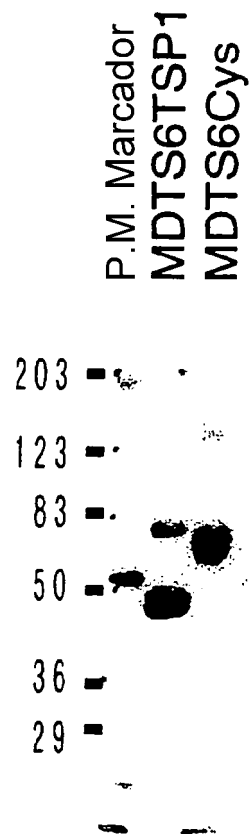


FIG. 2

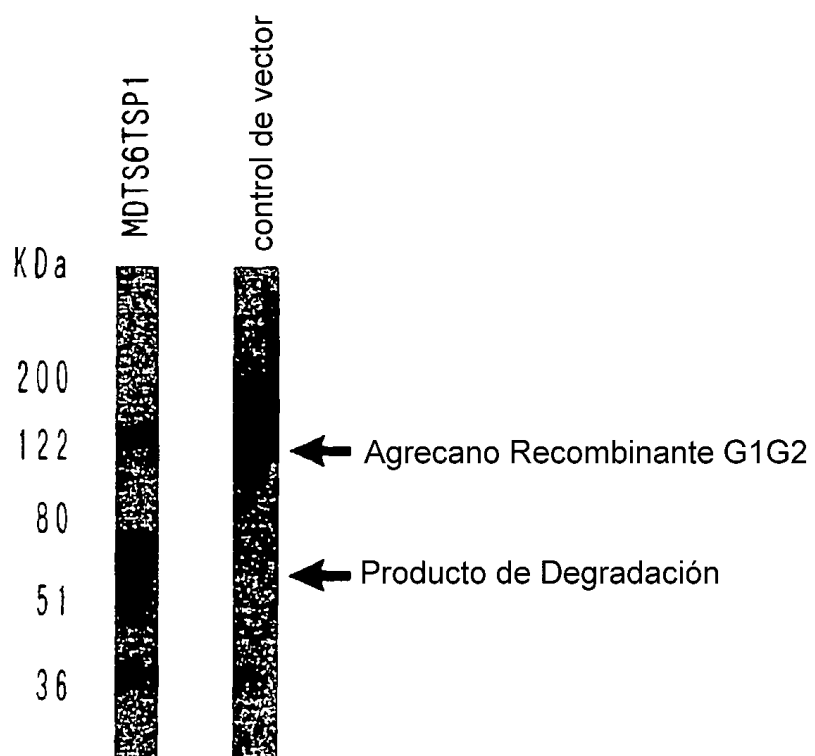


FIG. 3

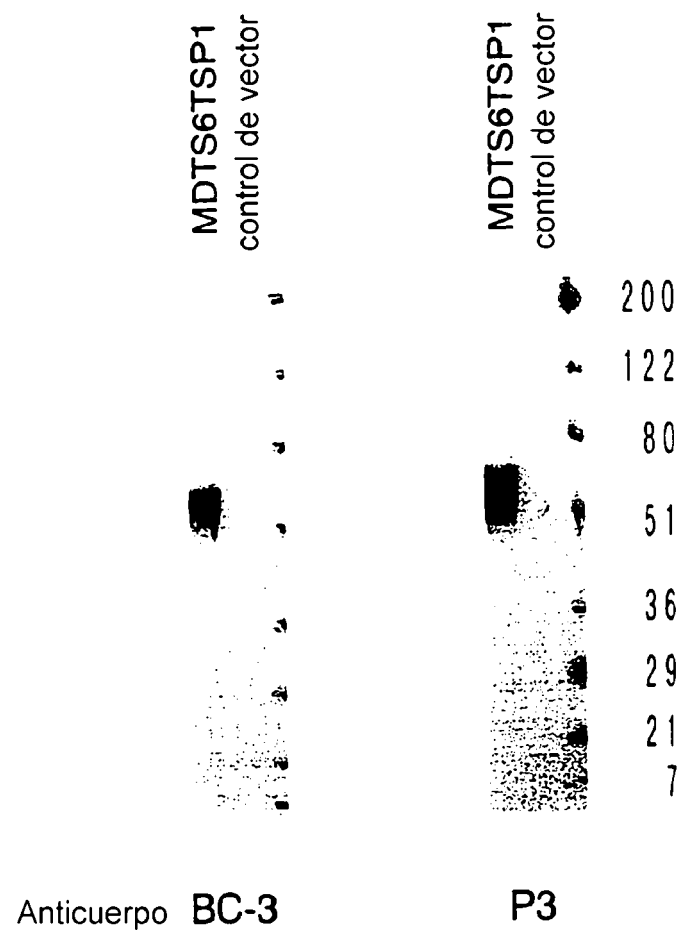


FIG. 4

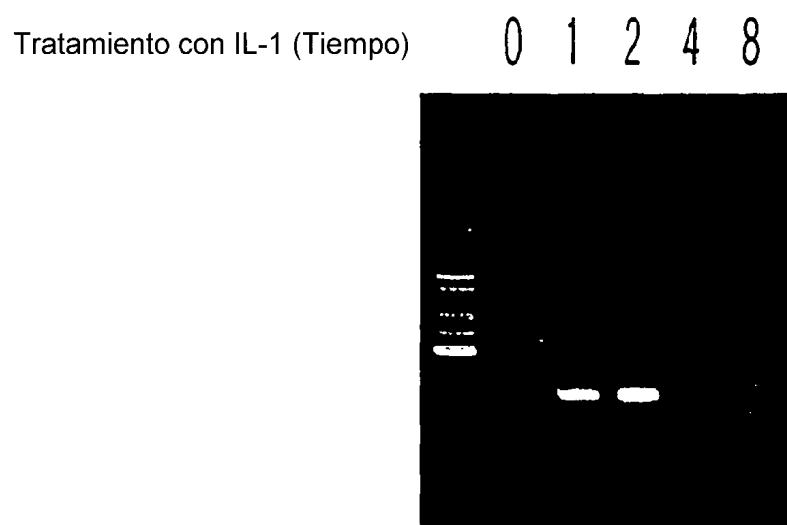


FIG. 5

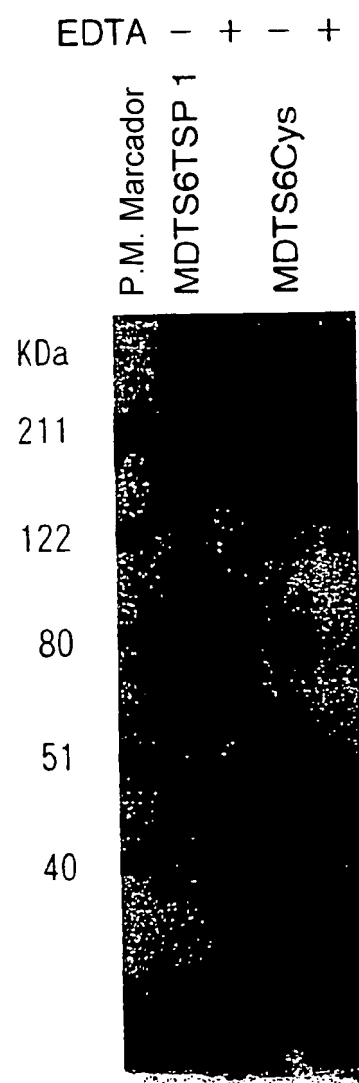


FIG. 6

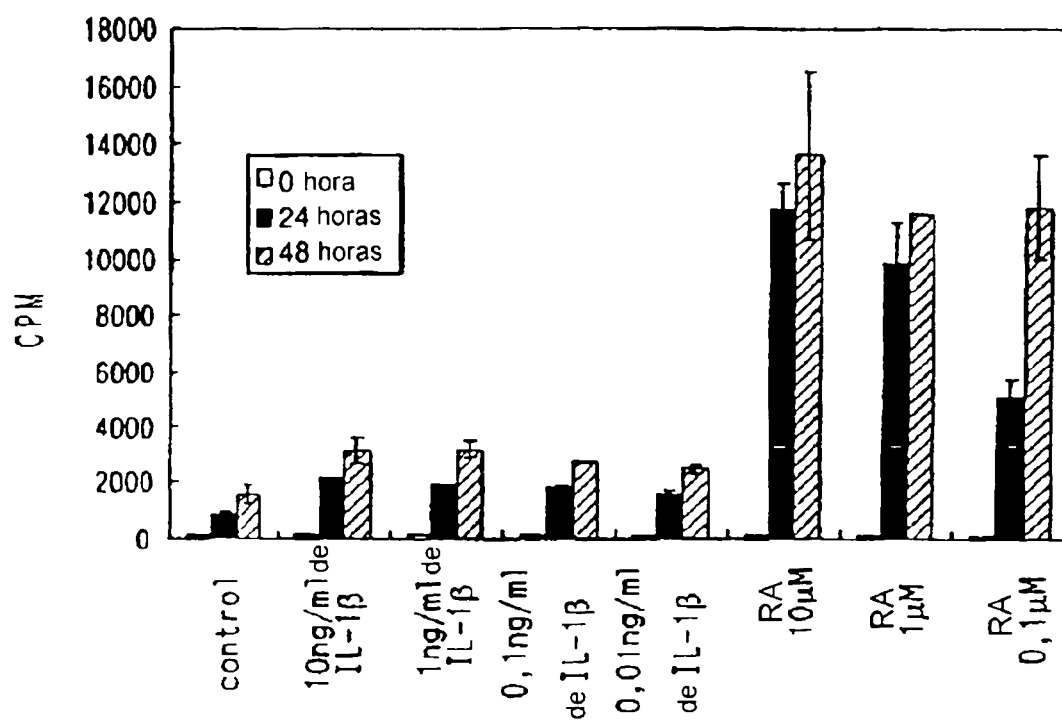


FIG. 7

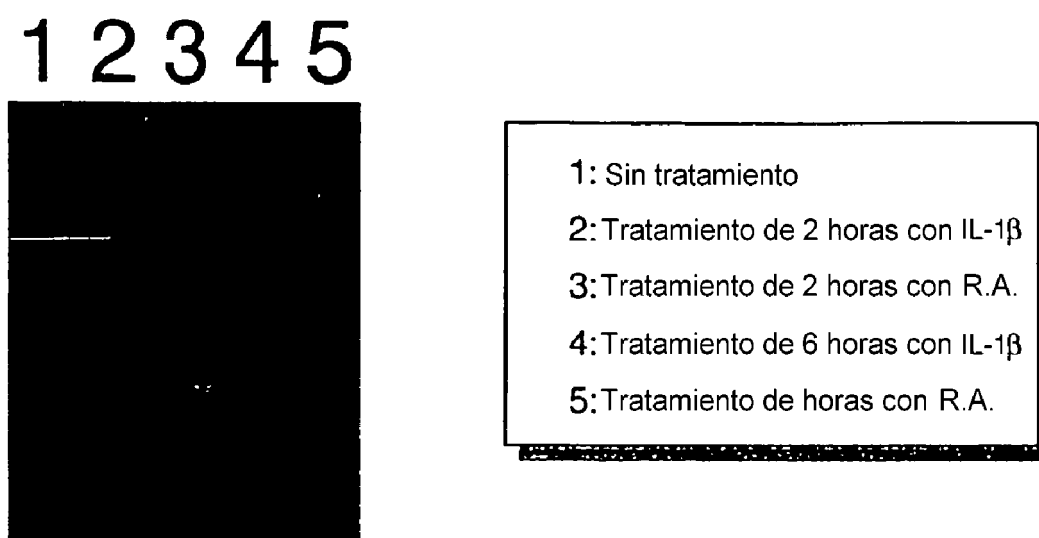
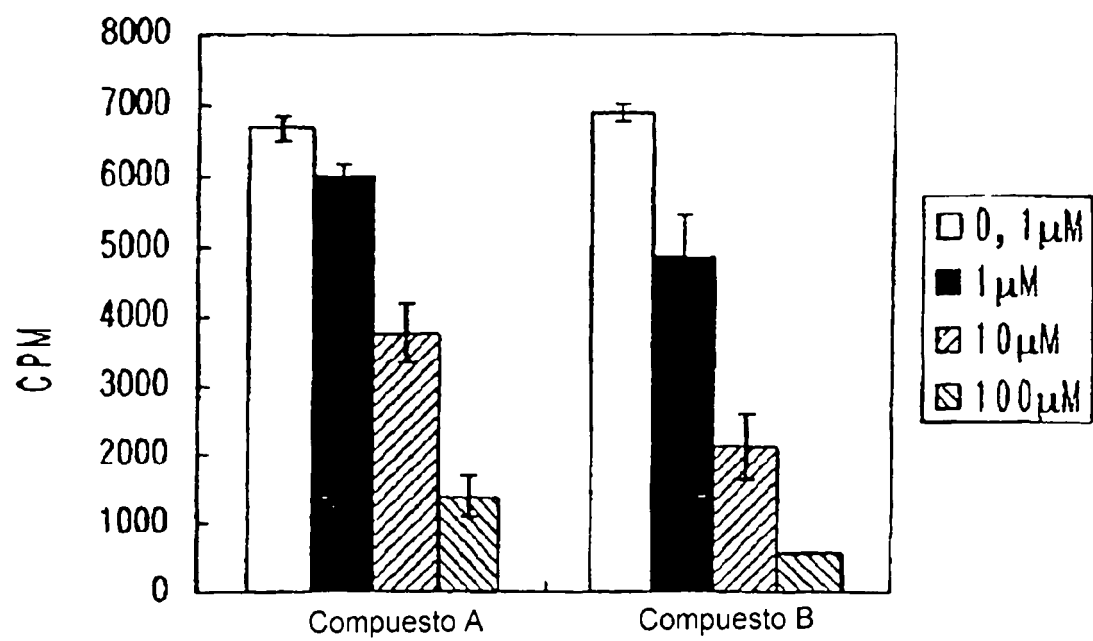


FIG. 8



ES 2 338 210 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Kazusa DNA Research Institute
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Metaloproteasa novedosa que tiene una actividad agrecanasa

<130> YK0029

<140>

<141>

<150> JP 1999-321740

<151> 11-11-1999

<150> JP 2000-144020

<151> 16-5-2000

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2. 0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met	Leu	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Ala	Phe	Ala	Gly	Arg	Thr	Ala
1				5					10					15	
Gly	Gly	Phe	Glu	Pro	Glu	Arg	Glu	Val	Val	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp
			20					25					30		
Pro	Asp	Ile	Asn	Gly	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Trp	Arg	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser
			35					40					45		
Gly	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Phe	Gln	Glu	Asp	Phe
			50					55					60		

