



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 679**

51 Int. Cl.:

|                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| <b>C12N 15/09</b> (2006.01)  | <b>C07K 7/08</b> (2006.01)  |
| <b>C07K 14/47</b> (2006.01)  | <b>C07K 16/18</b> (2006.01) |
| <b>C12P 21/08</b> (2006.01)  | <b>A61K 38/17</b> (2006.01) |
| <b>A61K 39/395</b> (2006.01) | <b>A61K 48/00</b> (2006.01) |
| <b>A61P 3/02</b> (2006.01)   | <b>A61P 3/14</b> (2006.01)  |
| <b>A61P 13/12</b> (2006.01)  | <b>A61P 19/00</b> (2006.01) |
| <b>A61P 19/08</b> (2006.01)  | <b>A61P 19/10</b> (2006.01) |
| <b>A61P 35/00</b> (2006.01)  |                             |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01958379 .8**

96 Fecha de presentación : **10.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1310554**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Polipéptidos que controlan el metabolismo del ácido fosfórico, el metabolismo del calcio, el metabolismo de la calcificación y de la vitamina D y moléculas de ADN que los codifican.**

30 Prioridad: **11.08.2000 JP 2000-245144**  
**21.09.2000 JP 2000-287684**  
**22.12.2000 JP 2000-391077**  
**19.04.2001 JP 2001-121527**

73 Titular/es: **Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.**  
**1-6-1, Ohtemachi**  
**Chiyoda-ku, Tokyo, JP**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.09.2010**

72 Inventor/es: **Yamashita, Takeyoshi;**  
**Shimada, Takashi;**  
**Mizutani, Satoru y**  
**Fukumoto, Seiji**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.09.2010**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos que controlan el metabolismo del ácido fosfórico, el metabolismo del calcio, el metabolismo de la calcificación y de la vitamina D y moléculas de ADN que los codifican.

### Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un polipéptido que regula el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio, el metabolismo de la calcificación y/o de la vitamina D, da a conocer un ADN que codifica el polipéptido, una composición farmacéutica que contiene el polipéptido como ingrediente activo y un anticuerpo que reconoce el polipéptido, una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo como ingrediente activo, un procedimiento de diagnóstico que usa el anticuerpo y una composición de diagnóstico.

### Técnica anterior

Los fosfatos inorgánicos (a continuación, en el presente documento, pueden denominarse “fosfato”) son esenciales en el metabolismo energético *in vivo* y en el mantenimiento de las funciones celulares, y desempeñan una función importante en la calcificación de tejidos en cooperación con el calcio. El suministro de fosfato a un organismo depende principalmente de la absorción en el tracto intestinal, y la excreción de fosfato depende de la excreción urinaria en el riñón y la excreción fecal en el tracto intestinal. En los organismos vivos, el fosfato está distribuido en el líquido corporal, las fracciones intracelulares y los tejidos calcificados. El nivel de excreción de fosfato inorgánico en un adulto se mantiene prácticamente en el mismo nivel de la absorción de fosfato inorgánico, sugiriendo la presencia de un mecanismo regulador que mantiene la homeostasis del metabolismo del fosfato. Se sabe que el metabolismo del calcio, que comparte similitud con el metabolismo del fosfato en términos de distribución y control homeostático del nivel en la sangre, está controlado de una manera cooperativa en los mamíferos por factores reguladores, tales como, al menos la hormona paratiroidea, la calcitonina y la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3.

En la regulación del metabolismo del fosfato se sabe que la hormona paratiroidea promueve la excreción del fosfato, y que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 promueve la absorción del fosfato en el tracto intestinal. Esto sugiere claramente una estrecha asociación entre el metabolismo del fosfato y el metabolismo del calcio. Sin embargo, aún no se ha dilucidado una sustancia que controle principalmente el fosfato.

Ahora, los ejemplos de una enfermedad que está asociada con la pérdida de la homeostasis del metabolismo del fosfato y niveles más bajos de fosfato inorgánico en la sangre incluyen el hiperparatiroidismo primario, el raquitismo hipofosfatémico hereditario y la osteomalacia inducida por tumores.

El hiperparatiroidismo primario es una enfermedad caracterizada por una sobreproducción de hormona paratiroidea en las glándulas paratiroides, y se sabe que desarrolla hipofosfatemia con excreción aumentada de fosfato porque la sobreproducción de hormona paratiroidea suprime la reabsorción del fosfato inorgánico en el riñón.

Además, los ejemplos conocidos de hipofosfatemia como resultado de enfermedades hereditarias incluyen el raquitismo tipo I dependiente de la vitamina D, el raquitismo tipo II dependiente de la vitamina D y el raquitismo resistente a la vitamina D. El raquitismo tipo I dependiente de la vitamina D es una enfermedad causada por la disfunción hereditaria de la sintasa para producir metabolitos activos de la vitamina D y el raquitismo tipo II dependiente de la vitamina D es una enfermedad causada por la disfunción hereditaria del receptor de la vitamina D. Ambas enfermedades desarrollan hipofosfatemia junto con hipocalcemia debido a la acción atenuada de los metabolitos de la vitamina D3. En cambio, para el raquitismo resistente a la vitamina D, se sabe que existen al menos 2 tipos de afecciones clínicas, el raquitismo hipofosfatémico autosómico y el cromosómico ligado al cromosoma X como resultado de diferentes causas.

Ambas afecciones clínicas mencionadas anteriormente de raquitismo resistente a la vitamina D dan lugar a hipofosfatemia caracterizada por el fosfato renal. Recientemente, se ha mostrado en pacientes con el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (a continuación, en el presente documento, también denominado “XLH”) que la enfermedad está inducida por mutaciones en el gen que codifica una proteína análoga a la endopeptidasa, denominada PHEX, en el cromosoma X. Sin embargo, no se ha aclarado un mecanismo sobre cómo la disfunción de la proteína PHEX induce la hipofosfatemia. Es interesante destacar que el análisis genético de un ratón mutante natural (Hyp) que desarrolló hipofosfatemia ha revelado la delección parcial del gen que codifica PHEX en este ratón. Los experimentos realizados usando estos ratones han revelado que los ratones deficientes en PHEX tienen función renal normal, y un factor humoral, que es diferente de la hormona paratiroidea, pero que induce hipofosfatemia, está presente en el líquido corporal de los ratones Hyp. Con respecto al raquitismo/osteomalacia hipofosfatémico autosómico dominante (a continuación, en el presente documento, también denominado ADHR), se ha buscado un gen responsable para esta enfermedad, y la presencia de tal gen en la región 12p13 ha quedado indicada por el análisis de ligamiento. Sin embargo, la región que ha se ha estrechado hasta ese punto aún es amplia y contiene muchos genes, de modo que todavía no se ha especificado el gen candidato.

La osteomalacia inducida por tumores es una enfermedad que desarrolla hipofosfatemia con fosfato renal aumentado en asociación con tumorigénesis, y se caracteriza porque la hipofosfatemia se elimina por medio de la irradiación

del tumor o la eliminación del tumor. En esta enfermedad, se cree que el tumor produce un factor que induce la hipofosfatemia por la supresión de la reabsorción del fosfato en los riñones.

No se ha confirmado que una supuesta molécula causante del raquitismo resistente a la vitamina D sea idéntica a la responsable de la osteomalacia inducida por tumores. Sin embargo, los dos factores son idénticos en que claramente son factores desconocidos del metabolismo del fosfato que promueven la excreción urinaria de fosfato. Con frecuencia se hace referencia al supuesto factor regulador del metabolismo del fosfato con el nombre Fosfatona. La relación de este factor regulador del metabolismo del fosfato desconocido y el raquitismo resistente a la vitamina D o la osteomalacia inducida por tumores se ha resumido como comentarios generales (Neison, A. E., *Clinical Endocrinology*, 47: 635-642, 1997; Drezner, M. K., *Kidney Int.*, 57: 9-18, 2000).

Otra característica del raquitismo resistente a la vitamina D o de la osteomalacia inducida por tumores es el deterioro de la calcificación de los huesos. Podría pensarse que esta calcificación deteriorada de los huesos se desarrolla de manera secundaria por la hipofosfatemia. Sin embargo, puesto que se ha demostrado que la calcificación anormal del hueso en experimentos usando ratones Hyp, el ratón modelo para el raquitismo resistente a la vitamina D, se desarrolla independientemente de los niveles de fosfato (Ecarot, B., *J. Bone Miner. Res.*, 7: 215-220, 1992; Xiao, Z. S., *Am. J. Physiol.*, E700-E708, 1998), resulta razonable que el anterior factor regulador del metabolismo del fosfato desconocido pueda regular directamente la calcificación en el tejido óseo.

Como se describió anteriormente, los datos de investigación han estado sugiriendo fuertemente la presencia de un factor desconocido que regula el metabolismo del fosfato, pero aún no se ha podido dilucidar a nivel molecular una entidad que exhiba la supuesta actividad. Mientras que el documento WO99/60017 da a conocer una secuencia polipeptídica nueva como una hormona polipeptídica nueva, Fosfatona, no obstante, no da a conocer la actividad característica de la fosfatona con respecto a la inducción de la hipofosfatemia. Por consiguiente, resulta razonable que pueda existir en los organismos un factor intrínseco no identificado que regule el metabolismo del fosfato.

La vitamina D<sub>2</sub> y la vitamina D<sub>3</sub> ingerida de los alimentos, o la vitamina D<sub>3</sub> sintetizada en la piel son hidrolizadas por la vitamina D-25-hidroxilasa que se encuentra principalmente en el hígado para producir 25-hidroxivitamina D. A continuación, la 25-hidroxivitamina D es hidrolizada por la 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa presente en las células epiteliales renales de los túbulos proximales en el riñón para producir 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D. Esta 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D es una hormona reguladora mineral que tiene actividades fisiológicas que aumentan los niveles de calcio y de fosfato del suero, y se sabe que es responsable de la inhibición de la secreción de la hormona paratiroidea y que está implicada en la promoción de la resorción ósea. La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D se convierte a continuación en metabolitos *in vivo* que no tienen las actividades fisiológicas anteriores por la 24-hidroxilasa que se encuentra principalmente en el riñón o en el intestino delgado. Al respecto, se cree que la 24-hidroxilasa es una enzima que es responsable de la inactivación de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D. Por otra parte, se sabe que la 24-hidroxilasa actúa también sobre la 25-hidroxivitamina D y la convierte en 24,25-dihidroxivitamina D. Se ha informado que la 24,25-dihidroxivitamina D tiene efectos fisiológicos que aumentan la masa ósea o promueven la diferenciación del cartílago, sugiriendo que esta enzima tiene un aspecto para generar metabolitos biológicamente activos de la vitamina D.

Los factores conocidos que regulan el nivel de expresión de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, que tiene un papel importante en la activación de la vitamina D, incluyen la hormona paratiroidea (PTH), la calcitonina, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D y similares. La PTH, cuya secreción es promovida por disminuciones de los niveles de calcio de la sangre, actúa en los receptores de PTH que están presentes en las células epiteliales de los túbulos proximales renales para promover la transcripción del gen de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa a través de un elevado nivel intracelular de AMPc, para aumentar la concentración en sangre de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D. La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D promueve la absorción de calcio desde el tracto intestinal y la reabsorción de calcio en el riñón, aumentando de ese modo el nivel de calcio de la sangre. Además, se ha informado que la unión de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D al receptor de la vitamina D (VDR) actúa en una región promotora del gen de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa o del gen de la PTH para suprimir la transcripción de tales genes. Específicamente, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D tiene un mecanismo de control de retroalimentación para su factor de activación, PTH y 1 $\alpha$ -hidroxilasa. Este mecanismo desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo del calcio.

Recientemente, se ha informado que una disminución en el nivel de fosfato del suero potencia la expresión del gen de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa. En el metabolismo del fosfato, se asume también la presencia de un mecanismo que, por el aumento de la expresión del gen de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa asociado con el nivel disminuido de fosfato del suero, eleva el nivel de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D y, por consiguiente, corrige el nivel de fosfato del suero al promover la absorción de fosfato desde el intestino delgado.

Los ejemplos de un factor responsable de la regulación de la expresión del gen de la 24-hidroxilasa incluyen la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D y la PTH. Se ha demostrado que la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D interactúa con el receptor de la vitamina D (VDR) y el complejo se une a una secuencia de respuesta del receptor de la vitamina D que está presente en la región promotora del gen de la 24-hidroxilasa para promover la transcripción. Se cree que la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D activa la 24-hidroxilasa, y por consiguiente induce una disminución en el nivel de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D por la vía catabólica activada. Se sabe que la expresión del gen de la 24-hidroxilasa es suprimida por la PTH, pero se desconoce su mecanismo molecular detallado.

El documento WO 01/61007 da a conocer que los ratones transgénicos que expresan FGF tienen bajos niveles de fósforo en el suero. Dicho documento también da a conocer que el FGF-23 puede usarse para tratar, diagnosticar, aliviar o prevenir el ADHR.

El documento WO 02/08271 da a conocer un procedimiento para tratar pacientes con trastornos del metabolismo del fosfato.

El documento WO 01/66596 da a conocer que los productos de escisión del FGF-23 podrían desempeñar una función en el metabolismo del fosfato.

El documento WO 01/66595 da a conocer composiciones y procedimientos para tratar trastornos del metabolismo del fosfato usando un mutante de FGF-23 no escindible.

## Descripción de la invención

El propósito de la presente invención es proporcionar el uso de un factor nuevo procedente de tumores que sea capaz de inducir disminuciones en los niveles de fosfato de la sangre.

Resulta coherente que un tumor identificado en la osteomalacia inducida por tumores secreta un factor soluble que tenga actividad fisiológica, de modo que disminuyan los niveles de fosfato de la sangre. El factor procedente de tumores provoca el fallo de la homeostasis del metabolismo del fosfato. Por consiguiente, el factor puede estar caracterizado por uno cualquiera de los siguientes: (1) el factor, que no se produce originalmente *in vivo*, se produce específicamente por el tumor, (2) el factor se sobreproduce en el tumor, aunque también se produce en el tejido normal y (3) el factor se produce en el tumor sin control fisiológico.

Basándose en una suposición de que un factor inductor de hipofosfatemia procedente de tumores se produce de manera característica en un tumor procedente de osteomalacia inducida por tumores como se describió anteriormente, los autores de la presente invención han anticipado la transcripción aumentada de un gen que codifica el factor inductor de hipofosfatemia o mayor estabilidad del ARNm del factor en un tumor. Por consiguiente, tras la extracción del ARN de una parte de los tejidos tumorales que se extirparon de un paciente con osteomalacia inducida por tumores para fines terapéuticos, se preparó la biblioteca de ADNc usando vectores de fagos y vectores de plásmidos y a continuación se cribó para seleccionar los fragmentos génicos que se expresaban específicamente en el tumor. Los procedimientos realizados para el cribado fueron un procedimiento que selecciona los fragmentos de ADNc determinados por ser específicamente expresados en el tumor, y un procedimiento que selecciona los fragmentos de ADNc en una biblioteca de ADNc procedente de tumores que no reaccionan de manera cruzada con las sondas de ADNc procedentes de una línea celular de células epiteliales de los túbulos proximales del riñón. A continuación se redujo el número de fragmentos de ADNc seleccionados confirmando la novedad de las secuencias y la expresión característica en el tumor, obteniendo de ese modo una pluralidad de fragmentos de ADNc que se esperaba que codificaran el factor inductor de hipofosfatemia. A partir de la información de las secuencias, se intentó clonar los ADNc que contenían el marco de lectura abierto (ORF) al que pertenecía cada fragmento y se obtuvieron con éxito moléculas de ADN que codificaban polipéptidos nuevos. Se realizaron además estudios a fondo para encontrar actividades biológicas de los polipéptidos nuevos, de modo que la presente invención se completó dilucidando que el polipéptido nuevo tiene actividades en la supresión del transporte de fosfato, en la inducción de hipofosfatemia y en la supresión de la calcificación del tejido óseo en los animales.

Específicamente, la presente invención es como se detalla a continuación.

(1) el uso de un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos representada por 4,

En el presente documento, la expresión "condiciones rigurosas" satisface las condiciones de una concentración de sodio de 750 mM o más, de preferencia 900 mM o más, una temperatura de 40°C o más, de preferencia 42°C. Específicamente, las condiciones rigurosas están constituidas por 6 x SSC, 5 x Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% y 42°C.

También se describe un polipéptido, que es el siguiente polipéptido (a), (b), (c) o (d):

(a) un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 ó 4,

(b) un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 ó 4 por delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, y que tiene actividad inductora de hipofosfatemia, actividad supresora del transporte de fosfato, actividad supresora de la calcificación o actividad reguladora del metabolismo de la vitamina D *in vivo*,

(c) un polipéptido constituido por una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2, en el que la secuencia parcial anterior contiene al menos una secuencia de aminoácidos que se extiende desde el 34º hasta el 201º aminoácido en la secuencia de aminoácidos anterior, o

(d) un polipéptido constituido por una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2, en el que la secuencia parcial:

- (i) contiene una secuencia de aminoácidos que se extiende al menos desde el 34° hasta el 201<sup>er</sup> aminoácido en la secuencia de aminoácidos anterior,
- (ii) está constituida por una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia parcial por delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, y
- (iii) tiene actividad inductora de hipofosfatemia, actividad supresora del transporte de fosfato, actividad supresora de la calcificación o actividad reguladora del metabolismo de la vitamina D *in vivo*.

El polipéptido anterior también incluye un polipéptido modificado por al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por polietilenglicol, dextrano, poli (N-vinil-pirrolidona), homopolímero de polipropilenglicol, copolímero de poli(óxido de propileno) y poli(óxido de etileno), poliol polioxietilado y alcohol polivinílico.

También se da a conocer una composición farmacéutica que contiene el polipéptido anterior como ingrediente activo.

La composición farmacéutica anterior puede utilizarse para permitir la regulación *in vivo* del metabolismo del calcio, del metabolismo del fosfato, del metabolismo de la calcificación o de la vitamina D. Además, la composición farmacéutica anterior es eficaz contra al menos una afección seleccionada del grupo constituido por la hiperfosfatemia, el hiperparatiroidismo, la osteodistrofia renal, la calcificación ectópica, la osteoporosis y la hipervitaminosis D.

Se da a conocer un anticuerpo, que reacciona con el polipéptido anterior o con fragmentos parciales del mismo.

El anticuerpo anterior puede obtenerse por un procedimiento que comprende las etapas de inmunizar un animal con el polipéptido de la presente invención o con fragmentos parciales del mismo, como antígeno.

Se describe una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anterior como ingrediente activo.

La composición farmacéutica anterior puede regular el metabolismo del calcio, el metabolismo del fosfato, el metabolismo de la calcificación o de la vitamina D *in vivo*, o puede ser eficaz contra las enfermedades óseas. En el presente documento, la enfermedad ósea es al menos una enfermedad seleccionada del grupo constituido por la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget y la osteomalacia inducida por tumores. (9) Un agente de diagnóstico, que contiene el anticuerpo anterior y que es para una enfermedad que desarrolla al menos una anomalía de entre el metabolismo anormal del calcio, el metabolismo anormal del fosfato, la calcificación anormal y el metabolismo anormal de la vitamina D (por ejemplo, una enfermedad seleccionada del grupo constituido por la insuficiencia renal, la pérdida renal de fosfato, la acidosis tubular renal y el síndrome de Fanconi).

Se da a conocer un agente de diagnóstico para una enfermedad ósea, que contiene el anticuerpo anterior, siendo la enfermedad ósea al menos una enfermedad seleccionada del grupo constituido por la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget y la osteomalacia inducida por tumores.

Se describe un agente de diagnóstico, que contiene un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 11 o fragmentos parciales del mismo, y que es para una enfermedad que desarrolla al menos una anomalía de entre el metabolismo anormal del calcio, el metabolismo anormal del fosfato, la calcificación anormal y el metabolismo anormal de la vitamina D.

Un ejemplo de la secuencia parcial tiene una secuencia que se extiende desde el nucleótido 498° hasta el 12966° de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 11. Un ejemplo de la enfermedad es el raquitismo/osteomalacia hipofosfémica autosómico dominante.

La presente invención se explica con más detalle seguidamente.

Los términos usados en esta memoria descriptiva están definidos seguidamente.

La expresión “actividad para disminuir los niveles de 1,25-dihidroxitamina D3 de la sangre” indica una actividad que tiene efecto en la disminución de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D3 en la sangre.

La expresión “actividad inductora de hipofosfatemia” indica una actividad que tiene efecto en la disminución de los niveles de fosfato de la sangre. El nivel del fosfato de la sangre está definido por el equilibrio entre (i) la absorción desde el tracto intestinal y la excreción en la orina y las heces, y (ii) la distribución *in vivo* del fosfato a las células o a los tejidos calcificados representados por los tejidos óseos. Por consiguiente, la expresión “actividad inductora de hipofosfatemia” utilizada en la presente memoria descriptiva significa una actividad para disminuir los niveles de fosfato de la sangre en un organismo vivo sano, y no significa necesariamente una actividad para provocar

una hipofosfatemia patológica. La actividad inductora de hipofosfatemia puede ser equivalente, a nivel tisular, a la actividad de absorción-supresión del fosfato en el tracto intestinal, a la actividad de excreción-promoción del fosfato en el riñón o el tracto intestinal, o a la actividad que promueve la transferencia de fosfato dentro de las células.

5 Además, la expresión “actividad supresora del transporte de fosfato” en la presente invención significa una actividad que tiene efecto en una célula diana para suprimir la actividad de un vehículo transportador de fosfato que está presente en la membrana celular. Las posibles células diana son principalmente las células epiteliales de los túbulos renales, las células epiteliales de los intestinos o los osteoblastos.

10 Además, la expresión “actividad supresora de la calcificación” en la presente invención significa una actividad que suprime el proceso de generación o acumulación de sustancias cristalinas que contienen calcio y fosfato como composiciones en el tejido óseo y en los tejidos blandos.

15 Además, la expresión “actividad reguladora del metabolismo de la vitamina D *in vivo*” indica una capacidad para regular los cambios en las cantidades absolutas o en la relación de abundancia de vitamina D existente *in vivo* o de los metabolitos sintetizados *in vivo* a partir de la misma. La regulación *in vivo* de la vitamina D y de los metabolitos de la misma está regida principalmente por (i) la absorción o excreción en el tracto intestinal y (ii) la reabsorción o excreción en el riñón, seguida por (iii) la síntesis *in vivo* de la vitamina D, y (iv) la conversión metabólica dirigida principalmente por la reacción de hidroxilación. Los principales metabolitos conocidos resultantes de la conversión  
20 metabólica (iv) son los siguientes: 25-hidroxivitamina D que es producida por la hidroxilación en la posición 25 de la vitamina D por la vitamina D-25-hidroxilasa; 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D que es producida por la hidroxilación en la posición 1 $\alpha$  de la hidroxivitamina D por la 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa; o la 24,25-dihidroxivitamina D o 1 $\alpha$  24,25-trihidroxivitamina D que es producida por la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 24 del metabolito por la 24-hidroxilasa. La actividad de regulación del metabolismo de la vitamina D puede representarse  
25 como una actividad para regular una actividad enzimática, una expresión genética o cambios en los niveles de proteína expresados de enzimas implicadas en la generación de tales metabolitos de la vitamina D.

30 1. ADN que codifica el polipéptido que regula el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio, el metabolismo de la calcificación y de la vitamina D

#### (1) Clonación del ADN

35 Un ADN representado por ID. SEC. N° 1, que es uno de los ADN de la presente invención, se obtiene cribando una biblioteca de ADNc preparada usando una parte de un tumor extirpado de un paciente con probable osteomalacia inducida por tumores.

La osteomalacia inducida por tumores es una enfermedad que desarrolla hipofosfatemia y osteomalacia por calcificación insuficiente de los tejidos óseos en asociación con la presencia de tumores, y se caracteriza porque la eliminación del tumor provoca la desaparición de estos síntomas. Ha habido informes de que los extractos de los tumores promueven la excreción urinaria de fosfato en ratas (Popvtzer, M. M. y col., Clinical Research 29: 418A, 1981), y que se indujo hipofosfatemia en un experimento de trasplante de tumores extirpados en ratones (Miyauchi, A. y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 67: 46-53, 1988). Por consiguiente, se ha considerado que los tumores producen y secretan un factor sistémico desconocido.

45 Los solicitantes utilizaron un caso referido al tumor descrito en Fukumoto, S. y col., Bone 25: 375-377, 1999. En este caso, se consiguió una recuperación significativa de la hipofosfatemia por la extirpación quirúrgica del tumor. Además, el tamaño del tumor en este caso era pequeño, con un diámetro de aproximadamente 1 cm. Basándose en una deducción de que un tejido tan pequeño produce y secreta una sustancia activa que induce hipofosfatemia y osteomalacia sistémica, los solicitantes han anticipado que la biblioteca de ADNc procedente del tumor que han  
50 preparado contiene, en una frecuencia más alta comparada con otra biblioteca de ADNc procedente de tejido, al menos un fragmento parcial del gen que codifica la sustancia activa implicada en la inducción de tal afección clínica. Por consiguiente, para identificar una secuencia del fragmento del gen que codifica la sustancia activa procedente del tumor, se extrajeron los fragmentos de ADNc que son específicamente abundantes en la biblioteca de ADNc del tumor  
55 por un procedimiento de cribado diferencial.

A continuación se identificaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADNc obtenidos y se compararon unas con otras. Posteriormente, basándose en el solapamiento de las secuencias de nucleótidos, se prepararon  
60 cóntigos para clasificar cada secuencia que se creía que era procedente del mismo gen. Las búsquedas de homología se realizaron para las secuencias de nucleótidos obtenidas de ese modo con las secuencias de nucleótidos registradas en Genbank que es la bases de datos proporcionada por National Center for Biotechnology Information (EEUU) (a continuación, en el presente documento, puede también denominarse “NCBI”). Por consiguiente, se obtuvo la secuencia de nucleótidos que es específicamente abundante en la biblioteca de ADNc del tumor, es decir, una secuencia que se extiende desde el nucleótido N° 1522 hasta el nucleótido N° 2770 de la secuencia de nucleótidos representada por  
65 ID. SEC. N° 1. Esta secuencia fue idéntica a una parte de la secuencia humana, 12p13 BAC RPC111-388F6 registrada en Genbank bajo de número de referencia AC008012. Se cree que esta secuencia registrada representa una secuencia parcial de la región 12p13 de una secuencia del cromosoma humano. Aunque las localizaciones de los genes estimados dentro de la secuencia registrada se mostraron con la información de la secuencia de nucleótidos, la secuencia que se

extiende desde el nucleótido N° 1522 hasta el 2770 de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 y la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 de la presente invención no se incluyeron en ninguna de las regiones especificadas de los genes estimados.