ES 2 338 210 T3

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

ES 2 338 210 T3

	Leu	Pro	Ser	Ala	Phe	Thr	Thr	Ala	His	Glu	Leu	Gly	His	Val	Phe	Asn
				355				360					365			
5	Met	Pro	His	Asp	Asn	Val	Lys	Val	Cys	Glu	Glu	Val	Phe	Gly	Lys	Leu
				370			375					380				
10	Arg	Ala	Asn	His	Met	Met	Ser	Pro	Thr	Leu	Ile	Gln	Ile	Asp	Arg	Ala
	385					390					395				400	
	Asn	Pro	Trp	Ser	Ala	Cys	Ser	Ala	Ala	Ile	Ile	Thr	Asp	Phe	Leu	Asp
					405					410					415	
15	Ser	Gly	His	Gly	Asp	Cys	Leu	Leu	Asp	Gln	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser
				420					425						430	
20	Leu	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Ser	Tyr	Thr	Leu	Ser	Gln	Gln	Cys
			435				440						445			
	Glu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Gly	Ser	Lys	Pro	Cys	Pro	Tyr	Met	Gln	Tyr
		450				455					460					
25	Cys	Thr	Lys	Leu	Trp	Cys	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Met	Val	Cys
	465				470						475				480	
30	Gln	Thr	Arg	His	Phe	Pro	Trp	Ala	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Gly	Glu	Gly
				485					490					495		
	Lys	Leu	Cys	Leu	Lys	Gly	Ala	Cys	Val	Glu	Arg	His	Asn	Leu	Asn	Lys
35				500				505					510			
	His	Arg	Val	Asp	Gly	Ser	Trp	Ala	Lys	Trp	Asp	Pro	Tyr	Gly	Pro	Cys
			515					520					525			
40	Ser	Arg	Thr	Cys	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Leu	Ala	Arg	Arg	Gln	Cys	Thr
		530					535					540				
	Asn	Pro	Thr	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	Lys	Tyr	Cys	Glu	Gly	Val	Arg	Val
45		545				550				555					560	
	Lys	Tyr	Arg	Ser	Cys	Asn	Leu	Glu	Pro	Cys	Pro	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly
				565				570					575			
50	Lys	Ser	Phe	Arg	Glu	Glu	Gln	Cys	Glu	Ala	Phe	Asn	Gly	Tyr	Asn	His
			580					585					590			
	Ser	Thr	Asn	Arg	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Ala	Trp	Val	Pro	Lys	Tyr	Ser
55			595					600					605			
	Gly	Val	Ser	Pro	Arg	Asp	Lys	Cys	Lys	Leu	Ile	Cys	Arg	Ala	Asn	Gly
		610					615					620				
60	Thr	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Val	Leu	Ala	Pro	Lys	Val	Val	Asp	Gly	Thr	Leu
	625					630				635					640	

ES 2 338 210 T3

	Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys
5	645 650 655
	Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys
	660 665 670
10	Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu
	675 680 685
	Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala
15	690 695 700
	Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile
	705 710 715 720
20	Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu
	725 730 735
	Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val
25	740 745 750
	Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser
	755 760 765
30	Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu
	770 775 780
	Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu
35	785 790 795 800
	Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg
	805 810 815
40	Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val
	820 825 830
	Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp
45	835 840 845
	Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val
	850 855 860
50	Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala
	865 870 875 880
	Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr
55	885 890 895
	Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly
	900 905 910
60	Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu
	915 920 925

65

ES 2 338 210 T3

Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe
 930 935 940
 Cys Val Leu Arg Pro Cys
 945 950

<210> 2
 <211> 2853
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

```

atgcttttgc tgggcaccc t aaccctggct ttcccgggc gaaccgctgg aggccttgag 60
ccagagcggg aggtagtcgt tcccatccga ctggaccggg acattaacgg ccgccgctac 120
tactggcggg gtcccaggga ctccggggat cagggaactca ttttcagat cacagcattt 180
caggaggact ttacctaca cctgacggcg gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240
actgagcatt tgggcgtccc cctccagggg ctccaccggg gctcttcaga cctgcgacgc 300
tgcttctatt ctggggacgt gaaccggcag ccggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360
ggggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggccggcagc atgtcattag cccgctgccc 420
aatgctagcg cggccggcgg gcagcgcgac agccaggggc cacaccttct ccagcgccgg 480
gggtgtccgg gcgggccttc cggagacccc acctctcgct gcgggggtgg ctcgggctgg 540
aaccgcccca tctacgggc cctggaccc tacaagccgc ggccggcggg cticggggag 600
agtcgtagcc ggccgaggtc tgggcgcgcc aagcgtttcg tgtctatccc gcggtacgtg 660
gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcattg gtcaagtcc acggcgcgga cctggaacat 720
tatctgctga cgtgctggc aacggcgggc cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780
cccatcaaca tcgttgtgtt caaggctgct ctctttagag atcgtgactc cgggcccacg 840
gtcaccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900
aaagttagtg acaagcacc cgagtactgg gacactgcca tctctttcac caggcaggac 960
ctgtgtggag ccaccacctg tgacaccctg ggcatggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020
cccaagagaa gctgctcgtt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080
cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggagggt 1140
tttgggaagc tccgagccaa ccacatgatg tccccgaccc tcatccagat cgaccgtgcc 1200
aacccttggg cagcctgcag tgcctgcatc atcaccgact tcttggacag cgggcacggg 1260
gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggcgccc 1320
agctacaccc tgagccagca gtgcgagctg gcttttggcg tgggctccaa gccctgtcct 1380
tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440

```

ES 2 338 210 T3

cagacccgcc acttccccig ggcgagggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500
 aaaggggcct gcgtggagag acacaacctc aacaagcaca gggtaggatgg ttccctgggcc 1560
 5 aaatgggata cctatggccc ctgctcgcgc acatgttgtg ggggcgtgca gctggccagg 1620
 aggcagtgca ccaacccccac ccttgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgagggtg 1680
 aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc ccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740
 10 gaggagcagt gtgaggcttt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800
 gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcga gctcatctgc 1860
 cgagccaatg gcactggcta ctctatgtg ctggcaccga aggtgggtga cggcacgctg 1920
 15 tgctctctg actccacctc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggtctgtgat 1980
 gggaaacctg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tgggtggggg agacaataag 2040
 agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa ttctgtgtgt 2100
 20 gccatccccg caggcgcctc aagcatcgac atccgccagc gcggttacaagg ggcgtgac 2160
 ggggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgtc caacgggcat 2220
 25 ttctgtgtgt cggcggtgga gcgggacctg gttgtgaagg gcagtctgtc gcggtacagc 2280
 ggcacgggca cagcgggtga gagcctgcag gcttccccgc ccatcctgga gccgctgacc 2340
 gtggaggctc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgctactc ctctatctg 2400
 30 cccaaagagc ctccggaggga caagtctctc catcccaagg acccccgggg accctctgtc 2460
 ttgcacaaca gcgtcctcag cctctccaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520
 gcacgtggg tggctggcag ctggggggccg tgcctccgga gctgcggcag tggcctgcag 2580
 35 aagcgggccc tggactgccg gggctccgcc gggcagcgca cggctccctg ctgtgatgca 2640
 gcccatcgcc ccgtggagac acaagcctgc ggggagccct gccccacctg ggagctcagc 2700
 gccgtgtcac cctgtctcaa gagctgcggc cggggatttc agagcgctc actcaagtgt 2760
 40 gtgggccacg gaggccggct gctggcccg gaccagtga acttgaccg caagccccag 2820
 gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

45 <210> 3
 <211> 50
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

55 ctagecgggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa

50

<210> 4
 <211> 50
 60 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

65 gatcttatca ttgtcatcg tcgtcctgt agtcggatcc tgcggccgcg

50

ES 2 338 210 T3

	<210> 5	
	<211> 34	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
10	ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc	34
	<210> 6	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
20	ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc	29
	<210> 7	
	<211> 42	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
30	gtgtctagag ccatgctttt gctgggcac ctaaccctgg ct	42
	<210> 8	
35	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 8	
	agagcgcccg cctgctctc cgggaagctc ttccggagg c	41
45	<210> 9	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
55	aagcacaggg tggatgggtc ctgggcc	27
	<210> 10	
	<211> 37	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
65	gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag	37

ES 2 338 210 T3

	<210> 11	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
10	taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg	37
	<210> 12	
	<211> 59	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12	
20	atggatcctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcattggtg ccgggacag	59
	<210> 13	
25	<211> 97	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 13	
	agcttgccac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat ctcttgcccg gtattcgccg 60	
	actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97	
35	<210> 14	
	<211> 97	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
45	tcgagactag tggatcccct tgtcatcatc gtccttgtag tcggcgaata ccaggcagaa 60	
	gatgtagctc agggcgatga tcgtcttcac ggtggca 97	
	<210> 15	
50	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 15	
	acctcagcag ccagctccct tgtatacaca	30
60	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 338 210 T3

	<400> 16	
	cttgaggggg atggaccaat acagctttgg	30
5	<210> 17	
	<211> 38	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
15	agagcgggcg ctccagtcac cttcttcag ctcttatt	38
	<210> 18	
	<211> 27	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18	
25	gcggacgagt ccatggtcaa gttccac	27
	<210> 19	
30	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 19	
	ttctgccagg cgcagaagtt ggcgagc	27
40	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 20	
	gtaatacgac tcactatagg gc	22
50	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
60	actatagggc acgcgtggt	19
	<210> 22	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 338 210 T3

<400> 22

actgagcatc cggcgtcagg ttaggtaaa 30

5 <210> 23

<211> 30

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

15 agtcctcctg aaatgctgtg atctgaaaaa 30

<210> 24

<211> 3473

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <221> promotor

<222>

<400> 24

30

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60

tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgaatatatt gacctggctcg 120

35 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180

gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240

gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300

40 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360

ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420

atacatgcta atcccttga gcaaattcac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480

45 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540

ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctigccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600

50

55

60

65

ES 2 338 210 T3

5 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
 taggccccct ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcctgaact cccigtctca 780
 cacacagtc cccatcccc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccctcactg 900
 10 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc tccaagagt 960
 ggatccctta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
 agccttttct ctccctggac aatagagttc tcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
 15 attccaaaat tctcccatat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctccctctct 1140
 tgtccctccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200
 atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcccttgcc ttctcccttg tcagagaaag 1260
 20 aagtgtattc tgcggagagg taagaaggat ctgagggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggt caagggtcaa atgagataat 1440
 25 ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
 tgttaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
 gggtcatct tctgcccc aacccagct ctgatttgc tattcagggt gtglaaatac 1620
 30 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
 tgtctcagag ggttggcggg tctgttggt caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
 35 gaagcgacgg gtttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatcg 1860
 tggctcagcg ctgtagtc cgcaccggga ggccgagggt ggiggattgc ttgagctcag 1920
 40 gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tciaccaaaa atacacacac 1980
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcclagcg 2040
 tgggtctgtg tgtctgtgt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca 2100
 45 aggtaggagg atcacccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160
 ctgtctttac taaaaataca aaattagctg ggctgtgttg tgcatgccg taattccagc 2220
 tacttgggag gctgagacag gagaatggct lgaaccggga aggcggagtt tgcggtgagc 2280
 50 tgagatcgcg tcatgtcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaa 2340
 aagaaatata tatatatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatgtata tatatatatg 2400
 tatgtgtata tatalgtatg tgtgtgtgtg tgcatatata tatatacact ttgttlaatt 2460
 55 gtaagtgigt ttaglitaat ttttaataat gtccgtgatt aacagctggc tggcaagatt 2520
 cctgagaact gaagagtttg cccagccca tccagcacac catgggccc gggcagacct 2580
 tggggctagg cgtcttggg tccagaggg ctcccatgcc cctgtcctat tgccttctg 2640
 60 gcaataggac atttacgagg gggggggggg lggttcttga ttctgggtct tttaggggac 2700
 tctgtgalt aaaaacagca gggatgttgc aacagcaggg atgaggtggg cctggggacg 2760

65

ES 2 338 210 T3

ggtagtgaa ggggtcttcat tcctagctgc tgacctgac tgccctgaga taaaagacta 2820
 agaccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgtc gggacagtgg 2880
 5 ggataacca agagcaaac gcaaacctgag acttcagcgc cggtttctcg ggccagccca 2940
 cgcttcctgc ctacgtcaa tgccactccc tccccgcaa gtggctctcc gctctggagg 3000
 cgggaccgag ttctccgggtg gcccctggag gctccggcag cgagctctgg gaggctggga 3060
 10 ggggagttag gggagggggcg ctgactgggc cgtccaaaga ggagggggcc tttaataggc 3120
 tcgcccagcg cctggcttgc tgcgctgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180
 ccttccgcta gtctcggct gcaaactctt gtccttgac ttgacagcga ttgtacttaa 3240
 15 gctcccaggg cgcgcttgc ttggaaaggc acaggttaga agcgcgggct gccgggtgca 3300
 cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc ctggctctc cttctggga actgccggct 3360
 20 gtcccgtagc gttggcggtt ccagagtgcg ggctgcacgg agaccgcggc agcgccggga 3420
 gagcccggcc cagccccttc ccacagcgcg gcggtgcgct gccggcgcc atg 3473

25 <210> 25
 <211> 3467
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <221> promotor
 <222>
 35 <400> 25

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacct gggctctaaa 60
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgaatatatt gacctggctc 120
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
 45 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctgactctc 300
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
 50 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
 atacatgcta atcccttga gcaaattcac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
 55 ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctgcccataa cccatgggtc agaattgaaag 600
 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
 60 tgcttgcccc aaataaatga cttatcatig ctgttggttg tctgcgttc tctttaatta 720
 taggcccctt ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact ccctgtctca 780

65

ES 2 338 210 T3

cacacagtc ccacataccc atacactctc ttccatttgc agagtataaa caccatctc 840
 tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
 5 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt iccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
 ggatccttta tggggagaag ataattggca aaaagtgcct ttccatgatg gaccagtccc 1020
 agccttttct ctccttggac aatagagttc ttcccttga cagccacttc cctaaaaaaa 1080
 10 attccaaaat tctcccatc catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
 tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gcccttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
 atcaggagag agtagcaag cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
 15 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat ctgagggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
 20 ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
 tctaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
 gggctcatct tccgtccccc aacccagct ctgatttgcct tattcagggt gtgtaaatac 1620
 25 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggtcagc 1680
 acaccattta atatttccct cacatttcca ccccatctg cactcttttc tgggagttgc 1740
 tgtctcagag ggttggcggc tctgttggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
 30 gaagcgacgg gttttgagta ttatttacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860
 tggctcagcc ctgtagtccc cgcaccggga ggcgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
 gatttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
 35 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattggcct agcgtgggtg 2040
 cgtgtgtctg tggtcgcagt tactcaggag accaaggtag gaggtaggaa accaaggtag 2100
 gaggatcacc cgaggtcggt agttcgagac cagcctgacc aacatggaga aacccctgtct 2160
 40 ttactaaaaa tacaaaatta gctgggcgtg gtggtgcatt ccgttaattc cagctacttg 2220
 ggagcctgag acaggagaat ggcttgaacc cgggaaggcg agtttgcggt gagctgagat 2280
 cgcgtcattg cactccagcc tgggcaacaa gagcaaaact ccgtctcaaa aaaaaagaaa 2340
 45 tataatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400
 tataatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tataatatata cactttgitt aattgtaagt 2460
 50 gtgttttagtt taatttttaa taatgtccgt gattaacagc tggctggcaa gattccctgag 2520
 aactgaagag ttgccccag cccatccagc acaccaaggc ccagggcag acctggggc 2580
 taggcggctt tgggttccag agggctccca tgcctctgic ctattgtctt tctggcaata 2640
 55 ggacatttac gcgggggggg ggggtgggtc ttgattcttg gtcttttagg ggactctgtg 2700
 attagaagac agcaggagat ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760
 tgaagggtct tcattccatg ctgctgacct gatctgccct gagataaaag actaagacct 2820
 60 agagagttaa cgtgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880
 accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggtt ctggggccag cccagcctc 2940