A continuación se diseñaron las sondas y los cebadores de PCR basándose en la secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido N° 1522 hasta el 2770 de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1, posteriormente se aisló y se identificó una secuencia de nucleótidos continua contenida en la biblioteca de ADNc del tumor, obteniendo de ese modo la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1. La secuencia de nucleótidos de ID. SEC. N° 1 tenía un marco de lectura abierto (a continuación, en el presente documento, puede también denominarse "ORF") que codificaba un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 que se deduce que tiene una señal de secreción. Los solicitantes han considerado que este es un polipéptido que tiene una secuencia nueva, porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido no se ha registrado en las bases de datos de secuencias de aminoácidos de Genbank. Después de una búsqueda usando la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 y la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2, los solicitantes han identificado una secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 9 y una secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 10, que se cree que son ortólogos murinos de la molécula. Como se describe a continuación, una proteína recombinante preparada según una secuencia de aminoácidos humana muestra actividad en ratones. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 se comparó con la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 10 o secuencia de longitud total murina (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 277 (2), 494-498), de modo que la presente invención hace posible evaluar fácilmente si las proteínas, en las que un aminoácido diferente de los aminoácidos conservados entre los dos ha sido sustituido, tienen actividad biológica equivalente o similar a la del polipéptido de la presente invención.

## (2) Determinación de la secuencia de nucleótidos

Se determina la secuencia de nucleótidos del ADN obtenido como se describió en (1) anteriormente. La secuencia de nucleótidos puede determinarse por medio de técnicas conocidas, tales como el procedimiento de modificación química de Maxam-Gilbert o un procedimiento de terminación de cadena de didesoxinucleótidos usando el fago M13. Normalmente, la secuenciación se realiza usando un secuenciador automático (por ejemplo, el secuenciador de ADN 373A fabricado por PERKIN-ELMER).

La secuencia de nucleótidos del ADN se da como ejemplo en ID. SEC. N° 1, y la secuencia de aminoácidos del polipéptido se da como ejemplo en ID. SEC. N° 2. Mientras el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos tenga actividad inductora de hipofosfatemia, actividad supresora del transporte de fosfato, actividad supresora de la calcificación o actividad reguladora de los metabolitos de la vitamina D, la secuencia de aminoácidos puede contener una mutación, tal como una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos.

Por ejemplo, pueden deleccionarse 1 o varios aminoácidos, de preferencia 1 a 10, de más preferencia 1 a 5 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2; pueden adicionarse 1 o varios aminoácidos, de preferencia 1 a 10, de más preferencia 1 a 5 aminoácidos a la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2; o pueden sustituirse 1 o varios aminoácidos, de preferencia 1 a 10, de más preferencia 1 a 5 aminoácidos con uno u otros aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2.

Además, como procedimiento de sustitución, puede realizarse la sustitución conservadora dentro de una familia que retenga hasta cierto punto las características de los aminoácidos. Los ejemplos de familias clasificadas generalmente según las características de las cadenas laterales de los aminoácidos son los siguientes.

(i) Familia de aminoácidos ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico.

(ii) Familia de aminoácidos básicos: lisina, arginina, histidina.

(iii) Familia de aminoácidos no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano.

(iv) Familia de aminoácidos polares sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina.

(v) Familia de hidroxiaminoácidos alifáticos: serina, treonina.

(vi) Familia de aminoácidos que contienen amida: asparagina, glutamina.

(vii) Aminoácidos alifáticos: alanina, valina, leucina, isoleucina.

(viii) Familia de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptófano, tirosina.

(ix) Familia de aminoácidos hidrófobos: leucina, isoleucina, valina.

(x) Familia de aminoácidos pequeños: alanina, serina, treonina, metionina, glicina.

## ES 2 344 679 T3

Los ejemplos de sustitución son las secuencias que proceden de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 por la sustitución de la 176ª Arg y/o 179ª Arg con uno u otros aminoácidos, de preferencia, Ala, Gln o Trp, de modo que la escisión esté inhibida o suprimida en las mismas. Además, el polipéptido también abarca un polipéptido constituido por una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 por la delección de 10 o más aminoácidos en el lado N terminal, en el lado C terminal o en ambos lados (tipo delección terminal). Los ejemplos de tales formas de delección terminal incluyen una secuencia derivada de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 por la delección de 20, 40, 45 ó 50 aminoácidos en el lado C terminal y/o de 24 ó 33 aminoácidos en el lado N terminal. Las formas de realización de los tipos delección terminal son como se muestran a continuación.

| Número de aminoácidos delecionados en el extremo N terminal | Número de aminoácidos delecionados en el extremo C terminal | Posición en la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 (Nucleótido N° en ID. SEC. N° 1) |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 33 en el lado N terminal                                    | Sin delección                                               | 34-251 (232-885)                                                                                        |
| 33 en el lado N terminal                                    | 20 en el lado C terminal                                    | 34-231 (232-825)                                                                                        |
| 33 en el lado N terminal                                    | 40 en el lado C terminal                                    | 34-211 (232-765)                                                                                        |
| 33 en el lado N terminal                                    | 45 en el lado C terminal                                    | 34-206 (232-750)                                                                                        |
| 33 en el lado N terminal                                    | 50 en el lado C terminal                                    | 34-201 (232-735)                                                                                        |
| 24 en el lado N terminal                                    | Sin delección                                               | 25-251 (205-885) (correspondiente al 1º hasta el 681º en ID. SEC. N° 3 y en ID. SEC. N° 4)              |
| 24 en el lado N terminal                                    | 20 en el lado C terminal                                    | 25-231 (205-825)                                                                                        |
| 24 en el lado N terminal                                    | 40 en el lado C terminal                                    | 25-211 (205-765)                                                                                        |
| 24 en el lado N terminal                                    | 45 en el lado C terminal                                    | 25-206 (205-750)                                                                                        |
| 24 en el lado N terminal                                    | 50 en el lado C terminal                                    | 25-201 (205-735)                                                                                        |
| Sin delección                                               | 20 en el lado C terminal                                    | 1-231 (133-825)                                                                                         |
| Sin delección                                               | 40 en el lado C terminal                                    | 1-211 (133-765)                                                                                         |
| Sin delección                                               | 45 en el lado C terminal                                    | 1-206 (133-750)                                                                                         |
| Sin delección                                               | 50 en el lado C terminal                                    | 1-201 (133-735)                                                                                         |

Además de los fragmentos parciales (fragmentos parciales del tipo delección terminal) de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 anterior, el polipéptido abarca los fragmentos mutados procedentes de estos polipéptidos del tipo delección terminal por delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos. Los números entre paréntesis que aparecen después de los números de posición de los aminoácidos mostrados en ID. SEC. N° 2 en la lista anterior indican los números de posición de los nucleótidos en la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1. Por consiguiente, en el presente documento también se dan a conocer moléculas de ADN constituidas por las secuencias de nucleótidos mostradas por estas posiciones, o moléculas de ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas a estos ADN.

Para introducir una mutación en al menos una parte de la secuencia de aminoácidos del polipéptido dado a conocer en el presente documento, se utiliza una técnica que introduce una mutación en la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica el aminoácido.

Las mutaciones pueden introducirse en el ADN por una técnica conocida, tal como el método de Kunkel o el procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio con muesca bicatenaria (Gapped duplex), o un procedimiento según los mismos. Por ejemplo, se introduce una mutación basándose en el procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio usando un oligonucleótido mutante como cebador. Además, también puede introducirse una mutación usando un kit para introducir mutaciones, tales como los kits Mutan-K (TAKARA), Mutan-G (TAKARA), el kit de la serie LAPCR *in vitro* Mutagénesis (TAKARA) o similares.

Además, el ADN anterior también abarca un ADN que hibrida bajo condiciones rigurosas a una sonda preparada a partir del ADN anterior (ID. SEC. N° 1, 3, 5, 7 y 9) y que codifica un polipéptido que tiene actividad inductora

de hipofosfatemia, actividad supresora del transporte de fosfato, actividad supresora de la calcificación o actividad reguladora del metabolismo de la vitamina D. La sonda utilizada en el presente documento tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia completa o a una secuencia (secuencia parcial) de 17 nucleótidos continuos o más de la secuencia representada por ID. SEC. N° 1, 3, 5, 7 ó 9.

En el presente documento, la expresión “condiciones rigurosas” satisface las condiciones de concentración de sodio de 750 mM o más, de preferencia 900 mM o más, y una temperatura de 40°C o más, de preferencia 42°C. Específicamente, las condiciones rigurosas utilizadas en el presente documento indican las condiciones constituidas por 6 x SSC, 5 x Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% y 42°C. Además, 6 x SSC significa NaCl 900 mM y citrato de sodio 90 mM. La solución de Denhardt (Denhardt) contiene BSA (albúmina de suero de ternera), polivinilpirrolidona y Ficoll 400. 50 x Denhardt está constituido por una composición de BSA al 1%, polivinilpirrolidona al 1% y Ficoll 400 al 1% (5 x Denhardt significa una concentración de un décimo de 50 x Denhardt).

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos del ADN dado a conocer en el presente documento, el ADN puede obtenerse por medio de síntesis química o PCR usando los cebadores sintetizados a partir de la secuencia de nucleótidos determinada.

## 2. Vector recombinante que contiene el ADN y preparación de transformante

### (1) Preparación del vector recombinante

Puede obtenerse un vector recombinante uniendo (insertando) el ADN dado a conocer en el presente documento en un vector adecuado. No está específicamente limitado un vector para insertar el ADN, a condición de que pueda replicarse en un huésped. Los ejemplos de tal vector incluyen ADN de plásmido y ADN de fago.

Los ejemplos de ADN de plásmido incluyen los plásmidos procedentes de *Escherichia coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC118 y pUC119), plásmidos procedentes de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110 y pTP5), plásmidos procedentes de levadura (por ejemplo, YEp13, YEp24 y YCp50). Un ejemplo de un ADN de fago es el fago lambda. Además, pueden utilizarse vectores de virus de animales tales como retrovirus, adenovirus o virus vacunal, o vectores de virus de insectos tales como baculovirus. Además, puede usarse un plásmido de fusión al que estén ligados GST, His-tag y similares.

Para insertar el ADN en un vector, puede utilizarse un procedimiento que comprende escindir el ADN purificado usando una enzima de restricción adecuada en primer lugar y unir el ADN escindido obtenido al vector insertando el ADN escindido en un sitio de enzima de restricción o en un sitio de clonación múltiple de un ADN del vector adecuado.

Es necesario que el ADN dado a conocer en el presente documento sea incorporado en un vector para que el ADN ejerza su función. Al vector, además de un promotor y del ADN dado a conocer en el presente documento, pueden unirse, de ser necesario, un elemento cis tal como un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poli A, un marcador de selección y la secuencia de unión de ribosomas (secuencia SD). Además, los ejemplos de marcador de selección incluyen un gen de la dihidrofolato reductasa, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de la neomicina-resistencia.

### (2) Preparación del transformante

El transformante dado a conocer en el presente documento puede obtenerse introduciendo el vector recombinante en un huésped, de manera tal que el gen diana pueda expresarse. No está específicamente limitado un huésped a utilizar en el presente documento, a condición de que pueda expresar el ADN descrito anteriormente. Los ejemplos de tales huéspedes incluyen: bacterias del género *Escherichia*, tal como *Escherichia coli*; del género *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*; del género *Pseudomona*, tal como *Pseudomona putida*; o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Además, pueden usarse también células animales, tales como las células COS, las células CHO o las células HEK293 y células de insecto, tales como Sf9 o Sf21.

Cuando se usan bacterias, tales como *Escherichia coli* como huésped, es preferible que el vector recombinante pueda replicarse de manera autónoma en las bacterias y que comprenda un promotor, la secuencia de unión de ribosomas, el ADN y la secuencia de terminación de la transcripción. Además, también puede estar contenido un gen que regule un promotor. Los ejemplos de *Escherichia coli* incluyen JM 109 y HB 101, y un ejemplo de *Bacillus subtilis* es *Bacillus subtilis*. Puede utilizarse cualquier promotor, a condición de que pueda expresarse en un huésped, tal como *Escherichia coli*. Por ejemplo, pueden usarse los promotores procedentes de *Escherichia coli*, tal como un promotor trp, el promotor lac, el promotor PL o el promotor T7 procedente de fago o similares. Puede utilizarse un promotor diseñado y modificado artificialmente, tal como un promotor tac. No está específicamente limitado un procedimiento a utilizar en el presente documento para introducir un vector recombinante en bacterias, a condición de que sea un procedimiento para introducir el ADN en bacterias. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen un procedimiento que usa ión calcio y un procedimiento de la electroporación.

Cuando se utiliza levadura como huésped, se utilizan, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*. Un promotor a utilizar en este caso no está específicamente limitado, a condición de que

pueda expresarse en la levadura. Los ejemplos de tales promotores incluyen un promotor gall, el promotor gal10, el promotor de la proteína del choque térmico, el promotor MF $\alpha$  1, el promotor PHO5, el promotor PGK, el promotor GAP, el promotor ADH y el promotor AOX1. No está específicamente limitado un procedimiento para introducir un vector recombinante en la levadura, a condición de que sea un procedimiento para introducir el ADN en la levadura.

5 Los ejemplos de tales procedimientos incluyen un procedimiento de electroporación, el procedimiento de esferoplastos y el procedimiento de acetato de litio.

10 Cuando se utiliza una célula animal como huésped, se utilizan las células COS-7 de mono, las células Vero, células de ovario del hámster chino (células CHO), células L de ratón, células GH3 de rata, células FL humanas, HEK293, HeLa, Jurkat o similares. Como promotor, puede usarse también el promotor SR $\alpha$ , el promotor SV 40, el promotor LTR, el promotor de  $\beta$ -actina o similares. Además, puede utilizarse también un promotor genético temprano del citomegalovirus humano o similares. Los ejemplos de un procedimiento para introducir un vector recombinante en células animales incluyen un procedimiento de electroporación, el procedimiento de fosfato de calcio y el procedimiento de lipofección.

15 Cuando se utiliza una célula de insecto como huésped, se utilizan las células Sf9, las células Sf21 o similares. Como procedimiento para introducir un vector recombinante en una célula de insecto, se usa un procedimiento de fosfato de calcio, el procedimiento de lipofección, el procedimiento de electroporación o similares.

### 20 3. Polipéptido que tiene actividad inductora de hipofosfatemia

Se han realizado varios intentos para aislar y para identificar un factor procedente de tumores que tenga actividad inductora de hipofosfatemia en la osteomalacia inducida por tumores. Por consiguiente, se ha mostrado que el polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene características de ser un factor de secreción nuevo que es producido por tumores de la osteomalacia inducida por tumores. Las actividades biológicas predichas del factor inductor de hipofosfatemia se han informado de la siguiente manera.

Efecto en la promoción de la excreción de fosfato en la orina:

30 **Aschinberg**, L.C. y col., *Journal of Pediatrics* 91: 56-60, 1977, **Lau**, K. y col., *Clinical Research* 27: 421A, 1979, **Miyauchi**, A. y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 46-53, 1988.

Supresión de la actividad de transporte de fosfato de las células epiteliales de los túbulos renales:

35 **Cai**, Q. y col., *N. Engl. J. Med.* 330: 1645-1649, 1994, **Wilkins**, G.E. y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1628-1634, 1995, **Rowe**, P.S.N. y col., *Bone* 18: 159-169, 1996.

Supresión de la actividad de la 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa:

40 **Miyauchi**, A. y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 46-53, 1988.

En particular, se ha propuesto la existencia de una molécula desconocida que tiene directamente actividad para suprimir la reabsorción de fosfato en el riñón y se ha denominado "Fosfatona" (Econs, M.J. Y Drezner, M.K., *N. Eng. J. Med* 330: 1679-1681, 1994). También se ha sugerido que una molécula desconocida que tiene tal actividad biológica está presente también en el XLH. Los hallazgos clínicos para los pacientes con XLH se caracterizan por la hipofosfatemia con excreción urinaria aumentada de fosfato, que es igual que en los pacientes con osteomalacia inducida por tumores, y el XLH desarrolla osteomalacia o raquitismo debido a la insuficiencia en la calcificación en los tejidos óseos. Se ha mostrado que un gen responsable del XLH es un gen que codifica una proteína análoga a la endopeptidasa, denominada PHEX. Recientemente, se ha mostrado que los ratones Hyp, los ratones mutantes naturales, que se sabe que expresan una característica fenotípica similar a la de XLH, tienen una delección parcial en el gen que codifica PHEX, sugiriendo de este modo que es válido determinar los ratones Hyp como modelo de XLH en ratón (Strom, T.M. y col. *Human Molecular Genetics* 6: 165-171, 1997). El hecho de que el factor inductor de hipofosfatemia en los ratones Hyp es un factor humoral ha sido mostrado por un experimento de parabiosis usando ratones Hyp y ratones normales (Meyer, R.A. y col., *J. Bone Miner. Res.* 4: 493-500, 1989). En este experimento, disminuyeron los niveles de fosfato de la sangre de ratones normales y aumentó la excreción urinaria de fosfato. Por consiguiente, se ha considerado que el factor humoral inductor de hipofosfatemia que existía en los ratones Hyp actuaba en los ratones normales. Hasta ahora no ha quedado clara la relación entre PHEX, que se espera que tenga una actividad de escisión peptídica, y este factor inductor de hipofosfatemia desconocido. Sin embargo, se han propuesto algunas hipótesis con respecto a una relación de que PHEX pueda regular una actividad de un factor inductor de hipofosfatemia desconocido y una posibilidad de que un factor inductor de hipofosfatemia encontrado en la osteomalacia inducida por tumores pueda ser idéntico al encontrado en XLH (Drezner, M.K. *Kidney Int* 57: 9-18, 2000). Según esta hipótesis, PHEX y un factor inductor de hipofosfatemia son ambos expresados normalmente en la misma célula, y PHEX tiene efecto supresor sobre el factor inductor de hipofosfatemia. Las funciones de PHEX disminuyen o desaparecen en el paciente con XLH, de modo que la actividad del factor inductor de hipofosfatemia se expresa fuertemente. Se supone que en la osteomalacia inducida por tumores, tanto PHEX como el factor inductor de hipofosfatemia están elevados, y finalmente el factor inductor de hipofosfatemia activo excede cuantitativamente el nivel normal. Se supone también que este factor inductor de hipofosfatemia actúa de manera supresora en la actividad de transporte de fosfato de NPT2, que es uno de los transportadores de fosfato en el riñón. Se han llevado a cabo numerosos intentos para buscar tal factor inductor

de hipofosfatemia desconocido, pero ninguno fue capaz de identificar la molécula. Según un estudio realizado por Cai y col., se ha asumido que el peso molecular de un factor inductor de hipofosfatemia está entre 8 kDa y 25 kDa (Cai, Q. y col., N. Eng. J. Med. 330: 1645-1649, 1994), mientras que Rowe y col. han propuesto proteínas de 56 kDa y 58 kDa como moléculas candidato. Recientemente, Rowe y col. han presentado una solicitud de patente (WO99/60017) para un polipéptido constituido por 430 residuos de aminoácidos como factor regulador del metabolismo del fosfato procedente de tumores para la osteomalacia inducida por tumores. Sin embargo, el polipéptido dado a conocer en esta solicitud era una secuencia parcial de una proteína que estaba originalmente presente y no se dio a conocer ninguna actividad biológica referida a la actividad inductora de hipofosfatemia. Recientemente se ha informado un polipéptido correspondiente a la molécula integral según se dio a conocer por el nombre de MEPE en esta patente, pero tampoco se dio a conocer ninguna actividad de inducción de hipofosfatemia (Rowe, P.S.N. y col., Genomics 67: 54-68, 2000). Además, no se ha reconocido ninguna similitud de secuencias ni estructural entre esta molécula y dicho polipéptido.

Como se describió anteriormente, se deduce la presencia de un factor fisiológicamente activo que tiene una actividad inductora de hipofosfatemia, pero hasta ahora no se ha mostrado la entidad del mismo. Los solicitantes hemos aclarado la entidad del polipéptido y una secuencia genética que codifica el polipéptido. Además, como se describe a continuación, han producido el polipéptido usado en el presente documento, han mostrado que el producto tiene efecto como factor regulador para el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio y el metabolismo de la vitamina D o la calcificación y la osteogénesis, y el producto es útil como composición farmacéutica. Además, los solicitantes han mostrado que el anticuerpo de la presente invención es útil no sólo para la terapia, sino también para el examen clínico y el diagnóstico. Por otra parte, los solicitantes han mostrado que el ADN que codifica el polipéptido dado a conocer en el presente documento es útil para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y para el diagnóstico polimórfico del metabolismo del fosfato, del metabolismo del calcio y del metabolismo del hueso.

El polipéptido que tiene actividad inductora de hipofosfatemia puede producirse introduciendo, por ejemplo, una secuencia que contiene los nucleótidos N° 133 hasta 885 de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 en una célula huésped adecuada de una forma capaz ser expresada para preparar una célula transformante, y a continuación permitiendo que se exprese el ADN introducido en la célula transformante. Además, la cadena polipeptídica que se produce de esta manera puede ser modificada por un mecanismo de modificación proteica del huésped, tal como la escisión o la adición de cadenas de azúcares.

El polipéptido dado a conocer en el presente documento puede obtenerse cultivando los transformantes anteriores, y recogiendo a continuación del producto del cultivo. La expresión "producto del cultivo" significa, además del sobrenadante del cultivo, cualquier célula cultivada o microorganismo cultivado, o células lisadas o microorganismos lisados.

El transformante dado a conocer en el presente documento puede cultivarse por cualquier procedimiento habitual para cultivar un huésped.

Pueden usarse tanto medios naturales como sintéticos para cultivar el transformante que se obtiene usando un microorganismo, tal como *Escherichia coli* o levaduras como huésped, a condición de que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y similares que puedan ser asimilados por los microorganismos y permitan el cultivo eficaz de los transformantes. Los ejemplos de una fuente de carbono incluyen los hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa o almidón, ácidos orgánicos tales como ácido acético o ácido propiónico y alcoholes tales como etanol o propanol. Los ejemplos de una fuente de nitrógeno incluyen el amoníaco, las sales de amonio de ácidos orgánicos o inorgánicos tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio o fosfato de amonio, u otros compuestos que contienen nitrógeno, y peptona, extracto de carne y licor de maíz. Los ejemplos de minerales incluyen el fosfato primario de potasio, fosfato secundario de potasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato de calcio.

El cultivo se lleva a cabo normalmente en condiciones aerobias, tales como el cultivo con agitación o el cultivo con aireación y agitación, a 37°C durante 4 a 48 horas. Durante un período del cultivo, el pH se mantiene dentro del intervalo de 6,0 a 8,0. El pH se ajusta utilizando ácidos inorgánicos u orgánicos, disolución alcalina o similares. Mientras se realiza el cultivo, de ser necesario, pueden añadirse antibióticos al medio, tales como ampicilina o tetraciclina.

Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector de expresión que usa un promotor inducible, puede añadirse un inductor a un medio, de ser necesario. Por ejemplo, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector de expresión que tiene el promotor T7 que puede inducirse con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), puede añadirse al medio IPTG o similar. Además, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector de expresión que usa el promotor trp que puede inducirse con ácido indolacético (IAA), puede añadirse al medio IAA o similar.

Los ejemplos de un medio para cultivar un transformante que se obtiene usando una célula animal como huésped incluyen un medio generalmente utilizado RPMI1640, medio DMEM o un medio suplementado con suero de ternera fetal o similares. El cultivo se lleva a cabo normalmente bajo CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 1 a 10 días. Mientras se realiza el cultivo, de ser necesario, pueden añadirse antibióticos al medio, tales como kanamicina o penicilina. Después del cultivo, cuando el polipéptido de la presente invención se produce dentro de microorganismos o células, el polipéptido diana se recoge por tratamiento con ultrasonido, por medio de ciclos repetitivos de congelación descongelación, tratamiento de homogeneizando o similares para lisar los microorganismos o las células. Además, cuando el polipéptido

dado a conocer en el presente documento se produce fuera de las bacterias o células, la disolución del cultivo se utiliza intacta, o se realiza una centrifugación o similar para separar y eliminar las bacterias o las células. Posteriormente, el polipéptido puede aislarse y purificarse del producto del cultivo anterior por medio de un uso singular o combinado de los procedimientos bioquímicos generales para el aislamiento y la purificación de proteínas, tales como la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía en gel, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de afinidad.

Como se describió anteriormente sobre el XLH, la PHEX, que se cree que es una endopeptidasa, tiene un significado importante en la regulación del factor inductor de hipofosfatemia. Por consiguiente, es posible que el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 2 pueda tener variadas actividades como resultado de otra modificación y escisión. En este contexto, usando células CHO ras-clon 1 como huésped, se preparó una línea celular clonada que produjo un polipéptido recombinante con seis His continuos en el extremo C terminal de la cadena polipeptídica. Esta línea celular quedó depositada en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Organismo Internacional de Depósito de Patentes (Chuo 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) (número de referencia FERM BP-7273, fecha original del depósito: 11 de agosto de 2000).

Cuando se examinó el polipéptido dado a conocer en el presente documento producido por la línea celular y secretado en la disolución del cultivo, se detectaron productos genéticos que tenían diferentes tamaños por medio de transferencia Western usando un anticuerpo que reconocía la secuencia His-tag, como se muestra en la Figura 2. Las proteínas correspondientes a las bandas respectivas se aislaron y se llevó a cabo la determinación de las secuencias de aminoácidos de los extremos N terminales. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de los extremos N terminales eran idénticas a la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal representado por ID. SEC. N° 4 y de la secuencia representada por ID. SEC. N° 8, respectivamente. Se considera que la proteína que tiene la primera secuencia corresponde a una proteína de la que se ha eliminado la secuencia señal, y la proteína que tiene la última secuencia corresponde a una proteína escindida con una enzima, tal como una endopeptidasa.

Ahora, se conoce la furina como una de las enzimas proteolíticas que reconocen RXXR. En realidad, cuando se expresó el polipéptido dado a conocer en el presente documento en una línea celular deficiente en furina, no se detectó ningún fragmento. Además, cuando se expresó conjuntamente una proteína  $\alpha$ 1-PDX recombinante que tenía actividad de inhibición de la furina con el polipéptido, los productos escindidos en el sobrenadante disminuyeron significativamente.

Por consiguiente, también se da a conocer un procedimiento para producir el polipéptido dado a conocer en el presente documento que comprende la etapa de usar células deficientes en furina tras el cultivo, o permitir la coexistencia con una sustancia que suprime la actividad de la furina.

Cai y col. han sugerido que la actividad supresora del transporte de fosfato en el sobrenadante del cultivo obtenido cultivando células procedentes de tumores de osteomalacia inducida por tumores se mostraba dentro del intervalo de peso molecular de 8 kDa a 25 kDa cuando se medía por medio de un procedimiento de fraccionamiento con membranas de diálisis. Es también razonable que la actividad pueda variar al convertir el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 4 usado en la presente invención en los polipéptidos resultantes de la escisión entre el residuo N° 179, Arg, y el residuo N° 180, Ser, de ID. SEC. N° 2.

El polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene una actividad supresora del transporte de fosfato en las células epiteliales de los túbulos proximales renales, que es una forma del efecto de actividad inductora de hipofosfatemia, como se muestra en la Tabla 2 (Ejemplo 7). La mayor parte del fosfato inorgánico libre que está presente en la sangre es filtrado en los glomérulos de los riñones, en los que aproximadamente del 80 al 90% del fosfato inorgánico es reabsorbido en el túbulo proximal renal.

Esta reabsorción se realiza por transporte de fosfato por el transportador de fosfato dependiente de Na tipo II que está presente en el lado del lumen del túbulo proximal. El polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene una actividad supresora del transporte de fosfato. Esto significa que el polipéptido promueve la excreción urinaria del fosfato *in vivo*. Por consiguiente, puede considerarse que el polipéptido induce hipofosfatemia al ejercer su actividad para suprimir la reabsorción del fosfato en el riñón, en particular, el transporte de fosfato en las células renales de los túbulos proximales, de modo que se espera que el polipéptido de la presente invención sea la misma sustancia que la Fosfatonina mencionada anteriormente.

Recientemente se ha identificado el transportador de fosfato dependiente de Na en el tracto intestinal. El transportador se denomina tipo IIb, porque tiene alta homología con el transportador de fosfato dependiente de Na tipo II que está presente en el riñón. Resulta razonable que el polipéptido dado a conocer en el presente documento también pueda ser responsable de la supresión del transportador de fosfato dependiente de Na tipo IIb que está presente en el lado del lumen del tracto intestinal, de manera similar para el transportador de fosfato dependiente de Na tipo II en el riñón. Esta puede considerarse como una forma del efecto de la actividad inductora de hipofosfatemia.

La actividad *in vivo* del polipéptido dado a conocer en el presente documento se evaluó por medio de un experimento en el que se transplantaron las células recombinantes anteriores que expresaban el polipéptido por vía subcutánea a ratones atímicos.

Las células trasplantadas en este experimento se cultivaron en el espacio subcutáneo de los ratones atímicos y, posteriormente, se dejó que formaran tumores. El polipéptido dado a conocer en el presente documento producido y secretado por la célula con la formación tumoral se caracteriza porque es liberado en el líquido corporal de los ratones, de modo que en este modelo animal puede reproducirse la liberación del factor humoral procedente de tumores en la osteomalacia inducida por tumores. En este experimento del modelo, como se muestra en la Tabla 4 (Ejemplo 11), los ratones trasplantados con las células que expresaban el polipéptido dado a conocer en el presente documento desarrollaron hipofosfatemia evidente, comparados con los ratones de control individuales en los que se permitió la generación de tumores por el trasplante con células CHO en las que no se había introducido el ADN dado a conocer en el presente documento, o con los ratones individuales que no habían generado tumores. Por consiguiente, se mostró que el polipéptido tiene actividad inductora de hipofosfatemia. Además, se mostró también que la tasa de reabsorción de fosfato también disminuyó y que se había suprimido la reabsorción de fosfato en los riñones. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que el polipéptido era el factor inductor de hipofosfatemia en la osteomalacia inducida por tumores.

Por otra parte, en el anterior experimento del modelo, se encontró hipocalcemia en los ratones trasplantados con las células recombinantes que producían el polipéptido dado a conocer en el presente documento. Por consiguiente, también se mostró que el polipéptido es también un factor inductor de hipocalcemia. En el experimento descrito en el Ejemplo 16, en el que se transplantaron células CHO que expresaban el polipéptido de la presente invención en ratones atímicos, se mostró que los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D disminuyeron continuamente. Como se describe en los Ejemplos 19 y 20, se mostró que cuando se administró tres veces un polipéptido con mutaciones introducidas o un polipéptido de longitud total de tipo natural a los ratones normales, los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D disminuyeron en ambos casos. Además, como se describe en el Ejemplo 24, tras una única administración del polipéptido, se observaron niveles séricos disminuidos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D durante varias horas. Por consiguiente, es razonable que esta actividad que causa tal disminución del nivel de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D sea un efecto biológico o fisiológico principal del polipéptido dado a conocer en el presente documento.

Como se describió anteriormente, los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D están regidos por la  $1\alpha$ -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa. Como se describe en el Ejemplo 16, se ha mostrado que el efecto del polipéptido para disminuir los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D está acompañado por fluctuaciones en la expresión de estas enzimas metabólicas. Además, como se describe en el Ejemplo 24, después de 1 hora de la administración del polipéptido, se observó disminución de los productos de transcripción del gen de la  $1\alpha$ -hidroxilasa, que es responsable de la producción de metabolitos activos de la vitamina D, y aumento de los productos de transcripción del gen de la 24-hidroxilasa, que cataboliza los metabolitos activos de la vitamina D. Los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D disminuyeron gradualmente después de estas fluctuaciones en la expresión, sugiriendo que el efecto del polipéptido dado a conocer en el presente documento para disminuir los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D se debe al menos a la expresión suprimida del gen de la  $1\alpha$ -hidroxilasa y a la expresión aumentada del gen de la 24-hidroxilasa.

En cambio, en un experimento de trasplante a largo plazo (de 44 a 46 días después del trasplante) en el que se transplantaron células CHO que expresaban el polipéptido dado a conocer en el presente documento en ratones atímicos como se describe en el Ejemplo 11, la expresión del gen de la  $1\alpha$ -hidroxilasa aumentó. Se demostró que los niveles de PTH en el suero de ratón en este punto temporal estaban significativamente aumentados comparados con un grupo de control. Por consiguiente, puede suponerse que la expresión aumentada del gen de la  $1\alpha$ -hidroxilasa fue causada por un efecto de PTH en nivel elevado. Sin embargo, es interesante destacar que incluso en presencia de un nivel alto de PTH, la expresión del gen de la 24-hidroxilasa se mantuvo elevada, puede entenderse que el nivel elevado de PTH no interfirió con la regulación por medio del polipéptido dado a conocer en el presente documento de la expresión del gen de la 24-hidroxilasa. Como se describe en el Ejemplo 11, los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en el suero no aumentaron aunque los ratones expresaron hallazgos clínicos graves análogos al raquitismo o hipofosfatemia. Esto sugiere el efecto de continuo aumento de la expresión del gen de la 24-hidroxilasa por el polipéptido dado a conocer en el presente documento.

A. Nykjaer y col. han revelado que la 25-hidroxitamina D es reabsorbida en el túbulo proximal renal (Cell, volumen 96, páginas 507-515, 1999). Aunque la presente memoria descriptiva no lo describe, en un experimento en el que se habían transplantado células CHO que expresaban el polipéptido dado a conocer en el presente documento en ratones atímicos, no se encontraron cambios significativos en el nivel de 25-hidroxitamina D del suero. Además, no se reconoció que la acción del polipéptido afectara la excreción fraccionada (calculada con nivel urinario/nivel sérico/TFG) de los principales electrolitos, tales como el sodio, el potasio o el cloruro, los principales aminoácidos o la glucosa, respaldando el hecho de que la función de reabsorción del túbulo renal no estaba deteriorada (T. Shimada y col., Proc. Natl. Acad. Sci, en prensa). Por consiguiente, se asumió que el polipéptido dado a conocer en el presente documento no disminuye los niveles de 25-dihidroxitamina D del suero al inhibir la reabsorción de la 25-hidroxitamina D en el túbulo renal, sino al actuar específicamente en la vía sintética de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D.

Se sabe que el nivel sérico de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D está significativamente disminuido en la osteomalacia inducida por tumores. Además, en el raquitismo hipofosfémico resistente a la vitamina D (XLH) o Hyp, el modelo de ratones que expresa las alteraciones clínicas del XLH, los niveles séricos de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D están dentro del intervalo normal o dentro de un intervalo algo inferior al límite más bajo del intervalo normal, independientemente de los niveles gravemente disminuidos de fosfato del suero. Se sabe también que la expresión del gen

de la 24-hidroxilasa está aumentada en los ratones Hyp. En estas afecciones clínicas que desarrollan hipofosfatemia, normalmente, a medida que disminuye el nivel de fosfato del suero, aumenta la expresión genética de la  $1\alpha$ -hidroxilasa, aumentando de ese modo los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D del suero. Por consiguiente, se cree que un fallo en cualquiera de los sistemas reguladores que desactive tal respuesta fisiológica normal es al menos una de las causas de las afecciones clínicas. Estos fenómenos son análogos a las respuestas fisiológicas observadas en los ratones descritos en el Ejemplo 11, 19 ó 20, sugiriendo fuertemente que el polipéptido de la presente invención tiene efecto en la disminución de los niveles séricos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en las afecciones clínicas mencionadas anteriormente.

Queda claro por las radiografías que se muestran en la Figura 5 que el grado de calcificación en los tejidos óseos de los ratones trasplantados con las células recombinantes que expresaban el polipéptido dado a conocer en el presente documento estaba significativamente disminuido comparado con el del grupo de control. También se observó deformación del tórax o similar, sugiriendo que el polipéptido tenía un efecto en la formación del esqueleto.

Es decir, resulta razonable que el polipéptido dado a conocer en el presente documento tenga un efecto de supresión de la calcificación de tejidos óseos, o efecto de promoción del reclutamiento de calcio y de fosfato de los tejidos óseos. Resulta también razonable que las disminuciones significativas en los niveles de fosfato y de calcio de la sangre causen la supresión secundaria de la calcificación del tejido óseo.

En los ratones Hyp, se cree que las células procedentes del hueso producen un factor que suprime la actividad del transporte de fosfato en el túbulo proximal renal (Lajeunesse, D. y col., *Kidney Int.* 50: 1531-1538, 1996). Además, se ha informado que los osteoblastos de los ratones Hyp liberan factores supresores de la calcificación (Xiao, Z. S., *Am. J. Physiol.*, E700-E708, 1998). Como se describió anteriormente, en el XLH y en la osteomalacia inducida por tumores, los hallazgos clínicos tales como hipofosfatemia y la calcificación insuficiente en los tejidos óseos se asemejan mucho el uno al otro, y es probable que estos hallazgos clínicos estén inducidos por un único factor humoral. Tomados juntos, estos hechos sugieren la posibilidad de que la actividad supresora del transporte de fosfato renal y la actividad supresora de la calcificación del hueso informadas en estos estudios de los ratones Hyp puedan estar causadas por el mismo factor. Además, también se ha informado que los osteoblastos de los ratones Hyp exhiben osteogénesis anormal incluso en el estado en el que los niveles de calcio y de fosfato se encuentran en el intervalo normal (Ecarot, B. y col., *J. Bone Miner. Res.* 7: 215-220, 1992). El polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene actividades que son similares a las de un supuesto factor de los ratones Hyp anteriores. Por consiguiente, resulta razonable que el polipéptido dado a conocer en el presente documento tenga, además de la actividad inductora de hipofosfatemia, un efecto de regulación directa de la calcificación de los tejidos óseos no mediada por las anomalías en el metabolismo del calcio o del fosfato.

En el proceso de completar la presente invención, además de un gen que codifica el polipéptido dado a conocer en el presente documento, también se obtuvo la proteína 1 de la matriz de dentina (DMP-1) como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 3. Este gen se expresa de manera abundante en la dentina de los dientes, y se cree que una proteína codificada por este gen tiene un papel importante, como proteína de la matriz extracelular de la dentina, en la formación de la matriz calcificada de la dentina. De manera similar, se obtuvo un gen que codificaba una proteína de fosforilación extracelular de la matriz (MEPE) como OST190. Se desconocen las funciones detalladas de la molécula. También de manera similar, se obtuvo un gen que codificaba la osteopontina. MEPE, DMP-1 y la osteopontina tienen características comunes en que son proteínas de fosforilación que tienen la secuencia del motivo RGD, son ricas en serina y treonina que pueden fosforilarse, tienen alto contenido de ácido glutámico y ácido aspártico que son aminoácidos ácidos, y muestran características de proteínas ácidas intensas. Una región ácida característica, la secuencia denominada ASARM, se conserva entre MEPE y DMP-1 (Rowe, P.S.N. y col, *Genomics* 67: 54-68, 2000), sugiriendo similitud en su significación fisiológica o funcional. Se cree que la interacción con el calcio y/o el fosfato inorgánicos tras el comienzo de la calcificación es una de las funciones de tal proteína característica. Se ha informado la expresión del gen de la osteopontina en una diversidad de células, tales como en los macrófagos, además de los osteoblastos y osteoclastos. Por otra parte, se ha informado recientemente la expresión de DMP-1 en tejidos óseos, en particular en osteocitos. Se conoce la expresión genética de MEPE en el tejido mieloide o en células del osteosarcoma tales como SaOS-2. El hecho que se haya encontrado una proteína de matriz tan ácida en el tejido calcificado junto con el polipéptido dado a conocer en el presente documento en el curso de la presente invención representa un aspecto de un tipo de efecto de dicho polipéptido. Específicamente, hay posibilidades de que dicho polipéptido induzca la expresión de moléculas específicas de tejido calcificado que están representadas por las moléculas anteriores, de modo que el polipéptido regule la calcificación, el metabolismo del calcio y el metabolismo del fosfato de una manera cooperativa, o que la molécula inducida regule de manera secundaria la calcificación, el metabolismo del calcio y el metabolismo del fosfato. Resulta también razonable que el polipéptido dado a conocer en el presente documento pueda regular el metabolismo del hueso actuando directamente sobre los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Por consiguiente, el polipéptido dado a conocer en el presente documento puede ser eficaz en la terapia para las enfermedades metabólicas del hueso representadas, por ejemplo, por la osteoporosis.

Recientemente, se ha mostrado que aparecen células con fenotipo análogo a osteoblastos en sitios de calcificación ectópica, sugiriendo que la calcificación puede tener lugar por el mecanismo similar al del proceso de calcificación en tejido óseo. Por consiguiente, es también razonable que el polipéptido dado a conocer en el presente documento sea eficaz en la terapia de la calcificación ectópica al suprimir la aparición o la función de tales células a cargo de la calcificación.

El polipéptido anterior puede modificarse. Por ejemplo, el polietilenglicol, dextrano, poli (N-vinil-pirrolidona), homopolímero de polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxiethylado, alcohol polivinílico y similares se seleccionan adecuadamente para el uso. Como procedimiento de modificación, puede utilizarse cualquier técnica conocida. Por ejemplo, una de tales técnicas se da a conocer en la Publicación de Patente JP (traducción del PCT) N° 10-510980.

#### 4. Anticuerpo contra el polipéptido dado a conocer en el presente documento

Un anticuerpo de la presente invención reacciona específicamente con el polipéptido constituido por ID. SEC. N° 4. En la presente invención, el término "anticuerpo" significa la molécula completa del anticuerpo o el fragmento del mismo (por ejemplo, fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>) que es capaz de unirse al polipéptido o a sus fragmentos antigénicos, y puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal.

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse según un procedimiento convencional. Por ejemplo, el anticuerpo puede prepararse por cualquier procedimiento *in vivo*, que implica la inmunización de animales una vez o varias veces (inmunización estimulada) en un intervalo de varias semanas usando un antígeno junto con un adyuvante, o un procedimiento *in vitro*, que implica el aislamiento de inmunocitos y la sensibilización de los inmunocitos usando un sistema de cultivo adecuado. Los ejemplos de inmunocitos capaces de producir el anticuerpo de la presente invención incluyen las células del bazo, células de las amígdalas y células linfoides.

Un polipéptido para ser utilizado como un antígeno no tiene que ser el polipéptido anterior completo. Puede usarse una parte del polipéptido como antígeno. Para usar un péptido corto como antígeno, en particular, un péptido que tiene una longitud tan corta como aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, tal péptido se une por medio de modificación química o similar a una proteína vehículo con alta antigenicidad, tal como la hemocianina de lapa o la albúmina de suero de ternera, o se une de manera covalente a un péptido que tiene la estructura central ramificada, tal como un péptido multiantigénico (MAP) con núcleo de lisina, en lugar de una proteína vehículo (Posnett y col., J. Biol. Chem. 263, 1719-1725, 1988; Lu y col., Mol. Immunol. 28, 623-630, 1991; Briand y col., J. Immunol. Methods 156, 255-265, 1992).

Como adyuvante, por ejemplo, se utiliza el adyuvante completo o incompleto Freund, gel de hidróxido de aluminio o similares. Como los animales a los que administrar un antígeno, se utilizan, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas, cabras, pollos, ganado vacuno, caballos, cobayas y hámsteres.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse recogiendo sangre de estos animales inmunizados, separando el suero y purificando las inmunoglobulinas mediante el uso de uno o una combinación apropiada de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de proteínas A o G. Cuando el animal anterior es un pollo, los anticuerpos pueden purificarse a partir de los huevos.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por purificación del sobrenadante del cultivo del hibridomas preparado permitiendo que los inmunocitos, que se han sensibilizado *in vitro* o de los anteriores animales, se fusionen con células progenitoras que pueden cultivarse, o a partir de ascitis obtenida por inoculación intraperitoneal de los hibridomas en los animales. Como células progenitoras, pueden usarse líneas celulares establecidas que están generalmente disponibles de un animal, tal como un ratón. Una línea celular de preferencia para utilizar en el presente documento tiene selectividad por fármacos, y tiene una característica tal que no puede sobrevivir en medio de selección HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) cuando está en estado sin fusionar, pero puede sobrevivir solamente en su estado fusionado con las células productoras de anticuerpos. Los ejemplos de tales líneas celulares incluyen las células X63, NS-1, P3U1, X63.653, SP2/0, Y3, SKO-007, GM1500, UC729-6, HM2.0 y NP4-1.

Las técnicas específicas para preparar anticuerpos monoclonales son las siguientes.

El polipéptido o el fragmento del mismo, preparado como se describió anteriormente, se administran como antígeno al animal anterior. La dosificación de antígeno por animal es de 1 a 100 µg cuando se utiliza un adyuvante. La inmunización se realiza principalmente por inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Además, el intervalo de inmunización no está específicamente limitado. En un intervalo de varios días a varias semanas, de preferencia de 1 a 3 semanas, la inmunización se realiza de 1 a 10 veces, de preferencia de 2 a 5 veces. De 1 a 10 días más tarde, de preferencia de 1 a 4 después de la fecha de la inmunización final, se recogen las células productoras de anticuerpos.

Para obtener hibridomas, se realiza la fusión celular de las células productoras de anticuerpos y las células progenitoras (células de mieloma). La fusión celular se realiza en un medio sin suero para el cultivo de células animales, tal como el medio DMEM o RPMI-1640, mezclando 5 x 10<sup>6</sup> a 1 x 10<sup>8</sup> células por ml de células productoras de anticuerpos con 1 x 10<sup>6</sup> a 2 x 10<sup>7</sup> células por ml de células de mieloma (una relación de preferencia de células productoras de anticuerpos a células de mieloma es 5:1), y realizando la reacción de fusión en presencia de un agente promotor de la fusión celular. Como agente promotor de la fusión celular, puede usarse el polietilenglicol o similares que tengan un peso molecular medio de 1000 a 6000 Dalton. Además, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma pueden también fusionarse con un dispositivo de fusión celular comercial usando estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación).

Después del tratamiento para conseguir la fusión celular, los hibridomas de interés se seleccionan de las células. La suspensión de células se diluye de manera apropiada en, por ejemplo, medio RPMI-1640 que contiene suero fetal de ternera, inoculado en una placa de microvaloración a una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/pocillo. El medio de selección se añade a cada pocillo, y a continuación se realiza el cultivo intercambiando de manera adecuada el medio de selección. Como resultado, pueden obtenerse como hibridomas células que han proliferado aproximadamente 14 días tras el comienzo del cultivo en el medio de selección. El sobrenadante del cultivo de hibridomas que han proliferado se criba para verificar la presencia de anticuerpos que reaccionan con el polipéptido dado a conocer en el presente documento. El cribado de hibridomas puede realizarse según un procedimiento habitual, y el procedimiento de cribado no está específicamente limitado. Por ejemplo, se recoge una parte del sobrenadante del cultivo contenido en los pocillos en los que crecen los hibridomas y a continuación se realiza el cribado por enzimoimmunoensayo, radioimmunoensayo o similar.

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse cultivando células productoras de anticuerpos inmortalizadas que se obtienen permitiendo que un virus adecuado, tal como el virus EB, infecte inmunocitos sensibilizados *in vitro* o el animal inmunizado anterior.

Aparte de estas técnicas de ingeniería celular, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse también por técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, tales genes de anticuerpos pueden también amplificarse y obtenerse por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de inmunocitos sensibilizados *in vitro* o del animal anterior. El gen se introduce en un microorganismo, tal como *Escherichia coli*, para permitir que produzca anticuerpos, o se utiliza para permitir que un fago exprese el anticuerpo como proteína de fusión en la superficie.

La determinación cuantitativa de la cantidad del polipéptido dado a conocer en el presente documento *in vivo* usando el anticuerpo de la presente invención hace posible dilucidar la relación entre el polipéptido y los estados clínicos de diversas enfermedades. Por otra parte, el anticuerpo puede aplicarse al diagnóstico o a la terapia y puede utilizarse para realizar la purificación por afinidad eficaz del polipéptido.

Se asume que hay algunas enfermedades cuyas causas residen en una disminución de los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D inducidos por la acción excesiva del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, aunque el raquitismo hipofosfatémico resistente a la vitamina D (XLH) desarrolla hipofosfatemia grave, no se encuentra aumento en los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 del suero. Se cree que la razón es la anormalidad en grupos de genes de enzimas que metabolizan la vitamina D. En esta enfermedad, puede estar implicada la acción excesiva del polipéptido dado a conocer en el presente documento. En Hyp, que es un modelo de XLH en ratón, se ha informado la expresión aumentada del gen de la 24-hidroxilasa. Esto concuerda con el efecto del polipéptido de inducir la expresión aumentada del gen de la 24-hidroxilasa. Por consiguiente, se espera que esta enfermedad pueda tratarse administrando el anticuerpo contra el polipéptido para normalizar metabolismo de la vitamina D y posteriormente para corregir los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 del suero. Un ejemplo de una enfermedad que presenta hallazgos clínicos similares a los del XLH es el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR). Después de clonar el polipéptido dado a conocer en el presente documento, los solicitantes han deducido que un gen que codifica el polipéptido es un gen responsable del ADHR, basándose en su localización en el cromosoma. Recientemente, se ha analizado un gen responsable del ADHR y se ha informado que la enfermedad está causada por una mutación sin sentido en el gen que codifica el polipéptido. Los solicitantes han aclarado además que esta mutación confiere resistencia frente a la escisión enzimática y han mostrado que el efecto excesivo de esta molécula es una causa de la enfermedad. Es razonable suponer que el anticuerpo contra el polipéptido dado a conocer en el presente documento sea eficaz en el tratamiento de esta enfermedad a través de su efecto supresor. El ADHR desarrolla osteomalacia, metabolismo mineral desordenado y metabolismo de la vitamina D desordenado. Por consiguiente, entre las enfermedades metabólicas de los huesos que están estrechamente relacionadas con tal ruta metabólica, puede haber enfermedades en las que el polipéptido tenga efecto como causa de la enfermedad. Puede esperarse que el anticuerpo contra el polipéptido sea eficaz para tal enfermedad. Como un efecto de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D, se conoce la supresión de la diferenciación en adipocitos. Se sabe que los adipocitos aumentan en la médula ósea con la edad. En este caso, puede haber aumento de la diferenciación en adipocitos de las células precursoras comunes de osteoblastos, adipocitos y células del estroma que mantienen la hematopoyesis que estén presentes en la médula ósea. Es razonable suponer que en este proceso, el polipéptido dado a conocer en el presente documento pueda actuar excesivamente en la disminución local de los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D. Por consiguiente, puede esperarse que el uso del anticuerpo contra el polipéptido permita aumentar los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D en la sangre o locales, suprima la diferenciación en adipocitos y mejore la capacidad disminuida de formación de hueso o de hematopoyesis. Además, también se espera que el anticuerpo sea eficaz contra la obesidad. Es razonable suponer que haya otras de tales enfermedades en las que esté implicado el polipéptido dado a conocer en el presente documento. Tales enfermedades pueden seleccionarse por un procedimiento inmunológico de determinación cuantitativa como por ejemplo el ELISA combinado con el uso del anticuerpo contra el polipéptido. Por consiguiente, puede establecerse el intervalo normal fisiológico del polipéptido, y pueden aclararse los grupos de enfermedades fuera del intervalo. Puede esperarse que el anticuerpo contra el polipéptido se utilice para fines terapéuticos contra las enfermedades que muestren niveles anormalmente altos en sangre del polipéptido dado a conocer en el presente documento según la medición por medio del procedimiento anterior.

## 5. Composición farmacéutica

### (1) Composición farmacéutica que comprende el polipéptido

El polipéptido dado a conocer en el presente documento puede utilizarse como composición farmacéutica para las enfermedades con niveles desfavorablemente elevados de fosfato en la sangre. En la insuficiencia renal crónica, los niveles disminuidos de excreción de fosfato del riñón dan como resultado elevados niveles de fosfato en la sangre. La hiperfosfatemia agrava además las funciones renales y promueve la secreción de hormona paratiroidea de las glándulas paratiroides, induciendo de ese modo el hiperparatiroidismo secundario. Esta enfermedad provoca picor de la piel, así como la absorción disminuida del Ca desde el tracto intestinal por la síntesis desordenada de  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 en el riñón. Además, el estado de sobresecreción de hormona paratiroidea por la retención del fosfato de la sangre promueve la movilización del Ca de los tejidos óseos. Cuando este estado continúa, se produce osteítis fibrosa o hiperplasia de las glándulas paratiroides, que es una de las afecciones clínicas de la osteodistrofia renal. Un procedimiento de preferencia para evitar este estado es mejorar la hiperfosfatemia mencionada anteriormente, pero el tratamiento médico actual no puede controlar la hiperfosfatemia de manera suficientemente. En la insuficiencia renal crónica en una etapa en la que se mantiene la función urinaria, el polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene una actividad en la corrección de los niveles de fosfato de la sangre al suprimir el transportador de fosfato dependiente de Na tipo II que está presente en las células epiteliales de los túbulos proximales renales promoviendo la excreción de fosfato en la orina (actividad supresora del transporte de fosfato). Además, el polipéptido puede corregir los niveles de fosfato de la sangre actuando en el tracto intestinal de un modo similar al de los riñones suprimiendo el transportador de fosfato dependiente de Na tipo IIb y reduciendo de ese modo la absorción de fosfato en el cuerpo.