65

ES 2 338 210 T3

ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000
cgagtctcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
5 tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggcctttaat aggctcgccc 3120
agcgccctggc ttgctgcgct gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180
gctagtcttc ggctgcaaat ctctgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240
10 agggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgctcg 3300
ccgccctggg aggagctcc ctcccttggc tcctcttctt gggaactgcc ggctgtcccg 3360
tagcgctggc ggttcagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420
15 ggcccagccc ctccacag cgcggcgggt gcctgccggg cgccatg 3467

<210> 26

<211> 3464

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> promotor

<222>

<400> 26

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacctt gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgaatatatt gacctggctc 120
ttaatcttagg taitatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
40 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacataatc ctagatcctc 300
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
45 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
50 ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga ctatcattg ctgttggtt tctgcgttct tctttaatta 720
55 taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780
cacacagctc tcccatacc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
60 gaattatggg catctgagcc atcticatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960

ES 2 338 210 T3

ggatcccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgcctc ttcactgatg gaccagtccc 1020
 agccttltct ctccttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
 5 attccaaaat tctcccacat catcccttt atgcittaaa tcatcacaca ctccttcttt 1140
 tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
 atcaggagag agtagcaaag cctccctct ctccttgcct ttcctccctg tcagagaaag 1260
 10 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttgaggct agagcctgaa aaactccttg 1320
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
 15 ttcattggagg aagcctggcc cgtttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
 tgtaacctga gccccagaa cttgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
 20 gggctcatct tctgcccc aaccccagct ctgatttgcct taticagggt gtgtaaatac 1620
 ttctaccagg acctatitca agccattgig atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
 25 tgtctcagag ggttggcggc tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
 gaagcgacgg gtttigagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860
 tggctcacgc ctgtatgcc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920
 30 gagttcaaga ccagcclggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaa atacacacac 1980
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtggtgtcg 2040
 tgtgtctgtg gtgcgagtt ctcaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100
 35 ggalcaccog aggtcggtag ttcgagacca gcccgaccaa catggagaaa cctgttcttt 2160
 actaaaaata caaaattagc tgggcgtggc ggtgcatgcc tgtaatcca gctacttggg 2220
 aggcctgagac aggagaatgg cttgaaccog gaaggcggag ttgcggtga gctgagatcg 2280
 40 cgtcatttga ctcagccctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtcacaaaa aaaagaaata 2340
 tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400
 tatatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatatata ctttgtttta ttgtaaggtt 2460
 45 gtttagttta atttttaala atgtccgiga ttaacagctg gctggcaaga ttccctgagaa 2520
 ctgaagagtt tgcctcagcc catccagcac accatggggc cagggcagac ctgggggcta 2580
 ggccgtcttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgtctctc tggcaatagg 2640
 50 acatttacgc gggggggggg gttgtcttg attctgggtc ttttagggga ctctgtgatt 2700
 aagaacacgc agggatgttg caacagcagg gatgagggtg gccggggac gggtcagtga 2760
 agggcttcca ttcttagctg ctgacctgat ctgccctgag ataaaagact aagaccacaga 2820
 55 gagtgaacgc tgtcccgagg ggcagaagcg agtgaggcgt cgggacagtg gggcataacc 2880
 aagagcaaaa cgcaaacctga gacttcagcg ccggtttctc gggccagccc acgcttcttg 2940
 60 cctcagctca atgtccactcc ctcccgcga agtggctctc cgtcttggag gcgggaccga 3000
 gttctccggt gggcccttga ggctccggca gcgagctctg gtaggctggg aggggagtga 3060
 ggggaggggc gctgactggg ccgtccaaag aggggggggc ctttaatagg ctgccccagc 3120

65

ES 2 338 210 T3

5 gccctggccttg ctgcgcctgcg agtggcctgcg gttgcgagaa gccgcccggc accttccgct 3180
 agttctcggc tgcaaatctt cgtccttgca cttgacagcg attgtactta agctcccagg 3240
 10 gcgcgcctttg ctgggaaagg cacaggtagg aagcgcgggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300
 ccctgggagg agtctccctc ccttggctct cctttctggg aactgccggc tgtcccgtag 3360
 cgctggcggc tccagagtgc gggctgcacg gagaccggc cagcggccgg agagcccggc 3420
 ccagccctt cccacagcgc ggcgggtgcgc tgcccggcgc catg 3464

15 <210> 27
 <211> 3469
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> promotor
 <222>
 25 <400> 27

30 ttgcacagct aagatctggc ggaggcatgc acacagggcc ctctgacctt gggctctaaa 60
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgaatatit gacctggctc 120
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
 35 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300
 aattccctgg caaaagtgat lggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcagca 360
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtcgaatgt tagcacatac taagccctga 420
 40 atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tctctcaggt 540
 ccttgccatc ttgactgaca lgtgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaataaag 600
 45 taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtga gtaaaacaat 660
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcatig ctgttgggtg tctgcgttc tctttaatta 720
 taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cctgtctca 780
 50 cacacagtc tcccatacc atacactctc ttctattgc agagtataaa caccatctc 840
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
 55 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
 ggatccctta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttacttgat gaccagtccc 1020
 agccctttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
 60 attccaaaat tctcccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140