El polipéptido puede utilizarse también como composición farmacéutica para las enfermedades resultantes de metabolismo anormal del calcio y del metabolismo anormal del fosfato. La expresión “metabolismo anormal del calcio” indica un estado en el que los niveles de calcio del suero se desvían de intervalo clínico normal definido, o un estado en el que los niveles de calcio del suero están dentro del intervalo normal, pero las funciones del riñón, tracto intestinal, tejido óseo y glándulas paratiroides están anormalmente aumentadas o disminuidas para mantener los niveles de calcio del suero, o un estado en el que las hormonas que regulan el calcio del suero, tales como la hormona paratiroidea, la  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 o la calcitonina exhiben valores anormales. Además, la expresión “metabolismo anormal del fosfato” indica un estado en el que los niveles de fosfato del suero se desvían del intervalo clínico normal definido, o un estado en el que los niveles de fosfato del suero están dentro del intervalo normal, pero las funciones de equilibrio del fosfato están anormalmente aumentadas o disminuidas en el riñón, el tracto intestinal y el tejido óseo.

La osteodistrofia renal junto con el anterior hiperparatiroidismo secundario toma diversas formas clínicas, tales como la enfermedad ósea adinámica, la osteítis fibrosa o el tipo mixto de las mismas. Contra el hiperparatiroidismo secundario, por lo general se utiliza  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3,  $1\alpha$ -hidroxivitamina D3 o similares para suprimir la hormona paratiroidea. Cuando el valor de la hormona paratiroidea no se suprime de manera suficiente, puede realizarse una terapia de pulsos (a continuación, en el presente documento, puede denominarse también “terapia de pulsos de vitamina D”) que implica administrar dosis altas de  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 o  $1\alpha$ -hidroxivitamina D3. El nivel normal de hormona paratiroidea del suero es de 65 pg/ml o menos. Cuando los niveles de la hormona paratiroidea están en los niveles normales en este estado de enfermedad, se produce la enfermedad ósea adinámica, que es una forma de osteodistrofia renal. Por otra parte, cuando los niveles de la hormona paratiroidea aumentan, se produce la osteítis fibrosa, que es contraria a la afección clínica anterior. Como directriz médica reciente para tales enfermedades, se ha propuesto mantener los niveles de la hormona paratiroidea en aproximadamente 130 a 260 pg/ml. Sin embargo, las causas fundamentales del metabolismo anormal siguen siendo desconocidas. Se sabe que la hormona paratiroidea se ve inducida por los elevados niveles de fosfato de la sangre, y se ve suprimida por los elevados niveles de calcio del suero. Puesto que el polipéptido de la presente invención disminuye los niveles de fosfato de la sangre y los niveles de calcio de la sangre, puede deducirse que el polipéptido puede modificar las funciones de la hormona paratiroidea. Además, se ha informado que en pacientes con osteomalacia inducida por tumores, la  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 cae por debajo del límite de detección. Por consiguiente, también puede deducirse que el polipéptido de la presente invención puede estar implicado en la regulación de la actividad de la  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3. Es razonable suponer que en la osteodistrofia renal con la anterior regulación anormal o actividad deteriorada de la hormona paratiroidea, el polipéptido dado a conocer en el presente documento pueda utilizarse en la fabricación de una composición farmacéutica clínicamente útil para la enfermedad ósea adinámica o la osteítis fibrosa. Por consiguiente, resulta razonable que la administración del polipéptido proporcione una terapia útil para la osteítis fibrosa o para la enfermedad ósea adinámica, que son contrarias una a la otra, en la osteodistrofia renal.

Además, el polipéptido dado a conocer en el presente documento puede utilizarse como composición farmacéutica para la calcificación ectópica. La calcificación de tejidos diferentes de los tejidos óseos causa daños en las funciones biológicas. En particular, la disfunción debida a la calcificación del corazón o de los vasos sanguíneos es potencialmente mortal. Un factor de riesgo de esta calcificación ectópica es un aumento en los niveles de productos de los iones de calcio y de los iones de fosfato de la sangre (a continuación, en el presente documento, también puede denominarse “el producto de calcio y fosfato”). En la anterior terapia para el hiperparatiroidismo secundario, cuando se lleva a cabo la terapia de pulsos de vitamina D contra la afección clínica de la hiperfosfatemia, el producto de calcio y fosfato puede aumentar causando la calcificación ectópica. La calcificación del sistema cardiovascular en los pacientes de hemodiálisis es un problema serio. El polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene una actividad en la

disminución significativa de los niveles de calcio y los niveles de fosfato del suero como se muestra en la Tabla 4, por lo que puede esperarse que sea eficaz contra la calcificación ectópica junto otras diversas enfermedades.

Además, el polipéptido anterior según se define en ID. SEC. N° 4 puede utilizarse en la fabricación de una composición farmacéutica contra enfermedades metabólicas de los huesos. El polipéptido tiene una fuerte actividad reguladora para el metabolismo del calcio, el metabolismo del fosfato, el metabolismo de la calcificación o de la vitamina D. Los ejemplos de hormonas implicadas en el metabolismo del calcio y el metabolismo del fosfato incluyen la calcitonina, la hormona paratiroidea y la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. La calcitonina tiene una actividad en la disminución del calcio del suero, y la hormona paratiroidea y la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tienen una actividad en el aumento del calcio del suero. Se ha informado que la hormona paratiroidea tiene un efecto en la excreción de fosfato a la orina, y también se ha informado que la calcitonina tiene actividad similar. La  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tiene una actividad en la promoción de la absorción del fosfato del tracto intestinal. Como se describió anteriormente, cada hormona tiene una actividad diferente para mantener el equilibrio entre los niveles de calcio y de fosfato de la sangre, pero la calcitonina y la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 se utilizan como agentes terapéuticos para la osteoporosis. Además, la hormona paratiroidea está siendo desarrollada como fármaco terapéutico para la osteoporosis.

El metabolismo óseo se caracteriza porque el catabolismo y anabolismo de los tejidos óseos, es decir, la resorción ósea y la formación de hueso, están acoplados. La administración continua con la hormona paratiroidea provoca la disminución de la masa ósea. Sin embargo, cuando se deja que actúe de manera intermitente, se sabe que la hormona paratiroidea promueve la formación de hueso. Puesto que el polipéptido tiene un efecto en la regulación del metabolismo del calcio y del metabolismo del fosfato, puede esperarse que el polipéptido sea eficaz contra las enfermedades metabólicas de los huesos, que incluyen la osteoporosis, cuando se selecciona un procedimiento adecuado para usar el polipéptido.

Además, el polipéptido dado a conocer en el presente documento puede utilizarse como composición farmacéutica para las enfermedades o afecciones clínicas con niveles desfavorablemente elevados de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D en el suero, o para afecciones clínicas con respuestas fisiológicas desfavorables inducidas por la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D.

Se sabe que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D actúa en las glándulas paratiroides suprimiendo la secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Por consiguiente, una terapia, que se ha establecido clínicamente para el hiperparatiroidismo secundario en la insuficiencia renal crónica, en particular para los casos con altos niveles de PTH en el suero, implica la administración intermitente de una alta concentración de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D. Una desventaja de esta terapia es que induce fácilmente la calcificación ectópica. En los pacientes con insuficiencia renal crónica con altos niveles de fosfato en el suero, con frecuencia se observa calcificación desfavorable en ejidos diferentes de los tejidos óseos por la administración de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D. Puesto que el polipéptido utilizado según las reivindicaciones tiene un efecto en la promoción de una rápida disminución de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D en el suero durante varias horas después de la administración del polipéptido, el polipéptido es útil en la terapia y en la prevención de la calcificación ectópica causada por los niveles excesivos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D.

Por otra parte, la administración intermitente de altas concentraciones de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D provoca supresión excesiva de la secreción de PTH, de modo que puede inducir la enfermedad ósea adinámica que desarrolla afecciones clínicas tales como el bloqueo del metabolismo óseo. Para tal caso, puede esperarse que la administración del polipéptido dado a conocer en el presente documento provoque la disminución de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D en suero, promueva la secreción adecuada de PTH en las glándulas paratiroides y proporcione la recuperación de la enfermedad ósea adinámica.

Para la calcificación de vasos sanguíneos, se ha informado la implicación de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D como factor promotor de la calcificación. El polipéptido dado a conocer en el presente documento puede utilizarse de manera terapéutica o profiláctica contra afecciones clínicas asociadas con la calcificación de vasos sanguíneos, tales como la arteriosclerosis debida al envejecimiento, la angiopatía diabética, o la calcificación del sistema cardiovascular en pacientes sometidos a diálisis.

Se sabe que la absorción de calcio del tracto intestinal es promovida por la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D del suero. El polipéptido dado a conocer en el presente documento puede utilizarse según las reivindicaciones para corregir la hipercalcemia disminuyendo los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D del suero. Los ejemplos de una causa de hipercalcemia incluyen la sobreproducción de PTH debida al hiperparatiroidismo primario, una alta concentración de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D junto con granuloma crónico, tal como la sarcoidosis o la tuberculosis, o la resorción ósea acelerada por PTHrP producida por tumores malignos. En la hipercalcemia causada principalmente no sólo por excesiva  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D, sino también por excesiva PTH o PTHrP, puede esperarse que la administración del polipéptido dado a conocer en el presente documento provoque la disminución del nivel de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D en el suero, para mejorar la hipercalcemia. En particular, los macrófagos activados en el granuloma crónico, tal como en la sarcoidosis o en la tuberculosis, tienen actividad  $1\alpha$ -hidroxilasa y producen excesivamente  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. Se espera que el polipéptido dado a conocer en el presente documento disminuya directamente esta actividad  $1\alpha$ -hidroxilasa.

Se sabe que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D promueve la diferenciación de osteoclastos, y se espera que la administración del polipéptido dado a conocer en el presente documento suprima la resorción ósea. Se sabe que, *in vitro*, la

1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D es un potente factor inductor de la diferenciación de osteoclastos. La excesiva resorción ósea por los osteoclastos provoca osteopenia, representada por la osteoporosis. En tales enfermedades, para las que se observa promoción de la resorción ósea, se espera que el polipéptido restablezca recambio óseo a la condición normal disminuyendo de manera transitoria los niveles de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D del suero. Además de suprimir la diferenciación de osteoblastos *in vitro*, se ha sugerido también que la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D es un factor de supresión de la formación de hueso *in vivo* en un experimento de trasplante de hueso usando ratones deficientes en el receptor de la vitamina D. De tales puntos de vista, puede esperarse que el polipéptido dado a conocer en el presente documento, que es capaz de disminuir la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D, sea eficaz contra las enfermedades metabólicas del hueso con masa ósea disminuida. Además, ha habido un informe que confirmaba que la administración de 24,25-dihidroxivitamina D, que es uno de los metabolitos de la vitamina D3, provoca el aumento de la masa ósea. La 24,25-dihidroxivitamina D es un producto de la hidroxilación de 25-hidroxivitamina D por la 24-hidroxilasa. Puesto que el polipéptido dado a conocer en el presente documento tiene un efecto potenciador significativo de la expresión del gen de la 24-hidroxilasa, puede esperarse que la administración de este péptido provoque el aumento de los niveles de 24,25-dihidroxivitamina D de la sangre, y que aumente la masa ósea en afecciones clínicas en enfermedades óseas, tales como la osteoporosis o la displasia esquelética.

Se sabe que la PTH tiene un potente efecto de promoción de la resorción ósea. Sin embargo, el recambio óseo puede estimularse por la administración intermitente de PTH, y finalmente, puede quedar expresado un efecto de aumento de la masa ósea. Las actividades fisiológicas o biológicas del polipéptido dado a conocer en el presente documento que se han mostrado hasta ahora incluyen: un efecto de regulación de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D; efectos de regulación de los niveles de calcio del suero y de fosfato del suero; y un efecto de regulación de la calcificación. Por consiguiente, es razonable que pueda regularse el recambio óseo permitiendo que el polipéptido actúe con eficacia en los tejidos óseos. Por consiguiente, puede esperarse que el polipéptido sea eficaz contra la osteoporosis postmenopáusica con aumento del recambio óseo y la osteoporosis senil con disminución del recambio óseo. Puede haber otras enfermedades en las que esté implicado el polipéptido dado a conocer en el presente documento. Tales enfermedades pueden seleccionarse por un ensayo inmunoquímico representado por el ELISA combinado con el uso de uno o más anticuerpos contra el polipéptido.

Por consiguiente, puede establecerse el intervalo fisiológico normal del polipéptido dado a conocer en el presente documento, y pueden aclararse los grupos de enfermedades con niveles del polipéptido que se desvían del intervalo. Puede esperarse que el polipéptido se utilice de manera terapéutica para las enfermedades que muestren niveles anormalmente bajos del polipéptido en sangre según las mediciones realizadas por el procedimiento anterior.

#### (2) Composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la presente invención

El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse como composición farmacéutica para el raquitismo resistente a la vitamina D y la osteomalacia inducida por tumores. El anticuerpo neutralizante de este polipéptido puede obtenerse como un anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal por el procedimiento mencionado anteriormente para preparar anticuerpos. Como procedimiento para el uso más adecuado del anticuerpo como medicamento, puede prepararse un anticuerpo de tipo humano o un anticuerpo humanizado. La hipofosfatemia y la osteomalacia en la osteomalacia inducida por tumores pueden tratarse o mejorarse suprimiendo la excesiva actividad del polipéptido representado por ID. SEC. N° 4. Puede esperarse que la administración del anticuerpo neutralizante contra el polipéptido anterior mejore los síntomas de la osteomalacia inducida por tumores. Además, puesto que se cree que el factor inductor de hipofosfatemia y el factor supresor de la calcificación en el XLH son equivalentes al polipéptido anterior, el anticuerpo neutralizante puede ser también un agente terapéutico contra el raquitismo resistente a la vitamina D que incluye el XLH.

El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse como una composición farmacéutica para las enfermedades con metabolismo anormal del calcio o del fosfato, o enfermedades metabólicas óseas asociadas con la presencia del polipéptido representado por ID. SEC. N° 4 en una cantidad excesiva. Como se describió anteriormente, en pacientes con insuficiencia renal crónica o en hemodiálisis, las anomalías se producen en el mecanismo para mantener la homeostasis del metabolismo del calcio o del metabolismo del fosfato, y estas anomalías pueden deberse a la sobreproducción o a la acumulación de los polipéptidos anteriores. Se ha mostrado que el polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 regula el metabolismo del hueso. Por consiguiente, es razonable que puedan también existir enfermedades metabólicas óseas que estén causadas por la presencia de cantidades excesivas del polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4. En este caso, puede esperarse que las afecciones clínicas puedan tratarse o mejorarse por medio del anticuerpo contra dicho polipéptido.

Los ejemplos de las enfermedades para las que puede aplicarse el anticuerpo de la presente invención incluyen al menos un tipo de enfermedad ósea, tales como la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget y la osteomalacia inducida por tumores. En el presente documento, la enfermedad ósea puede ser una única enfermedad, una de sus complicaciones, o la enfermedad ósea complicada con cualquier enfermedad diferente de las enfermedades mencionadas anteriormente.

(3) *Protocolo de administración*

Una composición farmacéutica que contiene el polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 o el anticuerpo neutralizante del mismo, como ingrediente activo, puede contener vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales vehículos y aditivos incluyen agua, disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, alginato de sodio, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, goma de xantano, goma arábica, caseína, gelatina, agar, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano, manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivo que son aditivos farmacéuticamente aceptables. Los aditivos a utilizar en el presente documento se seleccionan adecuadamente de los ítems anteriores solos o combinación dependiendo de la forma de dosificación utilizada de la presente invención.

Cuando el polipéptido o el anticuerpo de la presente invención se utilizan como un agente profiláctico o terapéutico para las enfermedades óseas, el sujeto para el que se usa el polipéptido o el anticuerpo no está específicamente limitado.

El polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 puede utilizarse como composición farmacéutica que es capaz de regular el metabolismo del calcio, el metabolismo del fosfato, el metabolismo de la calcificación o de la vitamina D en los organismos.

El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse específicamente para tratar o para prevenir al menos un tipo de enfermedad ósea, tal como la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget, la osteomalacia inducida por tumores, como se describió anteriormente. La enfermedad ósea, para la que puede utilizarse el polipéptido o el anticuerpo de la presente invención, puede ser una única enfermedad, una de sus complicaciones o la enfermedad ósea complicada con cualquier enfermedad diferente de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Un agente profiláctico o un agente terapéutico que contenga el polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 o el anticuerpo de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral en el caso del polipéptido, y por vía parenteral en el caso del anticuerpo.

Cuando el polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 se administra por vía oral, la forma farmacéutica a aplicar del mismo puede ser una preparación sólida, tal como un comprimido, gránulo, polvo o píldora, o una preparación líquida, tal como un fármaco líquido o un jarabe, o similares. En particular, un gránulo y un polvo pueden formularse en una forma de monodosis, es decir, una cápsula. En el caso de una preparación líquida, puede formularse en un producto seco que se vuelve a disolver para el uso.

De estas formas farmacéuticas, una preparación sólida para administración oral contiene normalmente en su composición aditivos, que son por lo general de uso farmacéutico, tales como un aglutinante, un excipiente, un lubricante, un agente disgregante o un agente humectante. Además, una preparación líquida para administración oral contiene normalmente en su composición aditivos, que son por lo general de uso farmacéutico, tales como un estabilizador, un tampón, corrector, un conservante, un agente aromatizante o un colorante.

Cuando el polipéptido o el anticuerpo de la presente invención se administran por vía parenteral, pueden formularse en una inyección, supositorio o similares.

En el caso de una inyección, se proporciona normalmente en una ampolla monodosis o en un envase para múltiples dosis, o puede estar en forma de polvo que se vuelve a disolver, cuando se utiliza, en un vehículo adecuado, tal como agua esterilizada sin sustancias pirogénicas. Estas formas farmacéuticas contienen normalmente en sus composiciones aditivos, que son por lo general de uso farmacéutico, tales como un emulsivo o suspensión. Los ejemplos de procedimientos de inyección incluyen el goteo por infusión intravenosa, la inyección intravenosa, la inyección intramuscular, la inyección intraperitoneal, la inyección subcutánea o la inyección intradérmica. Además, las dosis difieren según la edad del sujeto, la vía de administración y la frecuencia de dosificación, y pueden variarse ampliamente.

En este caso, la dosis eficaz a administrar es una combinación de la dosis eficaz del péptido o del anticuerpo de la presente invención con un diluyente adecuado, y un vehículo de uso farmacológico, en el caso del polipéptido, es de 0,01 a 100  $\mu\text{g}$ , de preferencia de 0,5 a 20  $\mu\text{g}$ /administración/kg de peso corporal. Además, en el caso del anticuerpo, la dosis eficaz es de 0,1  $\mu\text{g}$  a 2 mg, de preferencia de 1 a 500  $\mu\text{g}$ /administración/kg de peso corporal.

6. *Agente de diagnóstico de la enfermedad*(1) *El anticuerpo o el polipéptido dado a conocer en el presente documento*

El anticuerpo de la presente invención se utiliza para la detección o la determinación cuantitativa del polipéptido dado a conocer en el presente documento o de los metabolitos que están presentes en sangre u orina, de modo que puede aclararse la relación entre el polipéptido dado a conocer en el presente documento y las afecciones clínicas, y el anticuerpo puede aplicarse como agente de diagnóstico para las enfermedades asociadas.

La expresión “enfermedad asociada” significa una enfermedad ósea o una enfermedad que desarrolla al menos una anomalía entre: metabolismo anormal del calcio, metabolismo anormal del fosfato, calcificación anormal y metabolismo anormal de la vitamina D. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget, la insuficiencia renal, la pérdida renal de fosfato, la acidosis tubular renal y el síndrome de Fanconi.

Se han generalizado los procedimientos para determinar de manera cuantitativa moléculas unidas usando anticuerpos, tales como el radioinmunoensayo o el enzoinmunoensayo. Los niveles del polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 en la sangre o la orina medidos por estos procedimientos pueden ser indicadores para un nuevo criterio clínico. Por ejemplo, cuando un paciente con raquitismo muestra niveles altos en sangre del polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 comparado con un sujeto normal, puede sospecharse fuertemente el XLH o el ADHR. Además, basándose en cambios en los niveles en sangre del polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4, puede realizarse el pronóstico de un progreso a hiperparatiroidismo secundario en un paciente con insuficiencia renal crónica.

Para la osteomalacia inducida por tumores resulta, por lo general, con frecuencia difícil encontrar un tumor. Sin embargo, el uso del anticuerpo de la presente invención permite establecer medidas de diagnóstico útiles. Por ejemplo, cuando un paciente sin antecedentes familiares de raquitismo o de osteomalacia muestra niveles en sangre significativamente más altos del polipéptido según se define en ID. SEC. N° 4 comparado con un individuo normal, puede sospecharse osteomalacia inducida por tumores.

## (2) ADN

La detección de ADN anormal de un paciente con metabolismo anormal del fosfato o metabolismo anormal del calcio, o de un paciente con una enfermedad metabólica ósea hace posible diagnosticar y prevenir la enfermedad.

Una búsqueda de la secuencia de nucleótidos del ADN en las bases de datos de secuencias de nucleótidos de Genbank revela que la secuencia de nucleótidos (bajo la forma de tres fragmentos) coincide de con una secuencia de 12p13 BAC RPC111-388F6 humano (Número de referencia AC008012). Esta fragmentación indica que la secuencia de nucleótidos del ADN dado a conocer en el presente documento se proporciona como un producto de empalme de una secuencia del cromosoma. Por consiguiente, queda claro que el ADN que codifica el polipéptido dado a conocer en el presente documento contiene al menos una secuencia que se extiende desde el nucleótido 498° hasta el 12966° de una secuencia representada por ID. SEC. N° 11 o sus fragmentos parciales. La sustitución, inserción o delección de nucleótidos dentro del intervalo provoca aumento, disminución o desaparición de las actividades biológicas y fisiológicas del polipéptido dado a conocer en el presente documento. El polipéptido tiene un potente efecto en el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio, el metabolismo óseo y el metabolismo de la vitamina D. Por consiguiente, cuando se muestra polimorfismo o mutación genética por la sustitución, inserción, delección y similares de nucleótidos parciales de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 11 o zonas parciales de la misma (por ejemplo, una secuencia desde el nucleótido 498° hasta el 12966°), se hace posible el diagnóstico y la prevención de una enfermedad que contenga metabolismo anormal del calcio y metabolismo anormal del fosfato, o una enfermedad que desarrolle metabolismo óseo anormal, o una enfermedad que desarrolle metabolismo anormal de la vitamina D.

Ahora, se ha informado que el gen responsable del ADHR está presente en el locus 12p13 como resultado del análisis de ligamiento de familias que tienen ADHR (Econs, M.J. y col., J. Clin. Invest. 100: 2653-2657, 1997). En este informe, se ha mostrado también que el gen responsable está presente dentro de un intervalo de 18 cM entre los marcadores de microsátélites D12S100 y D12S397. Los solicitantes han confirmado la localización en la que está presente el ADN dado a conocer en el presente documento en el cromosoma comparando con la localización informada. La región en la que está presente el ADN que codifica el polipéptido dado a conocer en el presente documento era idéntica a la región en la que está presente el gen responsable del ADHR. Basándose en las actividades biológicas del polipéptido dado a conocer en el presente documento y en la localización del gen en el cromosoma, es razonable suponer que el polipéptido dado a conocer en el presente documento esté codificado por el gen responsable del ADHR. Esto puede confirmarse separando los componentes celulares de la sangre de pacientes con ADHR, aislando los ADN cromosómicos de los componentes celulares y, a continuación, encontrando mutaciones en la secuencia de nucleótidos dentro de la región representada por ID. SEC. N° 11. Por consiguiente, el gen que tiene la anterior región de la secuencia de nucleótidos se utiliza como agente de diagnóstico para el raquitismo hipofosfático autosómico dominante, el raquitismo hipofosfático ligado al cromosoma X, la enfermedad hipofosfática de los huesos, la osteoporosis y similares.

Entre el exón 1 y el exón 2 de la región del ADN que codifica el polipéptido dado a conocer en el presente documento que han especificado los solicitantes, está presente la secuencia STS, que se ha registrado en Genbank del NCBI bajo de número de referencia G19259. Se cree que este marcador es muy importante en el estudio de la relación entre el ADN y los caracteres hereditarios.

La presente invención traerá un gran cambio en la comprensión del metabolismo convencional del calcio, el metabolismo del fosfato, el metabolismo óseo y el metabolismo de la vitamina D. Por consiguiente, se da a conocer un progreso retrasado hacia el estadio de hemodiálisis en la insuficiencia renal crónica, o un procedimiento terapéutico y un procedimiento de diagnóstico nuevos para las enfermedades asociadas al metabolismo del fosfato y al metabolismo

del calcio y para enfermedades metabólicas del hueso. Además, la presente invención es también útil para mejorar o respaldar los procedimientos terapéuticos existentes.

## Breve descripción de dibujos

La figura 1 incluye fotografías que muestran los productos de amplificación analizados usando electroforesis en agarosa. Para estudiar la especificidad tumoral de OST311, se llevó a cabo la PCR usando, como moldes, la primera hebra de ADNc extraído de tejidos tumorales y la primera hebra de ADNc extraído de tejidos óseos de control, y usando cebadores específicos de OST311 representados por ID SEQ N° 22 y 23, y cebadores específicos de G3PDH representados por ID SEQ N° 26 y 27.

La figura 2 es una fotografía que muestra que se detectó OST311 recombinante realizando la transferencia Western para las fracciones de elución que se habían preparado sometiendo OST311 recombinante a purificación por afinidad usando resina de níquel, y a continuación aislando y purificado por medio del uso de resina de intercambio catiónico fuerte SP-SPW.

La figura 3A muestra los resultados de los sitios predichos del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2, que son adecuados para la preparación de un anticuerpo del péptido, usando una función de cálculo del programa MacVector versión 6.5.1.

La figura 3B muestra los resultados de la predicción del grado de hidrofobicidad del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 usando la función de cálculo del programa MacVector versión 6.5.1.

La figura 4 muestra cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal promedio durante 31 días después del trasplante de células CHO-OST311H entre un grupo sin carga tumoral (una línea en el gráfico indicada con prom.-) y un grupo con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST311H (una línea en el gráfico indicada con prom.+).

La figura 5 incluye imágenes de rayos X que muestran la radiografía suave del esqueleto completo de un individuo de control con carga tumoral trasplantado con células CHO ras clon-1, un individuo con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST190H y un individuo con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST311H.

La figura 6 muestra los resultados de la alineación de la secuencia de aminoácidos entre el polipéptido OST311 humano y el polipéptido OST311 de ratón.

La figura 7 muestra los resultados de las mediciones de los niveles de fosfato del suero, los niveles de calcio del suero y las actividades de la fosfatasa alcalina del suero de un grupo sin carga tumoral (n=6), un grupo con carga tumoral trasplantado con células CHO ras clon-1 (n=10), un grupo con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST190H (n=10) y un grupo 1 con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST311H (n=6), y grupo 2 con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST311H (n=6). La sangre se extrajo del corazón de cada individuo en los días 44 a 46.

La figura 8 incluye fotografías que muestran la comparación de los niveles de expresión del cotransportador de sodio y fosfato (NaPi-7) según la medición realizada por el procedimiento de transferencia Western. Específicamente, se prepararon membranas de ribete en cepillo de células epiteliales de túbulos proximales de los riñones extirpados de los individuos con carga tumoral de CHO-OST311H, y de los individuos sin carga tumoral, y a continuación se compararon los niveles de expresión de NaPi-7 por el procedimiento de transferencia Western.

La figura 9A incluye fotografías que muestran cambios en los niveles de ARNm, detectados por medio de transferencia Northern, de los cotransportadores renales de sodio y fosfato (NaPi-7, NPT-1). Los riñones se recogieron de los ratones sacrificados en los días 44 a 46 después del trasplante del tumor.

La figura 9B incluye fotografías que muestran cambios en los niveles de ARNm, detectados por medio de transferencia Northern, de un cotransportador de sodio y fosfato (NaPi-IIb) en los intestinos delgados de los ratones. Los intestinos delgados se recogieron de los ratones sacrificados en los días 44 a 46 después del trasplante del tumor.

La figura 9C incluye fotografías que muestran cambios en los niveles de ARNm, detectados por medio de transferencia Northern, de enzimas que metabolizan la vitamina D (1 $\alpha$ OHasa, 24OHasa) en los riñones de los ratones. Los riñones se recogieron de los ratones sacrificados en los días 44 a 46 después del trasplante del tumor.

La figura 10 muestra imágenes de radiografías que muestran los fémures recogidos de los ratones sacrificados en los días 44 a 46 después del trasplante del tumor.

La figura 11A incluye gráficos que muestran comparaciones de los niveles de fosfato del suero y los niveles de calcio del suero, en el día 2 después del trasplante, entre PBS, ratones atímicos (6 semanas de edad, BALB/c, machos) trasplantados con células CHO ras clon-1, y trasplantados con células CHO-OST311H.

Cada valor se muestra en términos de media +/- desviación estándar.

## ES 2 344 679 T3

La figura 11B incluye gráficos que muestran comparaciones de los niveles de fosfato del suero y los niveles de calcio del suero, en el día 6 después del transplante, entre PBS, ratones atímicos (6 semanas de edad, BALB/c, machos) transplantados con células CHO ras clon-1, y trasplantados con células CHO-OST311H.

5 Cada valor se muestra en términos de media +/- desviación estándar.

La figura 12 incluye fotografías que muestran los resultados obtenidos purificando el sobrenadante del cultivo de células CHO-OST311H y sometiendo las fracciones de elución a transferencia Western usando anticuerpo anti-His6 y anticuerpo anti péptido OST311 (311-114). El panel izquierdo muestra la detección de 311: 26-251, el panel central 10 311: 25-179 y el panel derecho 311: 180-251. Las fracciones mostradas con “\*” (colocado en el parte superior de las fotografías del gel) se utilizaron para un examen de dosis única realizado en ratones normales.

La figura 13 incluye fotografías que muestran cortes submineralizados teñidos con Villanueva-Goldner. Las secciones submineralizadas eran de la metafisis proximal de la tibia extraída de ratones trasplantados con células CHO-OST311H y de ratones sin carga tumoral. 15

La figura 14 incluye fotografías que muestran los resultados de la realización de transferencia Northern para los productos de genes de enzimas que metabolizan la vitamina D en los riñones extirpados de ratones trasplantados con células CHO-OST311H y de ratones de control. 20

La figura 15A muestra el programa del tiempo del experimento 1 en el que se administraron células CHO productoras de la proteína OST311H recombinante de longitud total a ratones normales. La figura 15B incluye gráficos que muestran los niveles de fosfato del suero en cada punto temporal de extracción de sangre y la Fig. 15C incluye gráficos que muestran los niveles de calcio del suero en los mismos momentos. 25

La figura 16A muestra el programa del tiempo del experimento 2 en el que se administraron células CHO productoras de la proteína OST311H recombinante de longitud total a ratones normales. La figura 16B incluye gráficos que muestran los niveles de fosfato del suero en cada punto temporal de extracción sangre y la Fig. 16C incluye gráficos que muestran los niveles de calcio del suero en los mismos momentos. 30

La figura 17 es una fotografía que muestra la proteína recombinante detectada en un sobrenadante del cultivo cuando se sometió a transferencia Western el sobrenadante del cultivo de células CHO-OST311RQH productoras de OST311RQH recombinante mutante y de células rápidas OST311RQH/pEAK. 35

La figura 18A muestra el programa del tiempo de un experimento en el que se administró OST311RQH recombinante mutante a ratones normales. La figura 18B incluye gráficos que muestran los niveles de fosfato del suero en cada punto temporal de extracción de sangre y la Fig. 18C incluye gráficos que muestran los niveles de calcio del suero en los mismos momentos. 40

La figura 19A muestra los niveles de fosfato del suero en el día 2 después del transplante en un experimento de transplante de células CHO-OST311RQH. La figura 19B muestra los niveles de calcio del suero en el mismo experimento. 45

La figura 20 incluye fotografías que muestran la OST311H recombinante en el sobrenadante del cultivo sin suero de las células CHO-OST311H detectada por transferencia Western usando antisuero de conejo anti péptido parcial de OST311. 50

La figura 21A es una tabla que muestra los niveles detectados de OST311 recombinante en cada combinación de 6 tipos de anticuerpos policlonales anti péptido OST311, cuando se construyó el ELISA sándwich usando estos anticuerpos policlonales. 55

La figura 21B es un gráfico de las relaciones entre las concentraciones de OST311H recombinante purificado y los valores de medición correspondientes a las mismas que se obtuvieron utilizando el sistema ELISA combinado con el uso del anticuerpo 311-48 o el anticuerpo 311-180 como anticuerpo inmovilizado, y el anticuerpo 311-148 como anticuerpo para la detección. 60

La figura 22A muestra la expresión de NaPi-7 renal analizada por transferencia Western a la hora, 3 y 8 horas después de la administración de la proteína OST311 recombinante o del vehículo a los ratones. La figura 22B muestra la expresión de NaPi-7 analizada por transferencia Northern usando ARN total de riñón siguiendo un tratamiento similar. 65

La figura 23 muestra los cambios en los niveles de 1,25-dihidroxitamina D3 del suero a la hora, 3 y 8 horas después de la administración de la proteína OST311 recombinante o de un vehículo a los ratones.

La figura 24 muestra la expresión del gen de la 25-hidroxitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa (1 $\alpha$ OHasa) o de la 25-hidroxitamina D-24-hidroxilasa (24OHasa) analizada por transferencia Northern usando ARN total de riñón a la hora, 3 y 8 horas después de la administración de la proteína OST311 recombinante o de un vehículo a los ratones.

La figura 25 muestra los niveles medios de fosfato del suero en cada grupo, cuando se considera como 100% el nivel medio de fosfato del suero sanguíneo en el día 3 después del trasplante en un grupo trasplantado con células CHO-ras clon-1.

La figura 26 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de His-OST311 recombinante codificado por el plásmido OST311/pET28, y la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de MK-OST311 recombinante codificado por el plásmido pET22-MK-OST311.

La figura 27 muestra un patrón de elución cuando se sometió His-OST311 recombinante replegado a la purificación por HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón).

La figura 28 muestra un patrón de elución cuando se sometió MK-OST311 recombinante replegado a la purificación por HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón).

La figura 29 muestra un patrón de elución cuando se sometió MK-OST311 recombinante PEGilado a la purificación por HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón).

La figura 30 incluye gráficos que muestran los niveles de fosfato del suero a las 8 ó 9 horas después de una única administración de (A) *Escherichia coli* productora de His-OST311 recombinante o (B) MK-OST311 recombinante PEGilado.

La figura 31 muestra los resultados del análisis por el procedimiento de transferencia Northern en los cambios en la expresión del gen de la enzima que metaboliza la vitamina D en el riñón a la hora y 4 horas después de una única administración de *Escherichia coli* productora de His-OST311 recombinante.

La figura 32 muestra los cambios en los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D3 del suero a la hora, 4 y 9 horas después de una única administración de *Escherichia coli* productora de His-OST311 recombinante.

La figura 33 muestra un OST311 recombinante mutante detectado por transferencia Western, cuando se introdujo la mutación en los aminoácidos N° 174 a 180 de OST311 y posteriormente se expresó el gen en células pEAK para secretar el OST311 recombinante mutante en el sobrenadante celular.

### El mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá más específicamente por medio de los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no tienen la intención de limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### *Construcción de la biblioteca de ADNc humano de tumores procedentes de osteomalacia inducida por tumores*

Se homogeneizaron tejidos tumorales congelados por medio de nitrógeno líquido en 5 ml de disolvente ISOGEN (NIPPON GENE, Japón) y a continuación se prepararon aproximadamente 0,13 mg de ARN total según el manual del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 1,5 µl del ARN total usando un kit de preparación de bibliotecas de ADNc SMART (CLONTECH, EEUU) según el manual del fabricante. A continuación, en el presente documento, este ADNc se denomina ADNc#2. El adaptador de *EcoR* I se unió a este ADNc#2, y posteriormente se insertó en el vector de fago ?ZAPII (STRATAGENE, EEUU) que se había digerido previamente con una enzima de restricción *EcoR* I. Usando un kit de empaquetamiento de fagos Gigapack III Gold (STRATAGENE, EEUU), se construyó una biblioteca de fagos de tumores de osteomalacia inducida por tumores según el manual del fabricante. La biblioteca obtenida contenía un total de aproximadamente 600.000 clones independientes. Además, se dejó que la anterior biblioteca de fagos infectara la cepa XLI-Blue MRF' de *Escherichia coli* y a continuación se vertió sobre 20 placas de petri (15 cm). Las placas de petri se incubaron a 37°C durante 10 horas para la formación de placas. Todas las placas se extrajeron en un tampón SM, de modo que se construyó la biblioteca de fagos de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores.

#### Ejemplo 2

##### *Implementación para el cribado positivo de ADNc de tumores*

##### *Esquema*

El hecho de que la osteomalacia inducida por tumores sea curable suprimiendo quirúrgicamente un tumor sugiere una posibilidad de expresión alta y específica del gen causante en los tumores. Además, se ha informado hasta ahora que los tumores de la osteomalacia inducida por tumores con frecuencia están constituidos por células mesoblásticas, en particular mesenquimatosas. Por consiguiente, es necesario identificar un grupo de genes que se exprese muy poco en tejidos normales derivados del mesoblasto, pero que se exprese específicamente y de manera importante solamente en tejidos tumorales. Por consiguiente, como se describe a continuación, se realizó un cribado positivo para el que

se aplicó una técnica de sustracción de ADNc. Se realizó la sustracción de ADNc derivado de tejido tumoral y de ADNc aislado de un tejido óseo como control, para enriquecer un grupo de genes que se expresen específicamente y de manera importante solamente en tejidos tumorales, pero que no se expresen en tejidos óseos. La hibridación se realizó para la biblioteca de fagos de ADNc de tumores usando el grupo de ADNc sustraído como sonda, obteniendo de ese modo los fragmentos genéticos expresados específicamente en tumores.

(1) *Construcción del ADNc de tejido óseo humano de control*

Se homogeneizaron tejidos óseos humanos congelados por medio de nitrógeno líquido en 5 ml de disolvente ISOGEN (NIPPON GENE, Japón) y a continuación se prepararon aproximadamente 0,011 mg de ARN total según el manual del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 3 µl del ARN total usando un kit de preparación de bibliotecas de ADNc SMART (CLONTECH, EEUU) según el manual del fabricante. A continuación, en el presente documento, este ADNc se denomina ADNc#4.

(2) *Sustracción del ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores y del ADNc de tejido óseo de control*

Para enriquecer un gen expresado de manera importante en ADNc#2 descrito en el Ejemplo 1, se llevó a cabo la hibridación de ADNc#2 y ADNc#4 descrito en el Ejemplo 2 (1) usando un kit de sustracción de ADNc PCR-Select (CLONTECH, EEUU) según el manual del fabricante, sustrayendo de ese modo los fragmentos del gen contenidos en ADNc#4 del ADNc#2. A continuación se amplificó el ADNc#2 sustraído por PCR según el manual del fabricante, obteniéndose de ese modo que un grupo de ADNc sustraído (A).

Por otra parte, por las características del kit de sustracción, para realizar su procedimiento de hibridación solamente dos veces, que es menos que en los procedimientos de las técnicas comunes, es difícil sustraer totalmente por medio de este kit los genes que están presentes en mucha cantidad en ambos sujetos. Por consiguiente, cuando la hibridación de la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores se realiza solamente con el grupo de ADNc sustraído (A) como sonda, los genes que no pueden sustraerse totalmente se obtienen también como clones positivos. Por consiguiente, el ADNc#2 fue sustraído del ADNc#4 descrito en el Ejemplo 2 (1) por el mismo procedimiento, y posteriormente se amplificó el ADNc#4 sustraído por PCR, preparando de ese modo un grupo de ADNc sustraído (B) como sonda de control. La hibridación de la biblioteca de ADNc del tumor respectivamente con el grupo de ADNc sustraído (B) y el grupo de ADNc sustraído (A) previamente descrito, y la comparación de ambas señales hicieron posible aislar los fragmentos del gen contenidos específicamente en tumores de osteomalacia inducida por tumores.

(3) *Hibridación diferencial de la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores*

Después de infectar la cepa de *Escherichia coli* XLI-Blue con la biblioteca de fagos de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores descrita en el Ejemplo 1, se inoculó la *E. coli* infectada nuevamente para formar 3.000 placas por placa de petri (15 cm) y a continuación se incubó a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, se transfirieron las placas de cada placa de petri a dos filtros de nailon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU). Los filtros de nailon a los que se transfirieron las placas se sometieron al tratamiento de inmovilización de ADN según el manual del fabricante, y a continuación se llevó a cabo el cribado usando el ADNc sustraído (A) descrito en el Ejemplo 2 (2) y el ADNc sustraído (B) como sondas, respectivamente.

La marcación de las sondas, la hibridación y la detección de las señales se realizó usando el sistema Alphos Direct (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) según el manual del fabricante. El ADNc sustraído (A) y el ADNc sustraído (B) descrito en el Ejemplo 2 (2) se utilizaron como sondas en una cantidad de 100 ng de cada uno, y a continuación se marcaron las sondas con fluorescencia según los protocolos. Las sondas se añadieron respectivamente a 50 ml del tampón de hibridación suministrado con el sistema Alphos Direct y, al mismo tiempo, 2 series de cada uno de los 8 filtros de nailon a los que se habían transferido las placas se hibridaron respectivamente y se lavaron según los protocolos. Después del lavado, los filtros de nailon se sometieron a la reacción de luminiscencia, se expusieron a una película ECL (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) durante 2 horas, se revelaron con un procesador automático (FUJI FILM, Japón) y a continuación se analizaron los resultados.

Como resultado, se seleccionaron visualmente las placas independientes colocadas en una porción que se quemaron fuertemente tras la exposición cuando se utilizó como sonda el ADNc sustraído (A), pero que no se quemaron cuando se usó el ADNc sustraído (B), se retiraron raspando de la placa de petri y a continuación se suspendieron en 0,5 ml de tampón SM. Las suspensiones se dejaron en reposo a 4°C durante 2 horas o más, extrayendo de ese modo los fagos.

(4) *Análisis de la secuencia de nucleótidos del clon positivo*

Usando 0,5 µl de la disolución de fagos obtenida en el Ejemplo 2 (3) que contenía clones positivos como molde, cebador T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) (ID. SEC. N° 24) y cebador T3 (ATTAACCCTCACTAAAGGGA) (ID. SEC. N° 25) que eran secuencias internas del vector del fago, y polimerasa LA-taq (TAKARA SHUZO, Japón), se realizó la PCR durante 35 ciclos, estando cada ciclo (proceso) constituido por 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Los clones para los que se observó una única banda nítida se secuenciaron por medio del secuenciador de ADN ABI377 (PE Applied Systems, EEUU) usando fragmentos de la amplificación por PCR como moldes.

## ES 2 344 679 T3

Cuando se observaron dos bandas nítidas, se extrajeron respectivamente los productos de PCR de cada porción del gel de las bandas correspondientes usando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Alemania) y a continuación se secuenciaron por medio del secuenciador de ADN ABI377.

Como resultado de la hibridación diferencial para 341.000 placas de la biblioteca de fagos de osteomalacia inducida por tumores, se identificaron 456 placas positivas y se determinaron las secuencias de nucleótidos de todas estas placas.

### Ejemplo 3

#### *Reducción de los genes candidatos del factor inductor de hipofosfatemia humano*

Se llevó a cabo la búsqueda de homología para la información de las secuencias de 456 clones positivos obtenida en el Ejemplo 2 frente a las secuencias de nucleótidos registradas en Genbank, la base de datos de secuencias de nucleótidos proporcionada por el NCBI. Como resultado, se obtuvo un grupo de genes que se presentan en la Tabla 1 como genes existentes que habían aparecido con frecuencias altas. Además, como resultado de la búsqueda en las bases de datos, hay 100 clones de fragmentos genéticos desconocidos de los que se desconocen las actividades biológicas. En cuanto a la información de las secuencia de nucleótidos de estos fragmentos genéticos desconocidos, los solapamientos entre clones se extrajeron además como información de la frecuencia. Entre ellos, se obtuvo el gen con solapamiento más frecuentemente, la secuencia de OST311 constituida por 7 clones que formaban de manera secuencial un cóntigo. La secuencia de nucleótidos obtenida en este momento se extendía desde el nucleótido N° 1522 hasta el 2770 de ID. SEC. N° 1. Cuando se realizó una búsqueda para el fragmento del gen de OST311 sobre las bases de datos existentes, no estaba registrado como ADNc o EST, y correspondía solamente con una secuencia genómica. La secuencia genómica relevante es AC008012, y ya se había informado que estaba localizada en el locus 12p13 en el cromosoma. Sin embargo, no se encontró una región que codificara una proteína (ORF) dentro de la secuencia obtenida, de modo que se predijo que la secuencia correspondía a una región 3' sin traducir. Por consiguiente, se realizó la clonación del ADNc de longitud total de la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores. Además, se usó la función de predicción de ORF del programa DNASIS-Mac versión 3.7 para predecir el ORF.

TABLA 1

| ID del Clon | Frecuencia | Descripción                                  |
|-------------|------------|----------------------------------------------|
| OST 131     | 236        | Proteína 1 de la matriz de dentina (DMP-1)   |
| OST 1       | 35         | Proteína 90 de choque térmico (HSP90)        |
| OST 2       | 13         | Osteopontina                                 |
| OST 311     | 7          | Desconocida/ADN genómico 12p13               |
| OST 1001    | 4          | Antígeno CD44                                |
| OST 584     | 3          | Fibronectina                                 |
| OST 666     | 3          | Proteína tumoral reguladora de la traducción |
| OST 133     | 2          | Beta 2 microglobulina                        |
| OST 837     | 2          | Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)  |
| OST 562     | 2          | Anexina II/lipocortina II                    |
| OST 1002    | 2          | Subunidad 2 de la citocromo c oxigenasa      |
| OST 1003    | 2          | Estatmina                                    |
| OST 1004    | 2          | Desconocida                                  |
| OST 903     | 2          | Desconocida                                  |

## Ejemplo 4

*Clonación de OST311 de longitud total*

5 Basándose en la secuencia de OST311 obtenida en el Ejemplo 3, se sintetizaron los siguientes cebadores. A continuación, se realizó la PCR, usando una disolución de fagos de la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores como molde, durante 35 ciclos, estando cada ciclo (proceso) constituido por 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.

10 311-U65: TCTGTCTCGCTGTCTCCC (ID. SEC. Nº 12)  
311 -L344: CCCCTTCCCAGTCACATTT (ID. SEC. Nº 13)

15 Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, se confirmó la amplificación de los productos de PCR de tamaños predichos, y a continuación se purificaron los productos de PCR usando la columna MicroSpin S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU). Los productos resultantes de la PCR se marcaron con fluorescencia usando el sistema Alphos Direct (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) según el manual del fabricante. A continuación, se realizó la hibridación en placa para 20.000 clones de la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores usando estos productos marcados como sondas.

20 Los 40 clones positivos obtenidos de ese modo se amplificaron por PCR de la manera descrita en el Ejemplo 2 (4) usando T7 y T3. Basándose en la secuencia de nucleótidos del producto resultante de la PCR, se sintetizó un cebador 311-L296 (ID. SEC. Nº 14, GGGGCATCTAACATAAATGC). Una vez más, la hibridación en placa para 20.000 clones de biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores se realizó usando como sondas los productos de PCR amplificados usando los cebadores 311-U65 (ID. SEC. Nº 12) y 311-L344 (ID. SEC. Nº 13). Para 62 clones positivos, se determinó la secuencia de nucleótidos de un producto de PCR amplificado usando los cebadores T7 y 311-L296 (ID. SEC. Nº 14). La secuencia determinada se unió a las secuencias de nucleótidos que se habían determinado hasta el momento. Por consiguiente, se obtuvo la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. Nº 1. Resultó claro que el ORF de OST311 comienza desde un codón de iniciación localizado en el nucleótido Nº 133 de ID. SEC. Nº 1. Además, se sintetizaron los siguientes cebadores para determinar finalmente la secuencia del ORF.

35 311-F1: AGCCACTCAGAGCAGGGCAC (ID. SEC. Nº 15, Nucleótidos Nº 112 a 131)  
311-F2: GGTGGCGGCCGTCTAGAACTA (ID. SEC. Nº 16, Secuencia de vector)  
311-F3: TCAGTCTGGGCGGGCGAAGA (ID. SEC. Nº 17, Nucleótidos Nº 539 a 559)  
40 311-L1: CACGTCAAGGGGTCCCGCT (ID. SEC. Nº 18, Nucleótidos Nº 689 a 708)  
311-L3: TCTGAAATCCATGCAGAGGT (ID. SEC. Nº 19, Nucleótidos Nº 410 a 429)  
311-L5: GGGAGGCATGGGATAGGCTC (ID. SEC. Nº 20, Nucleótidos Nº 200 a 220)  
45 311-L6: CTAGATGAACTGGCGAAGGG (ID. SEC. Nº 21, Nucleótidos Nº 868 a 888)

50 Usando los cebadores 311-F2 (ID. SEC. Nº 16) y 311-L6 (ID. SEC. Nº 21), la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores como molde y la polimerasa de ADN Pyrobest (TAKARA SHUZO, Japón), se realizó la PCR durante 35 ciclos, estando cada ciclo (proceso) constituido por 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.

55 Cuando se sometieron los productos de PCR a la electroforesis en gel de agarosa al 2%, se confirmó un fragmento único de aproximadamente 980 pares de nucleótidos. A continuación se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado usando los cebadores anteriores (ID. SEC. Nº 15 a 21). La región ORF determinada de ese modo (ID. SEC. Nº 1) que codifica el polipéptido representado por ID. SEC. Nº 2 se colocó entre el codón de iniciación ATG localizado en el nucleótido Nº 133 y el codón de terminación TAG localizado en el nucleótido Nº 886 de ID. SEC. Nº 1.

## 60 Ejemplo 5

*Especificidad de OST311 contra el tumor de la osteomalacia inducida por tumores*

65 Para estudiar la especificidad tumoral de OST311, se realizó la PCR durante 35 ciclos usando como moldes los ADNc de primera hebra extraídos de tejidos tumorales y de tejidos óseos de control, y usando los cebadores específicos de OST311 que se muestran a continuación (ID. SEC. Nº 22 y 23). Cada ciclo de PCR es un proceso constituido por 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Además, se añadió DMSO en ambas

disoluciones de reacción para tener una concentración final de 2%, y se usó la polimerasa de ADN LA-taq (TAKARA SHUZO, Japón) como enzima. Además, como patrón interno, se realizó la PCR bajo condiciones similares usando cebadores específicos para G3PDH (directo "FW": ACCACAGTCCATGCCATCAC (ID. SEC. N° 26), inverso "RV": TCCACCACCTGTTGCTGTA (ID. SEC. N° 27)).

311F1EcoRI: CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCAGC (ID. SEC. N° 22)

311LHisNot: ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGTATGGTGTATGGATGAACTTGGCGAA  
(ID. SEC. N° 23)

Como se muestra en la Figura 1, estos productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cuando se usaron los cebadores de OST311, se observaron los productos de PCR con los tamaños predichos solamente cuando se utilizó el tejido tumoral como molde. En cambio, cuando se usaron los cebadores de G3PDH, se observaron los productos de PCR con los tamaños predichos en el mismo nivel en ambos casos, en los tejidos tumorales y en los tejidos óseos de control. A partir de estos resultados, se confirmó la expresión de OST311 específica de tejido tumoral.