65

ES 2 338 210 T3

5 tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
 alcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctggct ttctcccttg tcagagaaaag 1260
 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagggtct agagcctgaa aaactccctg 1320
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggigcgattg catcttctcc agctgatact 1380
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caaggggtcaa atgagataat 1440
 10 ttcattggagg aagccctggc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttccctc 1500
 tgttaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgigtacaa 1560
 gggctcalct tccgtcccc aacccagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620
 15 tctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
 tgtctcagag ggttggcgtt tctgggtgct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
 20 gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggig ggtggattgc ttgagctcag 1920
 gagttaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
 25 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtggt 2040
 gtctgtgtgc tgtgtgtgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100
 30 aggaggatca cccgaggctg gtagtctgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160
 ctttactaaa aatacaaaat tagctggcgg tgggtgtgca tgcctgtaat tccagctact 2220
 tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc. ggagtttgcg gtgagctgag 2280
 35 atcgcgtcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340
 aatataataa tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtatataa tatatgtatg 2400
 tgtatataa tgtatgtgtg tgtgtgtgca tataataa taacatttgi ttaattgtaa 2460
 40 gtgtgtttag ttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520
 agaactgaag agtttgccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg 2580
 gctaggcggc cttgggttcc agagggctcc catgcccctg tccatttgct cttctggcaa 2640
 45 taggacattt acgcgggggg ggggggtggt tcttgattct gggctcttta ggggacctg 2700
 tgattaaaga acagcaggga tgttgcaaca gcaggatga ggtgggcctg gggacgggtc 2760
 agtgaagggt cttcatctct agctgtgac ctgatctgcc ctgagataaa agactaagac 2820
 50 ccagagagtg aacgctgtcc gcgggggcag aagcgagtga ggcgtcggga cagtggggca 2880
 taaccaagag caaaacgcaa actgagactt cagcgccggt ttctcgggcc agcccacgcc 2940
 tcttgcttca gctcaatgcc actccctccc cgcaagtgg ctctccgtc tggaggcggg 3000
 55 accgagttct cgggtggccc ctggaggctc cggcagcgag ctctgggagg ctgggagggg 3060
 agtgagggga ggggcgttga ctgggcccgc caaagaggag ggggccttta ataggctcgc 3120
 ccagcggctg gcttgctgag ctgcgagtgg ctgcggttgc gagaagccgc ccggcacctt 3180
 60 ccgclagttc tgggtgcaa atcttctgct ttgacttga cagcgattgt acttaagctc 3240
 ccaggcgccg ctttgcttgg aaaggcacag gtaggaagcg cgggctgccg ggtgcacgct 3300
 65

ES 2 338 210 T3

cgccgcccctg ggaggagtct cccctcccttg gctctccctt ctgggaactg ccggctgtcc 3360
cgtagcgttg gcggttccag agtgcgggct gcacggagac cgcggcagcg gccggagagc 3420
5 ccggcccagc cccctcccac agcgcggcgg tgcgctgccc ggcgccatg 3469

<210> 28

10 <211> 3470

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> promotor

<222>

20 <400> 28

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
25 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca lgtaatattt gacctggtcg 120
ttatcttagg taitatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat accccttctc ttttgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240
30 tggagtgcga atcctgagta tcacctctac tcaagtgcic aacatatccc tagatcctca 300
attccctggc aaaagtgatt ggatggaacc acaggcttcc aagaggggac agtcaagcat 360
taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagcctgcaa 420
35 tacatgctaa tccctttag ccaatccaca tggccagitt ctgtgctcag gggigagaat 480
agctgggctg tgattggggc agggggagca ciaagtggga gggacttctt gtcctaggtc 540
cctgccatct tgactgacat gctgcagccc ttgccaaaac ccatgggtca gaatgaaagi 600
40 aaagtgccgt tgaaaacctt gcaatccacc ttlaaaactg ccgggigtat taaaacaatt 660
gcttgcccca aataaatgac tttatcatgc tglttggtgt ctgcgttctt cttlaattat 720
aggccctctt tgaacgcica aacacacagg gccittgtaa gcttgaactc cctgtctcac 780
45 acacagtcct cccatacca tacactctct ttcatittga gagtataaac acccatctct 840
cactcattca calaatgaat tticagctct tglgtcccaa lcaaggagag gccctactgg 900
50 aattatgggc atctgagcca tcttcatgtt ccaaggcccc agggggcgct tccaagagtg 960
gatcctttat ggggagaaga taatgggcaa aaagtgcctt tcactgatgg accagtccca 1020
gccitttctc tccittggaca atagagttct tcccttgaac agccacttcc ctaaaaaaaa 1080
55 ttccaaaatt ctccacatc atccccitta tgccttaaaat catcacacac tcccttcttt 1140
gtcctccctt cttagcaact caactcagag ccccttggct ccagaaagat ttictaggtta 1200
tcaggagaga gtagcaaagc ciccctctc tccittgcct tctcccttgt cagagaaaga 1260
60 agttgattct gcggagaggt aagaaggatc ttgaggtcta gaccctgaaa aactccttgg 1320

65

ES 2 338 210 T3

gctgttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgatigc atcttctcca gctgatactc 1380
 actcggcctc ctatgccagt cccaggtcca ggggttggtc aagggtcaaa tgagataatt 1440
 5 lcatggagga agcctggccc gatttttcta cigtitgttg gaagacagcc tcttctctt 1500
 glaactgcag cccagaacc tgatctccac atccctgcca ggcaggtagc tgtglacaag 1560
 ggctcaictt cctgccccca acccagctc tgatttgctt attcaggtgg tgtaaatact 1620
 10 tctaccagga cctatttcaa gccattgtga tgtccctgac tggggagalg cagggcagca 1680
 caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actcttttct gggagttgct 1740
 gtctcagagg gttaggggtt ctggtaggtc aagaccataa gtaattatca aatacttagg 1800
 15 aagcgacggg ttttgagtat ttattacctt ttaaaaaagt actttgtggc taggcattgt 1860
 ggctcacgcc tgtagtcccc gcaccgggag gccgaggtag gtggattgct tgagctcagg 1920
 20 agttcaagac cagcctgggc aacacggcga aaccagctc ctacacaaaa tacacacaca 1980
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaatggcc tagcgtggtg 2040
 tctgtgtgtc gtggtcgcag ttactcagga gaccaaggta ggaggttagga aaccaaggta 2100
 ggaggatcac ccgaggtagg tagttcgaga ccagcctgac caacatggag aaacctgtc 2160
 25 ttactaaaa atacaaaatt agctgggcgt ggtggtgcat gcctgtaatt ccagctactt 2220
 gggaaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaggcg gaggttgcgg tgagctgaga 2280
 tccgtctcatt gcactccagc ctgggcaaca agagcaaac tccgtctcaa aaaaaagaa 2340
 30 atatatatat atatgttgtt gtgtgttgtt gtgtgtgtat gtatatatat atatgtatgt 2400
 gtatatatat gtatgttgtt gtgtgtgcat atatatatat acactttgtt taattgtaag 2460
 35 tgtgtttagt ttaattttta ataatgtccg tgattaacag ctggctggca agattcttga 2520
 gaactgaaga gtttgcacca gcccatccag cacacatgg gccagggca gacctgggg 2580
 ctaggcgggc ttgggttcca gagggctccc atgccctgt cctattgctc ttctggcaat 2640
 40 aggacattta cgcggggggg gggggggggg ttcttgattc tgggtctttt aggggactct 2700
 gtgatttaaga aacagcaggg atgttgcaac agcaggagtg aggtggccct ggggacgggt 2760
 cagigaagggt tcttcattcc tagctgttga cctgattctc cctgagataa aagactaaga 2820
 45 cccagagagt gaacgctgtc cgcgggggca gaagcgagt aggcgtcggg acagtggggc 2880
 ataaccaaga gcaaacgca aactgagact tcagcgccgg ttctcgggc cagcccacgc 2940
 ctctgcctc agctcaatgc cactccctcc ccgccaagt gctctccgt ctggaggcgg 3000
 50 gaccgagttc tccggtggcc cctggaggct ccggcagcga gctctgggag gctgggaggg 3060
 gagtgaagggt aggggctgt actgggctgt ccaaagagga gggggccttt aataggctcg 3120
 cccagcgctt ggcttgcctc gctgcgagt gctgcggtt cgagaagccg cccggcacct 3180
 55 tccgctagtt ctgggtgca aatcttctc cttgcactt acagcgattg tacttaagct 3240
 cccagggcgc gctttgctt gaaaggcaca ggttaggaag cgggctgccc ggtgtcacgc 3300
 tccgcccctt gggaggagtc tccctccctt ggctctctt tctgggaact gccggctgtc 3360
 60 ccgtagcgtt ggcggttcca gagtgcgggc tgcacggaga ccgcggcagc ggcggagag 3420
 cccggcccag ccccttccca cagcgcggcg gtgcgctgcc cggcgccatg 3470