## Ejemplo 6

### Aislamiento de las células CHO que expresan OST311 de manera estable

#### (1) Construcción del vector de expresión de OST311

Usando los cebadores 311F1EcoRI (ID. SEC. N° 22) y 311LHisNot (ID. SEC. N° 23) mostrados en el Ejemplo 5 y la biblioteca de ADNc de tumores de osteomalacia inducida por tumores, se realizó la PCR durante 35 ciclos, estando cada ciclo (proceso) constituido por 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Además, se añadió DMSO a la disolución de reacción para tener una concentración final de 2%, y se usó la polimerasa de ADN LA-taq (TAKARA SHUZO, Japón) como enzima. El cebador 311F1EcoRI se hibridó al número al nucleótido N° 111 de ID. SEC. N° 1 localizado secuencia arriba de la secuencia de Kozak, y el cebador 311LHisNot se hibridó al nucleótido N° 871 de ID. SEC. N° 1. Puede amplificarse una región que codifica el polipéptido de longitud total representado por ID. SEC. N° 2 realizando la PCR usando ambos cebadores. Además, el cebador 311LHisNot contiene una secuencia de nucleótidos que añade seis residuos de histidina después del aminoácido N° 251 de ID. SEC. N° 2 y también añade un codón de terminación después del último codón de histidina. Por consiguiente, la proteína recombinante traducida tiene una secuencia marcadora His6 en el extremo C terminal, de modo que es útil para el reconocimiento de un recombinante por medio de un anticuerpo y para la purificación del recombinante usando resina de níquel.

Después de la digestión con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Not* I, el producto de PCR se unió al vector plasmídico pcDNA3.1Zeo (INVITROGEN, EEUU) para la expresión en células animales que se habían digerido con *EcoR* I y *Not* I de manera similar. El vector recombinante obtenido de ese modo se introdujo en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se cultivó la *E. coli* en 3 ml de medio LB que contenía ampicilina 100 mg/ml, y a continuación se purificó el plásmido usando el kit de purificación de plásmidos GFX (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU). La secuencia del gen insertado se determinó por un procedimiento convencional. Por consiguiente, se confirmó que la secuencia era idéntica a una porción equivalente de ID. SEC. N° 1, y que se había añadido una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia marcadora His6 inmediatamente antes del codón de terminación.

#### (2) Aislamiento de las células CHO que expresan OST311 de manera estable

Se digirieron aproximadamente 20  $\mu$ g del plásmido, al que se le había insertado la porción ORF de OST311 preparada en el Ejemplo 6 (1), con una enzima de restricción *Fsp* I para escindir un sitio del gen de resistencia a la ampicilina dentro del vector. A continuación, se sometió el vector escindido a la precipitación con etanol y posteriormente se disolvió en 10  $\mu$ l del agua ultrapura. Posteriormente, se introdujo el volumen total de la disolución en las células huésped por una electroporación usando Gen Pulser II (Bio Rad, EEUU). Se usaron células CHO ras clon-1 (Shirahata, S., Biosci. Biotech. Biochem, 59 (2): 345-347, 1995) como células huésped. Se cultivaron las células CHO ras clon-1 en un matraz de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (CORNING, EEUU) que contenía medio MEM $\alpha$  suplementado con FCS al 10% a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 100% hasta que las células crecieron hasta cubrir aproximadamente el 90% del área de cultivo. Posteriormente se eliminaron las células adherentes por tratamiento con tripsina, de modo que se obtuvieron aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> células quedaron. Las células obtenidas se resuspendieron en 0,8 ml de PBS, se mezclaron con el plásmido digerido con *Fsp* I, y a continuación se enfriaron en hielo durante 10 minutos. Las células que contenían el plásmido se transfirieron a una cubeta de cuatro milímetros en anchura. Tras aplicar el impulso eléctrico en los valores calibrados (0,25 kilovoltios y 975  $\mu$ F), se enfrió nuevamente la cubeta durante 10 minutos. Las células con el gen transferido se cultivaron en medio MEM $\alpha$  que contenía al FCS durante 24 horas. Posteriormente, se añadió Zeosin (INVITROGEN, EEUU) al medio de cultivo para tener una concentración final de 0,5 mg/ml, y a continuación se cultivó durante 1 semana más. Posteriormente, para las células de la clonación que mostraban capacidad de resistencia al fármaco, las células se reinocularon en una placa de pocillos 96 (CORNING, EEUU) a 0,2 células/pocillo por un procedimiento de dilución limitada, y a continuación se cultivaron en presencia de

zeosina con una concentración final de 0,3 mg/ml durante aproximadamente 3 semanas, obteniendo de ese modo 35 clones de la cepa resistente al fármaco.

(3) *Confirmación de la producción de recombinante por las células CHO que expresan OST311 de manera estable*

Para los 35 clones que mostraban resistencia al fármaco, se confirmó la presencia de OST311 recombinante en el medio acondicionado por el procedimiento de transferencia Western.

Se concentraron 0,2 ml de medio acondicionado hasta aproximadamente 40 a 50  $\mu$ l usando un sistema de membranas ultra-free MC con un PM de corte de 5.000 (MILLIPORE, EEUU). Se añadieron 10  $\mu$ l de un tampón de muestra que contenía Tris-Cl 1 M, pH 6,8, SDS al 5%, glicerol al 50% y DTT 100 mM para concentrar, y a continuación se calentó a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente se separó la proteína en el medio acondicionado por electroforesis en poliacrilamida con un gradiente del 10 al 20%. A continuación, se transfirió la proteína que estaba en el gel a la membrana de PVDF Immobilon (MILLIPORE, EEUU) usando un sistema de transferencia semiseco (Owl Separation Systems, EEUU). Esta membrana de PVDF se incubó con anticuerpo anti His (extremo C terminal) (INVITROGEN, EEUU) que se había diluido 1/5000 en tampón TTBS (Sigma, EEUU) a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se expuso la membrana a la película durante 5 minutos usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) y se reveló con un procesador automático (FUJIFILM, Japón). Como resultado, se aisló el clon # 20, para el que se habían observado las señales más intensas en aproximadamente 32 kDa y 10 kDa. A continuación, en el presente documento, la célula # 20 se denominó CHO-OST311H y se depositó en el National Institute of Advanced Science and Technology, Organismo Internacional de Depósito de Patentes (Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 1-1-1) (número de referencia. FERM BP-7273).

Ejemplo 7

*Medición de la actividad inhibidora de la absorción de fosfato por el medio acondicionado de CHO-OST311H*

Se cultivó CHO-OST311H en un matraz de cultivo de 225 cm<sup>2</sup> (CORNING, EEUU) que contenía medio MEM $\alpha$  suplementado con FCS al 10% a 37°C, bajo CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 100% hasta que las células crecieron hasta cubrir aproximadamente el 80% del área del matraz. A continuación, se reemplazó el medio con 30 ml de medio CHO-S-SFM II sin suero (LIFE TECHNOLOGY, EEUU). 48 horas más tarde, se recogió el medio acondicionado. Se centrifugó el medio acondicionado a 1.200 g durante 5 minutos para eliminar las células suspendidas y similares, y a continuación se filtró usando un filtro de 0,22  $\mu$ m Minisart-plus (Sartorius, Alemania).

Usando este medio acondicionado, se examinó el efecto en la actividad de absorción del fosfato de una línea celular del túbulo proximal renal humano (células CL-8). La línea celular del túbulo proximal renal humano se cultivó bajo CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 100% a 37°C en medio DMEM que contenía FCS al 10% (LIFE TECHNOLOGY). Para medir la actividad de absorción del fosfato, la línea celular del túbulo proximal renal humano se cultivó primero en medio DMEM que contenía FCS al 10% en una placa de 48 pocillos (CORNING, EEUU). Cuando las células crecieron hasta cubrir toda la superficie inferior de la placa a los 3 días después del comienzo del cultivo, se reemplazó el medio de cultivo con 200  $\mu$ l de medio CHO-S-SFM II sin suero (LIFE TECHNOLOGY, EEUU), seguido por otro cultivo durante 20 a 24 horas. Usando las células en este estado, se llevaron a cabo los siguientes experimentos para medir la actividad de absorción del fosfato (Experimentos 1 y 2).

Experimento 1

Se eliminó el medio CHO-S-SFM II y a continuación se añadieron 200  $\mu$ l del anterior medio acondicionado de células CHO-OST311H preparado en medio CHO-S-SFM II por pocillo. En este momento, como pocillos de control, se prepararon 3 pocillos que contenían el medio que no se había reemplazado con CHO-S-SFM II y 3 pocillos que contenían el medio que se había suplementado respectivamente con 200  $\mu$ l del medio acondicionado de células CHO-OST190H preparado de una manera similar al preparado para CHO-OST311H. Las células CHO-OST190H descritas anteriormente son células recombinantes que se han preparado introduciendo OST190H, que se ha clonado de manera similar a la utilizada para las células CHO-OST311H, en CHO ras clon-1 de manera tal que pueda expresarse OST190H. De manera similar a OST311H, CHO-OST190H expresado contiene una secuencia de marcador His6 añadida al extremo C terminal de un polipéptido, que es el mismo que el polipéptido denominado MEPE como fue informado por Rowe, P.S.N. y col., Genomics 67: 54-68, 2000. Después de añadir cada muestra, se realizó la incubación en un incubador con CO<sub>2</sub> durante 26 horas, se midió la actividad de absorción de fosfato de las células en cada pocillo por el siguiente procedimiento para medir la actividad de absorción de fosfato.

Experimento 2

Se retiraron 100  $\mu$ l de medio de cultivo de 200  $\mu$ l del medio de cultivo CHO-S-SFM II. En estos cultivos, se añadieron 100  $\mu$ l de medio acondicionado de las células CHO ras clon-1 respectivamente a 3 pocillos, y 100  $\mu$ l de medio acondicionado de las células CHO-OST311H respectivamente a 3 pocillos. A continuación, se realizó la incubación en un incubador con CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, se midió la actividad de absorción del fosfato de las células en cada pocillo por el siguiente procedimiento para medir el transporte de fosfato.

*Procedimiento de medición de la actividad de absorción del fosfato*

Después de la adición del medio de incubación acondicionado, se lavaron las células con un tampón que no contenía ácido fosfórico (NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,8 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) y a continuación se incubaron en la misma disolución a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se retiró la disolución y a continuación se añadió una disolución de ensayo, que se había preparado añadiendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> radiactivo (NEN) para tener 0,105 mM al tampón. La disolución se sometió a incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con una disolución de parada que se había enfriado con hielo inmediatamente después de eliminar la disolución de ensayo (cloruro de la colina 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,8 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4). Se eliminó esta disolución de lavado, se añadieron 80 µl de NaOH 0,2 N a las células y a continuación se incubó la disolución a temperatura ambiente durante 10 minutos, de modo que las células se lisaron. Para medir la radiactividad en la disolución de lisis celular, se transfirió la disolución a ReadyCap (Beckman), se secó a 50°C y a continuación se colocó en un vial de vidrio. Posteriormente, se midió la radiactividad usando un contador de centelleo (Wallac1410, Pharmacia). La actividad de absorción de fosfato en cada experimento se muestra en la Tabla 2, en la que la absorción media en el control no suplementado con medio acondicionado se considera como 100%. El medio acondicionado de las células CHO-OST311H suprimió significativamente la actividad de absorción de fosfato de las células epiteliales humanas de los túbulos contorneados proximales renales.

TABLA 2

*Actividad de OST311 contra la absorción de fosfato por las células epiteliales tubulares renales*

| Experimento 1              |                                   |                  |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Muestra                    | Actividad de absorción de fosfato | prueba t ± EEM   |
| No suplementada            | 100 ± 1,9                         | -                |
| CHO-OST190H                | 103,8 ± 0,9                       | No significativo |
| CHO-OST311H                | 87,4 ± 0,2                        | p<0,1            |
| Experimento 2              |                                   |                  |
| Medio de CHO acondicionado | Actividad de absorción de fosfato | prueba t ± EEM   |
| CHO-OST311H                | 100 ± 1,5                         | -                |
| CHO-OST311H                | 87,2 ± 1,2                        | p<0,01           |

## Ejemplo 8

*Purificación parcial de OST311 recombinante a partir de medio de CHO-OST311H acondicionado*

Se purificó parcialmente OST recombinante a partir del medio acondicionado de la manera descrita en el Ejemplo 7 por el siguiente procedimiento. Los procedimientos 1) a 4) se realizaron en una cámara cromatográfica a 4°C.

1) Una columna desechable de polipropileno se rellenó con la resina de níquel ProBond (INVITROGEN, EEUU) para tener un volumen del lecho de 3 ml y a continuación se lavó la columna y se equilibró con 30 ml del tampón 1 (Tabla 3).

2) Se aplicaron 120 ml del medio acondicionado preparado en la manera descrita en el ejemplo 7 a la anterior columna de níquel por caída libre, permitiendo la unión de OST311 recombinante.

3) Se usaron 30 ml del tampón 2 que se muestra en la Tabla 3 para eliminar las proteínas adsorbidas inespecíficamente.

4) Se añadieron 3 ml del tampón 3 que se muestra en la Tabla 3 respectivamente en cuatro veces separadas, de modo que se eluyó OST311 recombinante. 20 µl de cada una de estas cuatro fracciones se sometieron directamente (como concentración original) a transferencia Western en la manera descrita en el Ejemplo 6 (3). Se este modo, se intentó la detección de OST311 con anticuerpo anti His.

Como resultado, se observaron intensamente señales de aproximadamente 32 kDa y 10 kDa en la segunda fracción.

5) La segunda fracción anterior se aplicó a las columnas NAP25 y NAP10 (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) y se reemplazó el disolvente con el tampón 4 que se muestra en la Tabla 3.

6) OST311 recombinante, para el que el disolvente se había reemplazado con el tampón 4, se aplicó a SP-5PW (resina de intercambio catiónico fuerte, TOSOH, Japón) a un caudal de 1 ml/minuto usando cromatografía líquida de alta resolución (Hitachi, Japón). Se añadió el tampón 5 que se muestra en la Tabla 3 con un gradiente del 1%/minuto

## ES 2 344 679 T3

para la elución, obteniéndose de ese modo fracciones de 2 ml cada una. Según se muestra en Fig. 2, la transferencia Western se realizó para cada fracción de elución en la manera descrita en el Ejemplo 8 (5), de modo que se intentó la detección de OST311. La señal de aproximadamente 10 kDa se eluyó con aproximadamente NaCl 280 mM, y la señal de aproximadamente 32 kDa se eluyó con aproximadamente NaCl 400 mM. Las fracciones correspondientes se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, y a continuación se tiñeron usando un kit de tinción de plata (Daiichi Chemicals, Japón). La pureza de la fracción que contenía aproximadamente 10 kDa y 32 kDa era del 70% o más.

TABLA 3

| Tampón 1                            | Tampón 2                                                | Tampón 3                                                               | Tampón 4                            | Tampón 5                                            |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Na/Pi 10 mM<br>pH 6,5<br>NaCl 0,5 M | Na/Pi 10 mM<br>pH 6,5<br>10 M<br>imidazol<br>NaCl 0,5 M | Na/Pi 10 mM<br>pH 6,5<br>0,5 M<br>imidazol<br>NaCl 0,5 M<br>CHAPS 5 mM | Na/Pi 10 mM<br>pH 6,5<br>CHAPS 5 mM | Na/Pi 10 mM<br>pH 6,5<br>NaCl 1 M<br><br>CHAPS 5 mM |
| Na/Pi: tampón de sodio y fosfato    |                                                         |                                                                        |                                     |                                                     |

### Ejemplo 9

#### *Análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal de OST311 recombinante parcialmente purificado*

Las fracciones parcialmente purificadas de aproximadamente 10 kDa y 32 kDa reconocidas por el anticuerpo anti His que se habían obtenido por el procedimiento descrito en el Ejemplo 8 se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. A continuación, usando un sistema de transferencia semiseco (Owl Separation Systems, EEUU), se transfirió la proteína en el gel a una membrana de PVDF Immobilon (MILLIPORE, EEUU). La membrana de PVDF se tiñó con azul de Coomassie, se escindieron las bandas de aproximadamente 32 kDa y 10 kDa, y a continuación se determinaron las secuencias de aminoácidos del extremo N terminal usando un secuenciador de proteínas Modelo 492 (PE Applied Systems, EEUU).

Como resultado, fue evidente que la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal de la banda de aproximadamente 35 kDa era una secuencia de OST311 que comenzaba desde el residuo N° 25, Tyr, de ID. SEC. N° 2. A partir de este resultado, se confirmó que una se había escindido una secuencia que se extendía desde el residuo N° 1, Met, hasta el residuo N° 24, Ala, de ID. SEC. N° 2, como una secuencia de la señal de secreción. Por otra parte, resultó evidente que la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal de banda de aproximadamente 10 kDa era una secuencia de OST311 que comenzaba desde el residuo N° 180, Ser, de ID. SEC. N° 2. La presencia de un motivo constituido por RRXXR inmediatamente antes de Ser en el residuo N° 180 reveló que OST311 recombinante había sido escindido por alguna proteasa procedente de las células de CHO.

Como se describió anteriormente, se mostró que OST311 recombinante producido por las células CHO-OST311 estaba presente como al menos 3 tipos de polipéptidos después de la secreción: un polipéptido (ID. SEC. N° 4) desde el residuo N° 25, Tyr, hasta el N° 251, Ile, un polipéptido (ID. SEC. N° 6) desde el residuo N° 25, Tyr, hasta el N° 179, Arg, y un polipéptido (ID. SEC. N° 8) desde el residuo N° 180, Ser, hasta el N° 251, Ile de ID. SEC. N° 2.

### Ejemplo 10

#### *Preparación del anticuerpo policlonal anti péptido parcial de OST 311*

El grado de hidrofobicidad del polipéptido ID. SEC. N° 2 se predijo usando una función de cálculo del programa MacVector versión 6.5.1, de modo que se predijeron los sitios adecuados para actuar como antígeno en la preparación de anticuerpos contra el péptido (Fig. 3A y B). En el presente documento, se predijo el sitio adecuado desde la perspectiva de que los sitios tienen alto grado de hidrofilia y están menos sometidos a modificación y fosforilación de la cadena de azúcares. Por consiguiente, los seleccionados y sintetizados como antígenos fueron 311-48 (ID. SEC. N° 28) preparado añadiendo de manera artificial un residuo cisteína en la etapa sintética del extremo C terminal de un péptido constituido por 20 aminoácidos comenzando desde el residuo N° 48, Arg, de ID. SEC. N° 2, y 311-114 (ID. SEC. N° 29) preparado de manera similar añadiendo un residuo cisteína a un péptido constituido por 20 aminoácidos comenzando desde el residuo N° 114, Arg. Específicamente, los residuos de cisteína se añadieron de manera artificial a los extremos

C terminales de ambos péptidos en la etapa sintética, de modo que los productos pudieran acoplarse con las proteínas transportadoras (tiroglobulina bovina). El acoplamiento con las proteínas transportadoras y la inmunización de conejos se consignaron a IBL, Co., Ltd. (1091-1, Fujioka-shi, Gunma, Japón) (número de asignación: 1515).

311-48: RNSYHLQIHKNGHVDGAPHQC (ID. SEC. Nº 28)

311-114: RFQHQTLENGYDVYHSPQYHC (ID. SEC. Nº 29)

## Ejemplo 11

### *Experimento de trasplante de células CHO-OST311H en ratones atímicos*

Para probar si OST311 es un factor causante para la osteomalacia inducida por tumores, se transplantaron células CHO-OST311H en ratones atímicos BALB/c, machos, de 6 semanas de edad, para la generación de tumores, desarrollando de ese modo un modelo murino de osteomalacia inducida por tumores que secreta OST311 recombinante de los tumores. Como control para el experimento, se usaron células CHO ras clon-1 y CHO-OST190H descritas en el Ejemplo 7 de manera similar para el experimento de trasplante.

#### (1) *Trasplante de células de CHO*

Las células CHO-OST311H y CHO-OST190 se dispersaron por el tratamiento con tripsina de los matraces de cultivo, se suspendieron a razón de  $1 \times 10^8$  células/ml en PBS. La suspensión se inyectó por vía subcutánea, 0,1 ml a cada una, a ambos flancos de los ratones atímicos ( $2 \times 10^7$  células/ratón). Además, como grupo de control, se realizó la inyección subcutánea del mismo número de células CHO ras clon-1 de la misma manera. Durante aproximadamente 1 mes después de la inyección, se alojaron cinco ratones atímicos en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al alimento sólido CE-2 (CLEA, JAPAN, Japón) y al agua del grifo. 2 semanas después del trasplante, se observó la generación de tumores para el 75% del grupo de control y el 66,7% del grupo OST311.

#### (2) *Comparación de cambios en el peso corporal*

Se compararon los cambios con el transcurso del tiempo en el peso corporal promedio durante 31 días después del trasplante de las células CHO-OST311H entre un grupo sin carga tumoral (una línea indicada con prom.- en el gráfico) y un grupo con carga tumoral transplantado con células CHO-OST311H (una línea indicada con prom.+ en el gráfico). Según se muestra en la Fig. 4, el grupo con carga tumoral transplantado con células CHO-OST311H mostró supresión de los aumentos en el peso corporal comparado con el grupo sin carga tumoral, y hubo diferencias claramente significativas entre los dos grupos ( $24,1 \pm 1,5$  g frente a  $26,7 \pm 1,0$  g,  $p < 0,001$ , día 31). En cambio, no se encontraron diferencias similares en el peso corporal promedio entre el grupo de control con carga tumoral transplantado con células CHO ras clon-1 y el grupo sin carga tumoral ( $27,0 \pm 1,8$  g frente a  $26,7 \pm 1,0$  g, diferencia no significativa, día 31).

#### (3) *Medición de fosfato y de calcio del suero, y de fosfato y de calcio de la orina*

El los días 30 a 40 después del trasplante celular, los ratones atímicos se alojaron en jaulas metabólicas durante 24 horas. Tras recoger la orina, se extrajo sangre del corazón o de la cavidad orbital de los ratones bajo anestesia usando dietiléter. La sangre periférica se sometió a la preparación del suero usando Microtainer (Beckton Dickinson, EEUU). Después de medir el volumen, la orina se centrifugó para recoger el sobrenadante. Los niveles de fosfato del suero y de la orina se midieron usando P-test de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón), y los niveles de calcio del suero y de la orina se midieron usando calcium-test de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón), los niveles de creatinina del suero y de la orina se midieron usando CRE-EN de KAINOS (KAINOS, Japón).

## Experimento 1

En el día 34 después del trasplante celular, se midieron los niveles de fosfato del suero del grupo sin carga tumoral, del grupo con carga tumoral transplantado con célula CHO ras clon-1, del grupo con carga tumoral transplantado con células CHO-OST190H y del grupo con carga tumoral transplantado con células CHO-OST311H.

## Experimento 2

En los días 44 a 46 después del trasplante celular, se midieron los niveles de fosfato, los niveles de calcio y los niveles de creatinina del suero y de la orina del grupo sin carga tumoral y del grupo con carga tumoral transplantado con células CHO-OST311H. Se determinó la excreción renal fraccionada de fosfato y de calcio dividiendo el aclaramiento de fosfato o de calcio por el aclaramiento de creatinina.

Los resultados de las mediciones se muestran en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

*Fosfato y calcio del suero y de la orina en ratones trasplantados con células*

#### Experimento 1

| Grupo                     | Número de ratones | Nivel de fosfato del suero $\pm$ EEM (mg/dl) | prueba t                    |
|---------------------------|-------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|
| Ratones sin carga tumoral | 7                 | 8,15 $\pm$ 0,60                              | -                           |
| CHO ras clon-1            | 4                 | 8,50 $\pm$ 0,38                              | Diferencia no significativa |
| CHO-OST190H               | 4                 | 9,49 $\pm$ 0,52                              | Diferencia no significativa |
| CHO-OST311H               | 9                 | 4,39 $\pm$ 0,23                              | p<0,001                     |

#### Experimento 2

| Grupo                                        | Sin tumor           | CHO-OST311H         | prueba t                    |
|----------------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| Número de ratones                            | 4                   | 6                   | -                           |
| Nivel de fosfato del suero $\pm$ EEM (mg/dl) | 8,29 $\pm$ 0,59     | 4,25 $\pm$ 0,15     | p<0,001                     |
| Excreción renal fraccionada de fosfato       | 0,23 $\pm$ 0,02     | 0,44 $\pm$ 0,06     | p<0,05                      |
| Nivel de Ca del suero $\pm$ (mg/dl)          | 6,72 $\pm$ 0,27     | 4,61 $\pm$ 0,19     | p<0,001                     |
| Excreción renal fraccionada de calcio        | 0,0040 $\pm$ 0,0006 | 0,0059 $\pm$ 0,0010 | Diferencia no significativa |

#### (4) Radiografía suave del esqueleto completo

Después del trasplante de las células CHO-OST311H, los individuos en los que se reconocía la formación de tumores mostraron anomalías significativas en sus constituciones físicas y en el andar, comparados con los individuos sin carga tumoral o con los individuos trasplantados con CHOS ras clon-1 de control. Por consiguiente, se predijo que los individuos con carga tumoral tendrían anomalías esqueléticas. A continuación, se seleccionaron aleatoriamente individuos en los que se reconocía la formación de tumores del grupo de control trasplantado con CHOS ras clon-1, del grupo trasplantado con células CHO-OST190H y del grupo trasplantado con células CHO-OST311H, y a continuación se tomaron radiografías de los mismos usando un sistema de radiografía  $\mu$ FX-100 (FUJI FILM, Japón) según el manual adjunto del fabricante. Las radiografías se tomaron bajo condiciones de voltaje del tubo de rayos X de 25 kilovoltios, corriente del tubo de rayos X de 0,1 mA y tiempo de exposición de 10 segundos. Los individuos se expusieron a una placa de generación de imágenes, y a continuación se realizó el análisis de las imágenes usando BAS2000 (FUJI FILM, Japón).

Como resultado, según se muestra en la Fig. 5, se reconoció brillo reducido del roentgenograma suave del hueso en esqueleto completo de los individuos trasplantados con células CHO-OST311H, de modo que se reconoció el defecto de mineralización. Además, también se reconoció deformidad esquelética, tal como la distorsión de la caja torácica.

#### (5) Medición de los niveles de fosfato, niveles de calcio y actividad de la fosfatasa alcalina del suero

El suero obtenido por extracción de sangre del corazón en los días 44 y 46 después del trasplante celular se almacenó a -20°C una vez. Las muestras de suero se descongelaron juntas, se midieron nuevamente los niveles de fosfato y de calcio contenidos en cada suero, y se midieron también las actividades de la fosfatasa alcalina. Los niveles de fosfato se midieron usando P-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón) y se midieron los niveles de

calcio usando calcium-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón), las actividades de la fosfatasa alcalina se midieron usando calcium alkaline phosphor B-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón). Los resultados se clasificaron en un grupo sin carga tumoral (n = 6), un grupo con carga tumoral de CHO (n = 10), un grupo con carga tumoral de células CHO-OST190H (n = 10) y un grupo con carga tumoral de CHO-OST311H (n = 6 x 2). El grupo de CHO-OST311H se clasificó en dos grupos: un grupo sacrificado en el día 44 (CHO-OST311H-1: n = 6) y un grupo sacrificado en el día 46 (CHO-OST311H-2: n = 6). Según se muestra en la Fig. 7, se reconocieron cambios significativos que incluyen nivel disminuido de fosfato del suero (Fig. 7A), nivel disminuido de calcio del suero (Fig. 7B) y actividad aumentada de la fosfatasa alcalina del suero (Fig. 7C) en el grupo del tumor de CHO-OST311H.

#### (6) *Expresión del cotransportador de sodio y fosfato (NaPi-7) en el túbulo proximal renal*

##### i) *Preparación de las membranas de ribete en cepillo (a continuación, en el presente documento, denominadas BBM) de la célula epitelial del túbulo proximal*

Se extirparon los riñones de los individuos con carga tumoral de CHO-OST311H y de los individuos sin carga tumoral bajo anestesia usando dietiléter. Cada riñón se cortó por la mitad para obtener las secciones coronales (Experimento 1: 6 individuos con carga tumoral de CHO-OST311H y 4 individuos sin carga tumoral. Experimento 2: 6 individuos con carga tumoral de CHO-OST311H y 2 individuos sin carga tumoral). Usando la mitad de cada uno de los riñones respectivamente extirpados de los individuos, se prepararon las BBM según los protocolos informados por Kessler y col. (Biochem. Biophys. Acta. 506, páginas 136-154).

El riñón se homogeneizó en 3 ml de un tampón de homogeneización (manitol 50 mM, Tris/HEPES 2 mM, pH 7,5) usando un homogeneizador de vidrio a 1.300 rpm durante 2 minutos de modo que se obtuvieron los extractos de riñón homogéneos. Después de añadir  $\text{CaCl}_2$  al extracto para tener una concentración final de 10 mM, la disolución se agitó a 4°C durante 15 minutos, a continuación se centrifugó a 4.900 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de ese modo se filtró usando un Kimwipe, y posteriormente se centrifugó a 16.200 g durante 60 minutos a 4°C, permitiendo de ese modo que las fracciones que contenían muchas BBM precipitaran. El precipitado se resuspendió en 5 ml de un tampón de suspensión (manitol 50 mM, Tris/HEPES 2 mM, pH 7,5) y a continuación se centrifugó nuevamente la disolución a 16.200 g durante 60 minutos a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces y posteriormente se resuspendió el producto en 0,1 ml de un tampón de suspensión. La concentración de proteína de la disolución obtenida de ese modo era de 3 a 4 mg/ml según se determinó por procedimientos convencionales.

##### ii) *Transferencia Western de la proteína de BBM*

Como se describió anteriormente, las proteínas de BBM preparadas de cada ratón se diluyeron por separado con un tampón de suspensión hasta 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Posteriormente se añadieron 2,5  $\mu\text{l}$  de un tampón de muestras que contenía Tris-Cl 1 M, pH 6,8, SDS al 5%, glicerol al 50% y DTT 100 mM a la solución diluida. Después de calentar la disolución a 95°C durante 5 minutos, se separó la proteína en la disolución de BBM por electroforesis en poliacrilamida con un gradiente del 10 hasta el 20%. Posteriormente, se transfirió la proteína en el gel a la membrana de PVDF Immobilon (MILLIPORE, EEUU) usando un sistema de transferencia semiseco (Owl Separation Systems, EEUU). La membrana de PVDF se incubó con el anticuerpo policlonal anti-NaPi-7 diluido 1/2000 en tampón TTBS (Sigma, EEUU) a temperatura ambiente durante 3 horas. El anticuerpo es un anticuerpo policlonal que se ha obtenido inmunizando un conejo con un péptido sintético (LALPAHHNATRL) correspondiente al sitio C terminal de NaPi-7 de ratón por procedimientos convencionales en KIRIN BREWERY CO., LTD., Pharmaceutical Research Laboratories Division. Después de la reacción con este anticuerpo, el producto de reacción se incubó nuevamente, ahora con el anticuerpo secundario IgG anti conejo (DAKO, Dinamarca) unido a peroxidasa de rábano picante (HRP), y a continuación se detectaron las bandas usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU).

Bajo condiciones reductoras, se detectaron bandas de aproximadamente 80 kDa y 35 kDa y manchas de alto peso molecular de 170 a 200 kDa con el anticuerpo (Fig. 8). Estos patrones de bandas son los mismos que los de los casos informados por Tatsumi y col. en J. Biol. Chem. Vol. 273, páginas 28568-28575, 1998, y se había confirmado que estas bandas cambian uniformemente dependiendo de la cantidad de ingesta de fosfato de los alimentos por los ratones o las ratas. De estos hechos, las bandas demostraron ser polipéptidos derivados de NaPi-7. Como se muestra en la Fig. 8, para todos los fragmentos anteriores (bandas indicadas con flechas), las señales de NaPi-7 contenidas en las proteínas de BBM que se habían preparado de individuos con carga tumoral de CHO-OST311H estaban significativamente reducidas comparadas con las preparadas de individuos sin carga tumoral. Estos resultados se reprodujeron en los Experimentos 1 y 2 realizados de manera individual. Por otra parte, estas proteínas de BBM se separaron por electroforesis en poliacrilamida con un gradiente del 10 hasta el 20%, y a continuación se tiñeron con azul de Coomassie. Las proteínas de BBM de los individuos se tiñeron igualmente, sugiriendo que las señales reducidas en la transferencia Western se observan específicamente para NaPi-7 (Fig. 8). Basándose en este hecho, se deduce que la proteína OST311 actúa en las células del túbulo proximal renal, y regula negativamente el nivel de expresión de NaPi-7 a nivel de la proteína, para inducir la hipofosfatemia.

(7) *Análisis de los cambios en los ARNm de transportadores de fosfato y de enzimas que metabolizan la vitamina D en el riñón y en el intestino delgado*

i) *Preparación del ARN total*

Se extirparon los intestinos delgados y los riñones de los ratones sacrificados en los días 44 a 46 después del trasplante de células. Los riñones se congelaron rápidamente en hielo seco. Los riñones congelados se crioconservaron en un congelador a -80°C hasta el uso. Se homogeneizó un riñón congelado en 5 ml de ISOGEN (Nippon Gene, Japón) y a continuación se preparó el ARN total según el manual adjunto del fabricante. Se sometieron 15 µg del ARN total preparado a electroforesis por medio de gel desnaturalizado con una concentración de agarosa del 1% que contenía formaldehído según procedimientos convencionales, y a continuación se transfirió a Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, EEUU) durante la noche por un procedimiento de transferencia capilar. El filtro con ARN transferido se irradió con UV usando un Stratalinker (STRATAGENE, EEUU) para la inmovilización del ARN transferido, se lavó con 2 X SSC, se secó al aire y a continuación se almacenó a temperatura ambiente hasta el uso. Los intestinos delgados se lavaron con disolución salina fisiológica para eliminar el contenido y a continuación se invirtieron. Posteriormente, se recogieron los epitelios del intestino delgado raspando con una preparación, y a continuación se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido. Los epitelios del intestino delgado se crioconservaron en un congelador a -80°C hasta el uso. Los epitelios del intestino delgado congelados se homogeneizaron en 5 ml de ISOGEN (Nippon Gene, Japón) y a continuación se preparó el ARN total según el manual adjunto del fabricante. Se sometieron 20 µg del ARN total preparado a electroforesis por medio de gel desnaturalizado con una concentración de agarosa del 1% que contenía formaldehído según procedimientos convencionales, y posteriormente se transfirió a Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, EEUU) durante la noche por un procedimiento de transferencia capilar. El filtro con ARN transferido se irradió con UV usando un Stratalinker (STRATAGENE, EEUU) para la inmovilización del ARN transferido, se lavó con 2 X SSC, se secó al aire y a continuación se almacenó a temperatura ambiente hasta el uso.

ii) *Preparación del ADN molde para la sonda*

Se usaron 5 µg del ARN total preparado de un ratón (ratón N° 1) para sintetizar el ADNc en 20 µl de una disolución de reacción (Tris (pH 8,3) 50 mM, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM, (dT)18 25 g/ml, dNTP 2,5 mM, 200 unidades de transcriptasa inversa MMLV (TOYOBO, Japón)) a 37°C durante 1 hora y a continuación se trató la disolución de reacción a 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. El ADNc sintetizado se diluyó 5 veces y a continuación se usó en la siguiente reacción.

Los siguientes cebadores se sintetizaron a partir de las secuencias registradas en GenBank (NCBI, EEUU), y a continuación se utilizaron para la reacción de PCR:

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de GAPDH de ratón

mGAPDHFw TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC (ID. SEC. N° 30)

mGAPDHRV CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC (ID. SEC. N° 31)

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de Npt-1 de ratón

mNpt1FW GTAAAGAACCCTGTGTATTCC (ID. SEC. N° 32)

mNpt1RV CTGCCTTAAGAAATCCATAAT (ID. SEC. N° 33)

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de NaPi-7 de ratón

mNaPi7FW GAGGAATCACAGTCTCATTC (ID. SEC. N° 34)

nNaPi7RV CTTGGGGAGGTGCCCCGGGAC (ID. SEC. N° 35)

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de NaPi-2b de ratón

mNaPi2bFW TCCCTCTTAGAAGACAATACA (ID. SEC. N° 36)

mNaPi2bRV GTGTTTAAAGGCAGTATTACA (ID. SEC. N° 37)

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de vitamina D1 $\alpha$  hidroxilasa de ratón

m1aOHasaFW CAGACAGAGACATCCGTGTAG (ID. SEC. Nº 38)

m1aOHasaRV CCACATGGTCCAGGTTTCAGTC (ID. SEC. Nº 39)

Cebadores sintéticos para la obtención de ADNc de vitamina D 24 hidroxilasa de ratón

m24OhasaFW GACGGTGAGACTCGGAACGT (ID. SEC. Nº 40)

m24OhasaRV TCCGGAAAATCTGGCCATAC (ID. SEC. Nº 41)

Se preparó una disolución de reacción según el manual adjunto del fabricante de TakaLa La-Taq (TAKARA SHU-ZO, Japón). Se añadió 1  $\mu$ l de ADNc y 10 pmol de cada cebador como se describió anteriormente a 50 ml de la disolución de reacción. Se mantuvo la disolución a 94°C durante 1 minuto y a continuación se realizó la amplificación durante 40 ciclos, estando cada ciclo de incubación constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. A continuación se separaron las bandas amplificadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y posteriormente se recogieron los fragmentos diana usando Gene Clean II (Bio101, EEUU). Con respecto a GAPDH, se preparó la sonda marcada con <sup>32</sup>P usando como molde el fragmento obtenido mediante el procedimiento y un kit Megaprimer Labeling (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) y a continuación se utilizó para la siguiente hibridación. Con respecto a otros genes, los fragmentos de PCR obtenidos se incorporaron en el vector pGEM-T (Promega, EEUU) y a continuación se introdujeron en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se añadieron los cebadores T7 (ID. SEC. Nº 42) y SP6 (ID. SEC. Nº 43), 10 pmol de cada uno, a una disolución de reacción de PCR, a continuación se añadió la *Escherichia coli* transformada a la misma. Después de mantener la disolución a 94°C durante 10 minutos, se realizó la amplificación durante 40 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. La disolución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para separar las bandas amplificadas, a continuación se extrajo un fragmento diana usando Gene Clean II (Bio 101, EEUU).

T7 TAATACGACTCACTATAGGG (ID. SEC. Nº 42)

SP6 GATTTAGGTGACACTATAG (ID. SEC. Nº 43)

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados obtenidos por los procedimientos anteriores se determinaron usando el secuenciador de ADN ABI377 (PE Applied System, EEUU), confirmando de ese modo que se había obtenido cada fragmento diana. Los fragmentos de ADN obtenidos de ese modo se marcaron con <sup>32</sup>P usando un kit Megaprimer Labeling (Amersham Pharmacia, EEUU) y a continuación se usaron como sondas en la siguiente hibridación.

### iii) Hibridación

La hibridación se realizó según el manual adjunto del fabricante usando la disolución de hibridación ExpressHyb (CLONTECH, EEUU) o disolución de hibridación Perfecthyb (TOYOBO, Japón). Tras la hibridación y el lavado, se expuso una placa de obtención de imágenes (FUJI FILM, Japón) durante 30 minutos durante la noche, a continuación se realizó el análisis usando el analizador de imágenes BAS2000 (FUJI FILM, Japón) (Fig. 9A a C). Además, se midieron las intensidades de las señales de las bandas diana. Después de corregir las intensidades de las señales de cada gen por la intensidad de señal de GAPDH, se obtuvo la relación de los valores medios del grupo sin carga tumoral (ratones Nº 1 a 4) al grupo con carga tumoral (ratones Nº 5 a 10). La siguiente Tabla 5 muestra las relaciones. Como los tumores se desarrollaron en el grupo trasplantado con CHO-OST311H, los niveles de ARNm de NaPi-7, el transportador de fosfato tipo II en el riñón, disminuyeron significativamente, mientras que NPT-1, el transportador de fosfato tipo I en el riñón, no cambió en gran medida. Además, se observó una disminución significativa en el ARNm de NaPi-IIb, el transportador de fosfato en el intestino delgado. En cambio, para las enzimas metabólicas renales de la vitamina D, ambos ARNm aumentaron, el de 25-hidroxivitamina D-1- $\alpha$ -hidroxilasa (1 $\alpha$ OHasa) y el de 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (24OHasa).

TABLA 5

*Relación de cada ARNm del grupo con carga tumoral al grupo sin carga tumoral*

| (Grupo con carga tumoral/grupo sin carga tumoral) |      |
|---------------------------------------------------|------|
| NPT-1                                             | 0,88 |
| NaPi-7                                            | 0,50 |
| NaPi-2b                                           | 0,23 |
| Vitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilasa                | 3,90 |
| Vitamina D 24-hidroxilasa                         | 1,94 |

*(8) Medición de los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D del suero*

Se recogieron los sueros de los ratones del grupo de control y los sueros de los ratones del grupo OST311H en cantidades equivalentes para cada individuo en los días 44 y 46 tras el trasplante del tumor. Los sueros recogidos de cada grupo (cantidad total de cada uno 0,5 ml) se enviaron a los laboratorios Kagaku Bio-Chemical Laboratories de Mitsubishi, Inc, y a continuación se midieron los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D contenidos en los sueros de manera similar al examen clínico. Como resultado, los niveles séricos de 1,25-dihidroxivitamina del grupo de control y del grupo OST311 fueron 28,0 pg/ml y 23,9 pg/ml, respectivamente. Como se describió anteriormente, los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D no aumentaron incluso cuando se observó hipofosfatemia e hipocalcemia. Este resultado sugiere claramente que el metabolismo de la vitamina D se vio afectado como resultado del efecto de OST311.

*(9) Radiografía suave de los fémures*

Los ratones sin carga tumoral y los ratones trasplantados con células CHO ras clon-1, CHO-OST190H o CHO-OST311H se sacrificaron los días 44 a 46 después del trasplante, se recogieron los fémures y a continuación se fijaron los fémures en formalina neutra al 4% durante 3 días. Posteriormente, se eliminó el tejido blando que rodeaba el hueso. Se seleccionaron dos individuos de cada grupo de manera aleatoria y a continuación se irradiaron con rayos X usando un sistema de radiografía  $\mu$ FX-100 (FUJI FILM, Japón) bajo las siguientes condiciones: voltaje del tubo de rayos X de 25 kV, corriente del tubo de rayos X de 0,1 mA y tiempo de exposición de 5 segundos, a continuación se expusieron a una placa de obtención de imágenes. Los resultados se muestran en la Fig. 10. En el grupo CHO-OST311H se observó disminución de las trabéculas óseas del hueso cortical.

*Ejemplo 12*

*Análisis de homología de las secuencias de nucleótidos y la región genómica de OST311*

Usando al menos una parte de la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 2 y de la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1, pueden buscarse moléculas correspondientes a OST311 de diversas especies. Se realizó la búsqueda en las bases de datos de secuencias del genoma de ratón usando una secuencia de nucleótidos parcial de ID. SEC. N° 1, de este modo, se encontró una secuencia que tenía alta homología con OST311 en la secuencia del cromosoma 6 de ratón registrado en Genbank bajo el número del acceso AC0 15538. En ID. SEC. N° 10 se muestra una secuencia de aminoácidos de un polipéptido parcial de OST311 de ratón obtenida a partir de la secuencia, y en ID. SEC. N° 9 se muestra una secuencia de nucleótidos correspondiente a una secuencia parcial de ADNc. La figura 6 muestra los resultados de la comparación de la homología de aminoácidos entre el polipéptido OST311 humano y el polipéptido OST311 de ratón. Como se muestra en el Ejemplo 11, resulta claro que el polipéptido OST311 que tiene la secuencia de aminoácidos humana tenía evidentes actividades biológicas en los ratones. Estos resultados sugieren que la actividad puede mantenerse fácilmente, incluso cuando estos aminoácidos se sustituyen, delecionan o insertan dentro de una región que tiene baja homología en la secuencia de aminoácidos según se muestra en la Figura 6.

Se comparó la secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. N° 1 y BAC RPC111-388F6 de 12p13 humano (Número de referencia AC008012) que se había reconocido usando la base de datos para tener una región que coincidiera con una parte de ID. SEC. N° 1, de modo que se determinó la secuencia de la región que codifica OST311. La secuencia de nucleótidos vecina al gen OST311 se muestra en ID. SEC. N° 11. La caja TATAA está presente entre los nucleótidos N° 498 a 502 de ID. SEC. N° 11. La primera secuencia que coincide con la secuencia del ADNc (ID. SEC. N° 1) que han determinado los solicitantes, comienza a partir del nucleótido N° 1713 de ID. SEC. N° 11 y continúa hasta el nucleótido N° 2057. La siguiente sección coincidente con la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 se extiende desde el nucleótido N° 8732 hasta el 8833 de ID. SEC. N° 11. Se considera que esta sección es el exón 2. La última sección que coincide con la secuencia de nucleótidos representada por ID. SEC. N° 1 comienza

a partir del nucleótido N° 10644 y finaliza en el nucleótido N° 12966 de ID. SEC. N° 11. Puede considerarse que la secuencia que se extiende desde el nucleótido N° 498 hasta el 12966 de ID. SEC. N° 11 es al menos una parte del gen que codifica OST311. Además, resultó evidente que la secuencia STS registrada en Genbank bajo el número de referencia G19259 está presente entre el exón 1 y el exón 2. OST311 está presente en la región del locus 12p13. Según Econs, M.J. y col., J. Clin. Invest. 100: 2653-2657, 1997, se deduce que el gen responsable del raquitismo autosómico resistente a la vitamina D (ADHR) está presente dentro de una región de 18 cM entre D12S100 y D12S397, los marcadores de microsatélites de 12p13 (en particular, aproximadamente dentro de una región de 10 cM entre D12S314 y D12S397), de un resultado del análisis de la cadena. Los solicitantes evaluaron las localizaciones físicas del gen de OST311 y del anterior marcador de microsatélites en el cromosoma 12. Como resultado, D12S100 y D12S314 estaban en una región de 4602 a 6129 kb, OST311 estaba en una región de 8958 a 9129 kb y D12S397 estaba en una región de 16280 a 16537 kb. Basándose en estos resultados y en la fuerte actividad de regulación del metabolismo del fosfato de OST311, se encontró que OST311 es el gen responsable del ADHR.

### 15 Ejemplo 13

#### *Experimento a corto plazo de trasplante de células CHO-OST311H en ratones atímicos*

Las células CHO-OST311H se trasplantaron por vía subcutánea en el dorso de los ratones atímicos (BALB/c, machos, de 6 semanas de edad). En los días 2 y 6 después del trasplante, se midieron los niveles de fosfato y de calcio del suero y se examinó el efecto del OST311 recombinante en el corto plazo. De manera similar se utilizaron células CHO ras clon-1, como control para este experimento de trasplante.

#### (1) *Trasplante de las células CHO*

De una manera similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 11 (1), se trasplantaron  $2 \times 10^7$  células CHO-OST311H y  $2 \times 10^7$  células CHO ras clon-1 por vía subcutánea, cada uno, en ratones atímicos (n = 6 cada grupo). Además, se trasplantaron cantidades equivalentes de PBS de manera similar por vía subcutánea (n = 6). Se crió cada grupo de 6 ratones atímicos en una jaula de plástico y con acceso a alimentos sólidos CE-2 (CLEA JAPAN, Japón) y agua de grifo *ad libitum*. A los 6 días después del trasplante, no se observó desarrollo significativo de tumores.

#### (2) *Medición de los niveles de fosfato y de calcio del suero en el día 2 después del trasplante de células*

Al día siguiente del trasplante celular, se recogió sangre de la cavidad del orbital de los ratones bajo anestesia usando dietiléter. La sangre periférica se sometió a separación del suero usando Microtainer (Beckton Dickinson, EEUU). Se midieron los niveles de fosfato sérico usando P-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón) y se midieron los niveles de calcio sérico usando calcium-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón). Como se muestra en la Figura 11A, comparado con el grupo al que se le administró PBS y con el grupo trasplantado con células CHO ras clon-1, se observaron disminuciones significativas en los niveles de fosfato sérico en todos los casos del grupo trasplantado con células CHO-OST311H. Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de calcio sérico. Estos resultados mostraron claramente que OST311 sólo provocó disminuciones en los niveles de fosfato sérico en el día 2 tras la administración.

#### (3) *Medición de los niveles de fosfato y de calcio del suero en el día 6 después del trasplante celular*

En el día 6 después del trasplante celular, se recogió sangre de los corazones de los ratones bajo anestesia usando dietiléter. Como se describió anteriormente, se midieron los niveles de fosfato y de calcio del suero de cada grupo. Como se muestra en la Figura 11B, similar a los resultados en el día 2 después del trasplante, comparado con el grupo al que se le administró PBS y con el grupo trasplantado con células CHO clon-1 ras, se observaron disminuciones significativas en los niveles de fosfato sérico en todos los casos del grupo trasplantado con células CHO-OST311H. En cambio, se observaron ligeras disminuciones en los niveles de calcio del suero en el grupo trasplantado con células CHO-OST311H.

### 55 Ejemplo 14

#### *Purificación del OST311 recombinante*

Se dejaron crecer células CHO-OST311H en medio MEM $\alpha$  que contenía FCS al 10% dentro de un matraz de cultivo de 225 cm<sup>2</sup> (CORNING, EEUU) a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 100%. Cuando las células crecieron hasta cubrir aproximadamente el 80% del área del matraz, se reemplazó el medio con 50 ml de un medio sin suero, CHO-S-SFM II (LIFE TECHNOLOGY, EEUU) y, 48 horas más tarde, se recogió el medio acondicionado. El OST311 recombinante se purificó por medio del siguiente procedimiento usando en total 1.000 ml del medio acondicionado obtenido de esta manera.

Se centrifugaron 1000 ml del medio acondicionado a 16.200 g durante 15 minutos a 4°C durante eliminar las células suspendidas, a continuación se sometió el sobrenadante a electroforesis en SP-sepharose FF (Amersham Pharmacia, EEUU) empaquetada en una columna de vidrio (30 milímetros de diámetro interno x 200 milímetros en longitud).

La fracción que había pasado a través de la columna se adsorbió a Talon Superflow (resina de quelato metálico, CLONTECH, EEUU). El adsorbido no específico se eliminó usando un tampón de lavado constituido por tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,6) y NaCl 0,3 M, y a continuación se realizó la elución usando tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,7) e imidazol 0,2 M. El panel derecho en la Fig. 12 muestra las fracciones de elución según se detectaron por transferencia Western usando un anticuerpo anti-His6 (INVITROGEN, EEUU). Estas fracciones contenían un polipéptido parcial (ID. SEC. N° 8) constituido por los residuos de los aminoácidos N° 180, Ser, al N° 251, Ile, descrito en el Ejemplo 9. Por otra parte, la proteína anterior contenida en el medio acondicionado adsorbido a SP-sepharose FF se eluyó en un tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,7) usando un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 0,7 M. El panel izquierdo en la Fig. 12 muestra las fracciones de elución según se detectaron por transferencia Western usando un anticuerpo anti-His6 (INVITROGEN, EEUU). Estas fracciones eluidas aproximadamente en NaCl 0,3 M contenían un polipéptido parcial (ID. SEC. N° 4) constituido por los residuos de los aminoácidos N° 25, Tyr, al N° 251, Ile, descrito en el Ejemplo 9. Además el panel del centro en la Fig. 12 muestra las fracciones de elución según se detectaron por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal (311-314) preparado usando el péptido parcial OST311 (ID. SEC. N° 29) descrito en el Ejemplo 10. Estas fracciones eluidas a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,4 M contenían un péptido parcial (ID. SEC. N° 6) que comprendía los residuos de los aminoácidos N° 25, Tyr, al N° 179, Arg, descrito en el Ejemplo 9. Por consiguiente, las fracciones que contenían tres tipos de péptido parcial de OST311, específicamente, ID. SEC. N° 4 (a continuación, en el presente documento, denominado 311: 25-251), ID. SEC. N° 6 (a continuación, en el presente documento, denominado 311: 25-179) y ID. SEC. N° 8 (a continuación, en el presente documento, denominado 311:180-251) se purificaron y se separaron, y a continuación se concentraron usando una columna VIVASPIN con un peso molecular de 10.000 (Sartorius, EEUU) para la ultrafiltración, seguido por el reemplazo con un disolvente constituido por 1 ml de HEPES 5 mM (pH 6,9) y NaCl 0,1 M.

#### Ejemplo 15

##### *Análisis histológico de sección de hueso no desmineralizado*

Cuando se sacrificaron los ratones trasplantados con células CHO-OST311H y los ratones sin carga tumoral preparados en el Ejemplo 11, se les extirpó los fémures y las tibias derechos, dejando intacta la conexión en la articulación de la rodilla. Inmediatamente después de cortar los ejes de las tibias y los ejes de los fémures, se almacenaron fémures y tibias en formalina neutra enfriada con hielo previamente preparada. Por consiguiente, se prepararon los especímenes no desmineralizados. El procedimiento para preparar los especímenes no mineralizados se describen a continuación.