65 <210> 29
 <211> 3467

ES 2 338 210 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<221> promotor

<222>

10 <400> 29

```

15      ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
      tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagica tgtaatatit gacctggtcg 120
      ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
      gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
20      gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300
      aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcctc caagagggga cagicaagca 360
      ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcccgca 420
25      atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
      tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
      ccttgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
30      taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgtg gtaaaacaat 660
      tgcctgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
      taggcccctc ttgaacgcct aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780
35      cacacagtc ccccatacc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
      tcactcatic acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
40      gaattatggg catctgagcc atcttcaigt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
      ggatccctta tggggagaag ataatgggca aaaagtgcct ttcactgatg gaccagtcct 1020
      agccttttct ctcccttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
45      attccaaaat tctcccatat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
      tgcctcctcc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200
      atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
50      aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagagttc agagcctgaa aaactccttg 1320
      ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
      cactcggcct cctatgccag tcccagctcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
55      ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500

```

60

65

ES 2 338 210 T3

5 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
 t g t a a c t g c a g c c c c a g a a c c t g a t c t c c a c a t c c c t g c c a g g c a g g t a g c t g t g t a c a a 1560
 g g g c t c a t c t t c c t g c c c c c a a c c c c a g c t c t g a t t t g c t t a t t c a g g t g g t g t a a a t a c 1620
 t t c t a c c a g g a c c t a t t t c a a g c c a t t g t g a t g t c c c t g a c t g g g g a g a t g c a g g g c a g c 1680
 a c a c c a t t t a a t a t t t c c c t c a c a t t t c c a c c c c a t t c t g c a c t c t t t t c t g g g a g t t g c 1740
 t g t c t c a g a g g g t t g g c g g t t c t g g t g g c t c a a g a c c a t a a g t a a t t a t c a a a t a c t t a g 1800
 g a a g c g a c g g g t t t t g a g t a t t t a t t a c c t t t t a a a a a t g t a c t t t g t g g c t a g g c a t g g 1860
 t g g c t c a c g c c t g t a g t c c c c g c a c c g g g a g g c c g a g g t g g g t g g a t t g c t t g a g c t c a g 1920
 g a g t t c a a g a c c a g c c t g g g c a a c a c g g c g a a a c c c a g t c t c t a c c a a a a a t a c a c a c a c 1980
 a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a a a t t g g c c t a g c g t g g t 2040
 g t c g t g t g t c t g t g g t c g c a g t t a c t c a g g a g a c c a a g g t a g g a g g t a g g a a a c c a a g g t 2100
 a g g a g g a t c a c c c g a g g t c g g t a g t t c g a g a c c a g c c t g a c c a a c a t g g a g a a a c c c t g t 2160
 c t t t a c t a a a a a t a c a a a a t t a g c t g g g c g t g g t g g t g c a t g c c t g t a a t t c c a g c t a c t 2220
 t g g g a g g c t g a g a c a g g a g a a t e g c t t g a a c c c g g a a g g c g g a g t t t g c g g t g a g c t g a g 2280
 a t c g c g t c a t t g c a c t c c a g c c t g g g c a a c a a g a g c a a a a c t c c g t c t c a a a a a a a a g a 2340
 a a t a t a t a t a t a t a t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t a t g t a t a t a t a t a t a t g t a 2400
 t g t g t a t a t a t a t g t a t g t g t g t g t g t g t g c a t a t a t a t a t a c a c t t t g t t t a a t t g t a a 2460
 g t g t g t t t a g t t t a a t t t t t a a t a a t g t c c g t g a t t a a c a g c t g g c t g g c a a g a t t c c t g 2520
 a g a a c t g a a g a g t t t g c c c c a g c c c a t c c a g c a c a c c a t g g g c c c a g g g c a g a c c t t g g g 2580
 g c t a g g c g g t c t t g g g t t c c a g a g g g c t c c c a t g c c c c t g t c c t a t t g c t c t t c t g g c a a 2640
 t a g g a c a t t t a c g c g g g g g g g g g g t g g t t c t t g a t t c t g g g t c t t t t a g g g g a c t c t g t g 2700
 a t t a a g a a a c a g c a g g g a t g t t g c a a c a g c a g g g a t g a g g t g g g c c t g g g g a c g g g t c a g 2760
 t g a a g g g t c t t c a t t c c t a g c t g c t g a c c t g a t c t g c c c t g a g a t a a a a g a c t a a g a c c c 2820
 a g a g a g t g a a c g c t g t c c g c g g g g g c a g a a g c g a g t g a g g c g t c g g g a c a g t g g g g c a t a 2880
 a c c a a g a g c a a a a c g c a a a c t g a g a c t t c a g c g c c g g t t t c t c g g g c c a g c c c a c g c c t c 2940
 c t g c c t c a g c t c a a t g c c a c t c c c t c c c c g c c a a g t g g c t c t c c g c t c t g g a g g c g g g a c 3000
 c g a g t t c t c c g g t g g c c c c t g g a g g c t c c g g c a g c g a g c t c t g g g a g g c t g g g a g g g g a g 3060
 t g a g g g g a g g g g c g c t g a c t g g g c c g t c c a a a g a g g a g g g g g c c t t t a a t a g g c t c g c c c 3120
 a g c g c c t g g c t t g c t g c g c t g c g a g t g g c t g c g g t t g c g a g a a g c c g c c c g g c a c c t t c c 3180
 g c t a g t t c t c g g c t g c a a a t c t t c g t c c c t g c a c t t g a c a g c g a t t g l a c t t a a g c t c c c 3240
 a g g g c g c g c t t t g c t t g g a a a g g c a c a g g t a g g a a g c g c g g g c t g c c g g g t g c a c g c t c g 3300
 c c g c c c t g g g a g g a g t c t c c c t c c c t t g g c t c t c c t t t c t g g g a a c t g c c g g c t g t c c c g 3360
 t a g c g t t g g c g g t t c c a g a g t g c g g g c t g c a c g g a g a c c g c g g c a g c g g c c g g a g a g c c c 3420
 g g c c c a g c c c c t t c c c a c a g c g c g g c g g t g c g c t g c c c g g c g c c a t g 3467

<210> 30

<211> 3462

65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 338 210 T3

<220>

<221> promotor

<222>

5

<400> 30

```

10      ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
      tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120
      ttaacttagg tattaatcag accacagait ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
15      gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
      gtggagtggc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctatgacctc 300
      aatcccttgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
20      ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgit tagcacatc taagcctgca 420
      atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
      tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tctctcaggt 540
25      ccttccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctigccaaaa ccatgggtc agaataaag 600
      taaagtgccg tlgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
      tgcttgcccc aaataaalg cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
30      taggccctct tlgacgctc aaacacacag ggcctttgia agcttgaact cctgtctca 780
      cacacagtc tcccatacc atacactctc ttcaattgc agagtataaa caccatctc 840
      tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccctactg 900
35      gaattatggg catcigagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
      ggatccctta tggggagaag ataatgggca aaaagtgcic ttcactgatg gaccagtccc 1020
      agccttttct ctccttgga aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
40      attccaaaat tctcccatc catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctccttctt 1140
      tgcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200
      atcaggagag agtagcaaa cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
45      aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagccigaa aaactccttg 1320
      ggtgtttct caaactagat gggaacataa ggtgcgatig catcttctcc agctgatact 1380
      cactcggcct cctatgccag tcccagtc agggtttgg caagggicaa atgagataat 1440
50      ttcatggagg aagcctggcc cgattttct actgtttgt ggaagacagc ctttccctt 1500
      tgaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
55      gggctcatct tcttcccc caccacagct ctgatttgt tattcagggt gtgtaaatc 1620
      ttctaccagg acctattca agccattgt atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680

```

60

65

ES 2 338 210 T3

acaccattla atatttccct cacatttcca ccccatcttg cactcttttc tgggagttgc 1740
 tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
 5 gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tacttttgigg ctaggcatgg 1860
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
 gagtccaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
 10 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgicg 2040
 tgtgtctgtg gtcgcagtta ctacaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100
 ggatcaccgg aggtcggtag ttcgagacca gcctagccaa catggagaaa cctgtctttt 2160
 15 actaaaaata caaaattagc tgggcgtggt ggtgcatgcc tgtaatcca gctacttggg 2220
 aggcctgagac aggagaatgg ctgaacccg gaaggcggag ttgcccgtga gctgagatcg 2280
 cgctcatgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gctcaaaaaa aaaagaaata 2340
 20 tataatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtatgta tataatatata tgtatgtgta 2400
 tataatatgta tgtgtgtgtg tgtgcatata tataatatata cttgttttaa ttgtaagtgt 2460
 25 gtttagttta atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttccctgagaa 2520
 ctgaagagtt tgcctcagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac cttggggcta 2580
 ggccgtcttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640
 30 acatttacgc gggggggggg ggttcttgat tctgggtctt ttaggggact ctgtgattaa 2700
 gaaacagcag ggaatttgca acagcagga tgaggtgggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760
 ggtcttcatt cctagctgct gacctgatct gccctgagat aaaagactaa gacctcagaga 2820
 35 gtgaacgctg tccgcggggg cagaagcgag tgagggctcg ggacagtggg gcataaccaa 2880
 gagcaaaacg caaactgaga ctccagcgcc ggtttctcgg gccagccac gcctcctgcc 2940
 tcagctcaat gccactccct ccccgccaag tggctctcgg ctctggaggc gggaccgagt 3000
 40 tctccgggtg cccctggagg ctccggcagc gagctctggg aggcctggag gggagtgagg 3060
 ggagggggcg tgaactggcc gtccaaagag gagggggcct ttaataggct cggccagcgc 3120
 ctggcttgct gcgctgcgag tggctgcggt tgcgagaagc cggccggcac ctcccgctag 3180
 45 ttctcggctg caaatcttcg tccctgcact tgatagcgat tgtacttaag ctcccagggc 3240
 gcgctttgct tggaaaggca caggtaggaa gcgcgggctg ccgggtgcac gctcgccgcc 3300
 50 ctgggaggag tctccctccc ttggctctcc ttctcgggaa ctgccggctg tcccgtagcg 3360
 ttggcgggtc cagagtgcgg gctgcacgga gaccgcggca gcggccggag agcccgggcc 3420
 agcccccttc cacagcgcgg cggctgcgctg cccggcgcca tg 3462

55 <210> 31
 <211> 3455
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> promotor
 65 <222>

ES 2 338 210 T3

<400> 31

```

    ttgcacagct aagatctggg ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60
5   tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120
    ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagaccict 180
    gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
10  gtggagtgcc aatcctlgagt atcacctcta ctcaagtgct caacatatcc ctgatacttc 300
    aattccctgg caaaagtga tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
    ttaaatalcga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatggt tagcacatac taagcctgca 420
15  atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
    tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggt agggacttcc tgtctcaggt 540
    ccttgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa ccatgggtc agaatgaaag 600
20  taaagtggcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
    tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgttc tctttaatta 720
    taggcccctt ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cctgtctca 780
25  cacacagtcc tcccataccc atacactctc ttcatittgc agagtataaa caccatctc 840
    tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccctcactg 900
    gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
    ggatccttta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
    agccttttct ctccctggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
35  attccaaaat tctcccacat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
    tgtctctccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
    atcaggagag agtagcaaag cctccctctt ctccctggct ttctcccttg tcagagaaag 1260
40  aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttgaggctt agagcctgaa aaactccttg 1320
    ggctgtttct caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
    cactcggcct cctatgccag tccccagtcc aggttttggt caagggtcaa atgagataat 1440
45  ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctctt 1500
    tgtaactgca gccccagaac ctgataccta catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
    gggctcatct tcttgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggt gtgtaaatac 1620
50  ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
    acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
    tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
55  gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
    tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920

```

ES 2 338 210 T3

gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccacagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg tgggtgctgtg 2040
 5 tgtctgtggt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca aggtaggagg 2100
 atcacccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtctttac 2160
 taaaaataca aaattagctg ggcgtgggtg tgcattgcctg taattccagc tacttgggag 2220
 10 gctgagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagtt tgcggtgagc tgagatcgcg 2280
 tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa aaaaaatata 2340
 tatatatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg talgtatata tatatatgta tgtgtatata 2400
 15 tatgtatgtg tgtgtgtgca tatatatata tacacttltg ttaattgtaa gtgtgttttag 2460
 ttttaattltt aataatgtcc gtgatttaaca gctggcctggc aagattcctg agaactgaag 2520
 20 agtttgcctc agcccatcca gcacaccatg gcccagggc agacctggg gctaggcggg 2580
 ctgggttcc agagggtcc catgccccg tcctatltgt cttctggcaa taggacattt 2640
 acgcgggggg ggtgtgtctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700
 25 cagggatgtt gcaacagcag ggaatgagtg ggcctgggga cgggtcagtg aagggtcttc 2760
 attcctagct gctgacctga tctgccccga gataaaagac taagaccag agagtgaacg 2820
 ctgtccgcgg gggcagaagc gattgagcgc tggggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880
 30 acgcaaacctg agacttcagc gccggttctt cggggcagcc cagccctcct gccctagctc 2940
 aatgccactc cctccccgcc aagtggctct cgcctctgga ggcgggaccg agttctccgg 3000
 tggccccctg aggcctccgc agcgagctct gggaggtctg gaggggagtg aggggagggg 3060
 35 cgctgacttg gccgtccaaa gaggaggggg cctttaatag gctcgcccag cgctggctt 3120
 gctgcgctgc gattggctgc gtttgcgaga agccgcccgg cacttccgc tagttctcgg 3180
 ctgcaaatct tcgtccttgc acttgacagc gattgtactt aagctcccag ggcgcgcttt 3240
 40 gcttggaaaag gcacaggtag gaagcgcggg ctgccgggtg cagctcggc gccctgggag 3300
 gatttccctt ccttggctc tccttcttgg gaactgccgg ctgtcccgta gcgttggcgg 3360
 45 ttccagagtg cgggctgcac ggagaccgcg gcagcggcgg gagagcccg cccagccct 3420
 tccacagcg cggcgggtgc ctgccggcg ccatg 3455

<210> 32

50 <211> 11

<212> Péptido

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 32

Ala Arg Gly ser Val Val Leu thr Ala Lys Cys

60 1 5 10

<210> 33

65 <211> 13

<212> Péptido

<213> *Homo sapiens*

ES 2 338 210 T3

	<400>	33	
	Gly Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
5	1 5 10		
10	<210>	34	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	<i>Homo sapiens</i>	
15	<400>	34	
	agagcggccg cctgctggct cagggtag ctggcgcc		38
20	<210>	35	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
25	<213>	<i>Homo sapiens</i>	
	<400>	35	
30	agagcggccg cggaaccatc caccctgtgc ttgtgag		38
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			