Los tejidos óseos se sometieron a tinción previa con tinción para huesos Villanueva durante 3 a 7 días. Los tejidos se deshidrataron a través de una serie de disoluciones de alcohol de grados crecientes, y a continuación el disolvente se reemplazó con acetona. Después de la acetona, se aplicó el monómero y las muestras de tejido se incluyeron en resina. Se usó resina de metacrilato de metilo (MMA) para incluir las muestras. Las muestras de tejido se colocaron en una incubadora a aproximadamente 35°C durante la completa polimerización. En este momento, los tejidos se mantuvieron suficientemente incluidos dentro de la resina por medio de la adición apropiada de MMA. La MMA utilizada en el presente documento para incluir las muestras se preparó añadiendo y disolviendo totalmente 40 g de polímero de MMA (Wako Pure Chemical Industries, Japón) en 100 ml de monómero de MMA (Wako Pure Chemical Industries, Japón), y a continuación añadiendo y disolviendo totalmente el peróxido de benzofl (Nacalai Tesque, Japón) a una tasa de 1 g por disolución. Se prepararon los especímenes para tibia. Para poder observar el hueso esponjoso de la tibia, se recortó la sección frontal, y a continuación se prepararon 4 muestras de sección frontal de 4 µm de espesor usando un micrótopo para tejidos duros (tipo RM2065 super cut, Leica). Se llevó a cabo una tinción posterior con Villanueva-Goldner. Las secciones así obtenidas se aclararon en xileno, y a continuación se sellaron usando CLEAR SEAL (MARUTO, Japón) y ONE LIGHT (MARUTO, Japón).

En la Fig. 13 se muestran las imágenes microscópicas de las secciones. Se observó la anchura aumentada de la placa de crecimiento en los ratones con carga tumoral trasplantados con células CHO-OST311H, comparados con el grupo de control. Además, se observaron el osteoide aumentado significativamente y el área mineralizada disminuida en las metafisis. No hubo evidencia de osteítis fibrosas, y el hueso recogido del ratón con carga tumoral trasplantado con células CHO-OST311 exhibió características típicas de osteomalacia.

#### Ejemplo 16

##### *Examen del metabolismo de la vitamina D en un estadio temprano tras el trasplante con células CHO-OST311H*

Para examinar el efecto de OST311 en el metabolismo de la vitamina D, se realizó un experimento de trasplante de células CHO-OST311H en ratones atímicos (de 6 semanas de edad, BALB/c, machos) de manera similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 13. Se establecieron dos grupos de control experimentales constituidos por un grupo que estaba trasplantado de manera similar con células CHO ras clon-1, y un grupo al que se le administró PBS en una dosis equivalente con disolución de suspensión celular y se utilizaron para la comparación. Cada grupo constituido por 6 ratones se alojó en una jaula de plástico con acceso libre al agua de grifo y a los alimentos sólidos CE2 que contenían fosfato inorgánico al 1,03% y calcio al 1,18% (CLEA JAPAN, Japón). Se examinaron las fluctuaciones en los niveles séricos de 1,25-hidroxivitamina D y los cambios en la expresión de los grupos de enzimas que metabolizan la vitamina D en los días 1, 2, 3 y 6 tras el trasplante.

(1) *Medición de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D del suero*

En los días 1, 2, 3 y 6 tras el trasplante celular, se recogió sangre del corazón de los ratones del grupo al que se le administró PBS, del grupo trasplantado con células CHO ras clon-1, y el grupo trasplantado con células CHO-OST311H, respectivamente bajo anestesia con dietiléter, y a continuación se separaron los sueros usando un Microtainer (Beckton Dickinson, EEUU). Se mezclaron juntos volúmenes equivalentes de los sueros recogidos de cada ratón para tener un volumen total de 0,25 ml por grupo. Los niveles de 1,25-dihidroxitamina D contenidos en los mismos se midieron usando el kit 1,25(OH) 2D RIA, "TFB" (TFB, Japón). Como resultado, según se muestra en la Tabla 6, ya se observaban disminuciones significativas de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D en el día 1 tras el trasplante en el grupo trasplantado con células CHO-OST311H, comparado con el grupo al que se le administró PBS y con el grupo trasplantado con células CHO ras clon-1. También se observó este efecto de disminución en los días 2, 3 y 6 tras el trasplante. Estos resultados fueron coherentes con disminuciones en los niveles de 1,25-dihidroxitamina D en suero, que son un típico hallazgo clínico para la osteomalacia inducida por tumores.

TABLA 6

*Niveles de 1,25-dihidroxitamina D del suero en ratones trasplantados con células*

| Días tras el trasplante                                       | 1     | 2     | 3     | 6     |
|---------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Grupo al que se le administró PBS<br>(pmol/l) n=5             | 338   | 164,3 | 164,5 | 273,7 |
| Días tras el trasplante                                       | 1     | 2     | 3     | 6     |
| Grupo trasplantado con células CHO ras clon-1<br>(pmol/l) n=6 | 271,9 | 178,3 | 182,9 | 184,6 |
| Grupo trasplantado con células CHO-OST311H<br>(pmol/l) n=6    | 46,7  | 36,3  | 34,5  | 49,1  |

(2) *Análisis de la expresión de los genes de enzimas que metabolizan la vitamina D en el riñón*

Para estudiar si el efecto anterior de disminución de la 1,25-dihidroxitamina D se debía a fluctuaciones en el gen de la 25-hidroxitamina D-1- $\alpha$ -hidroxilasa (1 $\alpha$ OHase) o en el gen de la 25-hidroxitamina D-24-hidroxilasa (24OHase), se seleccionaron en el día 3 después del trasplante, 3 ó 4 ratones de manera aleatoria de cada grupo: del grupo al que se le administró PBS, del grupo trasplantado con células CHO ras clon-1 y del grupo trasplantado con células CHO-OST311H. Se extirparon los riñones, los ARN totales se prepararon según los procedimientos descritos en el Ejemplo 11 (7), y a continuación se llevó a cabo la transferencia Northern usando las sondas descritas en el mismo. La figura 14 muestra los resultados. Se observó que los niveles de expresión del ARNm del gen 1 $\alpha$ OHase estaban significativamente atenuados en el grupo trasplantado con células CHO-OST311H, comparado con el grupo al que se le administró PBS y con el grupo trasplantado con células CHO ras clon-1. Este resultado sugiere una posibilidad de que OST311 suprima directa o indirectamente la expresión de este gen, para suprimir la biosíntesis de la 1,25-dihidroxitamina D sérica. Por otra parte, los niveles de expresión del ARNm del gen 24OHase aumentaron significativamente en el grupo trasplantado con células CHO-OST311H, comparado con el grupo al que se le administró PBS y con el grupo trasplantado con células CHO ras clon-1. Este resultado sugiere una posibilidad de que OST311 aumente directamente o indirectamente la expresión de este gen, para promover la inactivación de la 1,25-dihidroxitamina D sérica.

En el Ejemplo 11 (8), no se observó diferencia significativa en los niveles de 1,25-dihidroxitamina D sérica en los días 44 y 46 tras el trasplante, comparado con el grupo de control. Otro resultado fue diferente del resultado en este ejemplo en que los niveles de expresión del ARNm de la 1 $\alpha$ OHase tendieron a aumentar. Al menos una posible explicación para la diferencia se debe al efecto de las hormonas paratiroides del suero, descrito en el Ejemplo 17.

## Ejemplo 17

*Examen de los niveles de la hormona paratiroidea del suero en un estadio temprano tras el trasplante con células CHO-OST311H*

Se mezclaron entre sí volúmenes equivalentes de los sueros recogidos de cada ratón en los días 1, 2, 3, 6 y 45 tras el trasplante con células CHO descrito en el Ejemplo 11, 13 y 16, para tener un volumen total de 0,15 ml. A continuación, se midieron los niveles de la hormona paratiroidea del suero usando un kit RAT PTH IRMA (Nihon Medi-Physics, Japón) según el manual adjunto del fabricante. Como se muestra en la Tabla 7, se observaron niveles

significativamente aumentados de hormona paratiroidea sérica en el grupo trasplantado con células CHO-OST311H, y la diferencia fue significativa en el día 45 tras el trasplante.

TABLA 7

*Niveles de hormona paratiroidea en ratones trasplantados con células*

| Días tras el trasplante                                                                                           | 1    | 2    | 3    | 6    | 45                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|--------------------|
| Grupo al que se le administró PBS<br>(pg/ml) n=5                                                                  | 45,2 | 23,8 | 28,2 | 19,7 | <sup>1</sup> 41,9  |
| Grupo trasplantado con células CHO ras clon-1<br>(pg/ml) n=6                                                      | 15,8 | 26,6 | 15,7 | 13,8 | <sup>2</sup> 40,4  |
| Grupo trasplantado con células CHO-OST311H<br>(pg/ml) n=6                                                         | 13,8 | 20,6 | 44   | 57,8 | <sup>3</sup> 211,7 |
| <sup>1</sup> Valor medido cuando se usaron ratones sin carga tumoral (n=6). <sup>2</sup> n=10. <sup>3</sup> n=12. |      |      |      |      |                    |

#### Ejemplo 18

*Experimento de administración de células CHO que producen la proteína de longitud total OST311H recombinante a ratones normales*

Para estudiar el efecto de las células CHO que producen la proteína de longitud total OST311H recombinante en ratones normales (BALB/c, machos, de 6 semanas de edad), se purificó parcialmente un polipéptido que tiene un marcador de histidina añadido al extremo C terminal del 25º residuo aminoácido, Tyr, al 251º Ile (ID. SEC. Nº 4) mediante el procedimiento de purificación descrito en el Ejemplo 14 (1). Esta fracción purificada se administró por vía intraperitoneal a ratones normales a razón de 0,1 ml por administración. Se asumió que esta fracción purificada contenía aproximadamente 0,15 a 0,75 µg de OST311 recombinante, basándose en la intensidad de fluorescencia obtenida por medio de transferencia Western. De manera similar al Ejemplo 14, se administró por vía intraperitoneal 0,1 ml de un disolvente (tampón HEPES 5 mM/NaCl 0,1 M, pH = 7,0) al grupo de control. El grupo al que se le administró OST311 y el grupo de control estaban constituidos respectivamente por cinco ratones. Cada grupo de 5 ratones se alojó en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón) que contenía fosfato inorgánico al 1,03% y calcio al 1,18%.

#### Experimento 1

El esquema del experimento se muestra en la Fig. 15A. Se realizaron otras administraciones a las 5, 10, 23, 28 y 33 horas después de la 1ª administración intraperitoneal. De esa manera, la administración intraperitoneal se llevó a cabo 6 veces en total. Posteriormente, se recogió sangre de la cavidad orbital usando capilares de vidrio a las 36, 47 y 71 horas después de la 1ª administración intraperitoneal, y a continuación se separaron los sueros usando un Microtainer (Beckton Dickinson, EEUU).

Los niveles de fosfato y de calcio en los sueros obtenidos de esta manera se determinaron usando P-test Wako o calcium-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Japón) según el manual adjunto del fabricante. De esta manera, como se muestra en la Fig. 15B, se observaron efectos de una disminución significativa en los niveles de fosfato sérico (prueba t  $**p < 0,001$ ,  $*p < 0,01$ ) en el grupo al que se le administró OST311 a las 36 horas después de la 1ª administración. Además, este efecto se mantuvo también a las 11 horas tras este punto temporal (47 horas después de la 1ª administración). Por otra parte, esta actividad desapareció 71 horas después de la 1ª administración (38 horas tras la administración final). Además, no se hallaron cambios significativos en los niveles de calcio sérico en ningún momento (Fig. 15C).

#### Experimento 2

El esquema del experimento se muestra en la Fig. 16A. Se realizaron otras administraciones a las 5 y 11 horas después de la 1ª administración intraperitoneal. De esta manera, la administración intraperitoneal se realizó 3 veces en total. Posteriormente, se recogió sangre de la cavidad orbital usando capilares de vidrio a las 13 y 24 horas después de la 1ª administración intraperitoneal, y a continuación se separaron los sueros usando un Microtainer (Beckton Dickinson, EEUU). Los niveles de fosfato y de calcio en los sueros obtenidos de esta manera se midieron respectivamente usando la prueba P-test Wako y calcium-test (Wako Pure Chemical Industries, Japón) según el manual adjunto del fabricante. De esta manera, como se muestra en la Fig. 16B, se observaron efectos de una disminución significativa en los niveles de fosfato sérico (prueba t  $**p < 0,05$ ,  $*p < 0,01$ ) en el grupo al que se le administró OST311 a las 13 horas después

de la 1ª administración. Además, este efecto se mantuvo también a las 11 horas tras este punto temporal. Además, no se hallaron cambios significativos en los niveles de calcio sérico en ningún momento (Fig. 16C).

Los resultados de los Experimentos 1 y 2 revelaron que la administración intraperitoneal en ratones normales con la fracción integral de células CHO que producen proteína OST311H recombinante induce hipofosfatemia, también se observó el efecto de la disminución en los niveles de fosfato sérico a las 13 horas tras la primera administración, y la actividad se mantuvo al menos durante 11 horas después de interrumpir la administración.

## Ejemplo 19

### Introducción de mutación de aminoácidos en OST311

Como se describió en el Ejemplo 9, se mostró que una parte de OST311 recombinante producida por células CHO-OST311H se escindió durante su proceso de secreción por un polipéptido (ID. SEC. N° 6) que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos desde la 25ª Tyr hasta la 179ª Arg y un polipéptido (ID. SEC. N° 8) que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos desde la 180ª Ser hasta la 251ª Ile.

Esta escisión puede deberse a una proteasa que reconoce un motivo constituido por la secuencia RXXR o la secuencia RRRXR localizado inmediatamente antes del 180º residuo aminoácido Ser. Cuando el recombinante de longitud total se administra en un organismo vivo, se considera que el recombinante tiene una posibilidad de experimentar esta escisión o degradación similar a esta escisión. Por consiguiente, se preparó el gen OST311RQ que codifica una secuencia que puede sustituir los residuos de los aminoácidos 176º Arg y 179º Arg con Gln para introducir la mutación.

#### (1) Preparación del plásmido OST311/pCAGGS

La PCR se realizó por medio de LA Taq polimerasa (TAKARA SHUZO, Japón) usando el plásmido OST311H/pcDNA3.1 como molde, y 311F1EcoRI (ID. SEC. N° 22) y 311LNNot (ID. SEC. N° 44) como cebadores. Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, la reacción se realizó durante 25 ciclos, cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Tras la reacción, se generaron extremos romos en los productos de PCR usando polimerasa de ADN T4 (Roche, Suiza), y a continuación se realizó el tratamiento con fenol-cloroformo para inactivar la enzima. El ADN se precipitó usando etanol, y a continuación los extremos del ADN se fosforilaron usando polinucleótido cinasa (Roche, Suiza). Los fragmentos de ADN diana se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y posteriormente se recogieron usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El vector del plásmido pCAGGS (Niwa H, y col., Gene. 15 de diciembre de 1991; 108(2): 193-199.) se digirió con EcoRI, y a continuación se generaron extremos romos usando fragmentos Klenow (Roche, Suiza). Posteriormente, se realizó la desfosforilación de los extremos de ADN usando fosfatasa alcalina de intestino delgado de ternera (TAKARA SHUZO, Japón). Los fragmentos de ADN diana se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y a continuación se recogieron usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El ADNc de OST311 obtenido de esa manera se unió al plásmido predigerido pCAGGS usando un kit de unión de ADN (versión 2) (TAKARA SHUZO, Japón) según el manual adjunto del fabricante. El producto se introdujo en la cepa DH5α de *Escherichia coli* para clonación, de modo que se obtuvo el plásmido relevante. Este plásmido de ADN se usó para preparar el gen OST311RQH.

311LNNot: ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA (ID. SEC. N° 44)

#### (2) Preparación del gen OST311RQH

Se sintetizaron los siguientes cebadores.

OST311ME1: ATGAATTCCACCATGTTGGGGGCCCGCCTCAGG (ID. SEC. N° 45)

OST311HNt: ATGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGGATGAACTTGGCGAAGGG  
(ID. SEC. N° 46)

OST311RQF: ATACCACGGCAGCACACCCAGAGCGCCGAG (ID. SEC. N° 47)

OST311RQR: CTCGGCGCTCTGGGTGTGCTGCCGTGGTAT (ID. SEC. N° 48)

OST311ME1 es un cebador directo que es una sección que contiene la metionina de iniciación de OST311, OST311HNt es un cebador inverso que añade 6 histidinas al extremo 3' terminal de OST311, OST311RQF y OST311RQR son un cebador directo y un cebador inverso para introducir mutaciones, sustituyendo respectivamente las 52ª y 536ª guaninas (correspondientes a las 659ª y 668ª guaninas en ID. SEC. N° 1) en la región codificadora del ADNc de OST311 con adeninas, para sustituir las argininas en los aminoácidos N° 176 y 179 con glutaminas. Se prepararon 2 tipos de disoluciones de reacción de 20 µl cada una según el manual adjunto del fabricante usando polimerasa de ADN pfu (Promega, EEUU). Por una parte, se usaron OST311ME1 y OST311RQR como cebadores a

una concentración final de 0,2  $\mu$ M, y se usaron 10 ng del vector de expresión de OST311 descrito en el Ejemplo 6 (1) como molde. Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, se realizó la reacción de PCR durante 25 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Por otra parte, se usaron OST311RQF y OST311HNt como cebadores a una concentración final de 0,2  $\mu$ M, y se utilizaron 10 ng del plásmido OST311/pCAGGS como molde. Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, se realizó la reacción de PCR durante 35 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Los dos tipos anteriores de productos de reacción se diluyeron diez veces respectivamente, y a continuación se añadió 1  $\mu$ l de cada disolución a 50  $\mu$ l de una disolución de reacción preparada usando LA Taq polimerasa (TAKARA SHUZO, Japón) según el manual adjunto del fabricante. Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, se realizó la reacción de PCR usando LA Taq polimerasa (TAKARA SHUZO, Japón) y OST311ME1 y OST311HNt como cebadores a una concentración final de 0,2  $\mu$ M durante 25 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Tras la reacción de PCR, se mantuvo la disolución a 72°C durante 7 minutos. El producto de reacción obtenido de esta manera se sometió al tratamiento con fenol/cloroformo, a la desproteinización, precipitación con etanol, y a continuación a la digestión con *EcoR* I y *Not* I. Se separó un fragmento de ADN de aproximadamente 800 pb por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, y a continuación se recogió usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El fragmento de ADN obtenido de esa manera se insertó en el sitio de *EcoR* I, *Not* I de un vector, IRES-EGFP-pEAK8 que se había preparado uniendo un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) y proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) a un plásmido pEAK8 (EdgeBioSystems, EEUU), obteniendo de ese modo el plásmido OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8. El ADN del plásmido se preparó según los procedimientos convencionales, y a continuación la secuencia de nucleótidos se determinó usando secuenciador de ADN de fluorescencia ABI3700 (PE Applied Systems, EEUU), confirmando de ese modo que la secuencia codifica un polipéptido en el que las mutaciones pertinentes R176Q y R179Q están introducidas y la etiqueta de la histidina está añadida al extremo C terminal. El polipéptido codificado por este gen se denomina a continuación en el presente documento OST311RQH.

### (3) Aislamiento de las células CHO que expresan OST311RQH de manera estable

El plásmido OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 se introdujo en la célula CHO ras clon-1 usando Transfectam (Promega, EEUU) según el manual adjunto del fabricante. Las células resistentes al fármaco se seleccionaron en medio MEM $\alpha$  que contenía puromicina 5  $\mu$ g/ml y FCS al 10%. A continuación, se clasificaron las células con fuerte intensidad de fluorescencia de GFP (proteína fluorescente verde) usando FACS vantage (Beckton Dickinson, EEUU), y a continuación se clonaron. Cuando las células clonadas alcanzaron confluencia, el medio se reemplazó con medio DF sin suero (DMEM/F-12), y posteriormente se recogió el medio acondicionado 2 días después de la sustitución. Se adsorbieron 50  $\mu$ l del medio acondicionado al filtro Immobilon P (Millipore, EEUU) usando un sistema de filtro convertible de 96 pocillos (Lifetechoriental, EEUU). El filtro preparado se lavó con TBS y TTBS, y a continuación se sometió a bloqueo usando Blockace (Daiichi Pharmaceutal, Japón) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se dejó reaccionar el filtro durante 1 hora con anticuerpo monoclonal anti-His6 marcado con HRP (Invitrogen, EEUU) diluido 5000 veces con Blockace. Tras la reacción, se lavó el filtro con TTBS y TBS, y a continuación se realizó la detección de la señal usando ECL (Amersham Pharmacia, EEUU) según el manual adjunto del fabricante. Basándose en la intensidad de la señal, se seleccionó el clon CHO-OST311RQH de alta expresión.

### (4) Preparación del medio acondicionado de las células rápidas OST311RQH pEAK

Se inocularon células rápidas pEAK (EdgeBioSystems, EEUU) en 20 matraces para cultivo tisular (225 cm<sup>2</sup>, CORNING, EEUU). Se transfectaron 0,48 mg del plásmido OST311RQH/IRES-GFP/pEAK8 a las células por un procedimiento con fosfato de calcio según el manual adjunto del fabricante del sistema pEAK (EdgeBioSystems, EEUU). Las células se dejaron en reposo durante 4 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio de cada matraz con 50 ml de medio MEM $\alpha$  sin suero, las células se cultivaron durante 2 días a 37°C, y a continuación se recogió el medio acondicionado.

### (5) Confirmación de la expresión de OST311RQH recombinante

El medio acondicionado resultante de la expresión transitoria de los 2 tipos de clones celulares CHO-OST311RQH anteriores y de las células rápidas pEAK, 10  $\mu$ l de cada uno, se sometió a transferencia Western de la manera como se describió en el Ejemplo 6 (3), de modo que se examinó la presencia de OST311RQH recombinante en el sobrenadante del cultivo. Como anticuerpo de detección se usó el anticuerpo anti-His (extremo C terminal) (Invitrogen, EEUU). Por consiguiente, según se muestra en la Fig. 17, se observó una fuerte señal localizada en la misma posición con la banda de aproximadamente 32 kDa descrita en el Ejemplo 6 (3) para todos los sobrenadantes de los cultivos. Por otra parte, para todo el medio acondicionado, no se observó una señal de aproximadamente 10 kDa que estaba presente en el medio acondicionado de CHO-OST311H por medio de transferencia Western. Puede deducirse a partir de estos resultados que la introducción de las mutaciones R176Q y R179Q provocó la inhibición o la atenuación de la escisión del polipéptido que se predecía que iba a tener lugar en estas posiciones, de modo que la relación de la presencia del polipéptido (ID. SEC. N° 8) que tienen una secuencia desde los aminoácidos 180°, Ser, hasta 251°, Ile, disminuyó significativamente.

## Ejemplo 20

*Experimento de administración de OST311RQH recombinante a ratones normales*

Se obtuvo una fracción purificada que contenía aproximadamente 2,8 µg/ml de proteína OST311RQH recombinante a partir de 500 ml del sobrenadante de cultivo preparado en el Ejemplo 19 (5) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 14 (1). La fracción purificada se administró sucesivamente, 0,1 ml/administración, por vía intraperitoneal a ratones normales (BALB/c, machos, 6 semanas de edad), y a continuación se midieron los niveles de fosfato, calcio y 1,25-dihidroxivitamina D del suero. A un grupo de control se le administró de manera similar un vehículo (tampón HEPES 5 mM/NaCl 0,1 M, pH = 7,0), 0,1 ml a cada uno, por vía intraperitoneal. El grupo al que se le administró OST311RQH y el grupo de control estaban constituidos por 6 ratones, respectivamente de. Cada grupo de 6 ratones se alojó en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón) que contenía fosfato inorgánico al 1,03% y calcio al 1,18%.

Los protocolos experimentales se muestran en la Fig. 18A. Se realizaron otras administraciones a las 5, 10, 24, 29 y 34 horas tras la 1ª administración. De esta manera, se realizó la administración sucesivamente 6 veces en total. En el proceso de los procedimientos anteriores, bajo anestesia con dietiléter, se recogió sangre de la cavidad del orbital usando capilares de vidrio a las 24 horas tras la primera administración (inmediatamente antes de la 4ª administración) y se recogió sangre del corazón a las 48 horas tras la primera administración.

*(1) Medición de los niveles de fosfato y de calcio del suero*

Los niveles del fosfato sérico del suero recogidos a las 24 y 48 horas tras de la primera administración se midieron por el procedimiento descrito en el Ejemplo 14 (3). Como resultado, en todas las tomas de muestra de sangre, el grupo al que se le administró OST311RQH mostró significativa hipofosfatemia, como se muestra en la Fig. 18B (prueba t  $^{**}p < 0,01$ ,  $^{*}p < 0,05$ ). Por el contrario, no se observó fluctuación significativa en los niveles de calcio sérico (Fig. 18C).

*(2) Medición de los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D del suero*

Se mezclaron juntos volúmenes equivalentes de los sueros recogidos de cada ratón a las 48 horas tras la primera administración por cada grupo. A continuación, se midieron los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D sérica por el procedimiento descrito en el Ejemplo 16 (1). Como resultado, mientras que el grupo de control mostró 244,7 pmol/l, el grupo al que se le administró OST311RQH mostró una disminución significativa, 24,6 pmol/l.

## Ejemplo 21

*Experimento de trasplante de células CHO-OST311RQH*

Se llevó a cabo un experimento, en el que se trasplantaron células CHO-OST311RQH que expresan de manera estable OST311RQH como se estableció en el Ejemplo 19 (3) en ratones atímicos (7 semanas de edad, BALB/c-nude, machos, n=8) de manera similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 13. Las células CHO ras clon-1 se trasplantaron de manera similar como un grupo de control (n=6). Cada grupo de ratones atímicos se alojó en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón) que contenía fosfato inorgánico al 1,03% y calcio al 1,18%.

El día 2 tras el trasplante celular, se recogió sangre de la cavidad del orbital usando capilares de vidrio, y a continuación se midieron los niveles de calcio y fosfato del suero por un procedimiento similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 14 (3). Como se muestra en la Fig. 19A, se observó una disminución significativa en los niveles de fosfato sérico en el grupo trasplantado con células CHO-OST311RQH (prueba-t  $^{*}p < 0,001$ ), mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de calcio sérico (Fig. 19B)

## Ejemplo 22

*Preparación del anticuerpo policlonal anti-péptido parcial de OST311 (2)*

Se prepararon 4 tipos de péptidos parciales de OST311 (ID. SEC. N° 49 a 52) de la manera descrita en el Ejemplo 10. Se inmunizaron conejos con estos péptidos como antígenos, y a continuación se realizó la transferencia Western según el procedimiento descrito en el Ejemplo 6 (3) usando los antisueros resultantes, de modo que se detectó OST311H recombinante en el medio acondicionado sin suero de las células CHO-OST311H. La reacción del anticuerpo se realizó en una disolución, que se había preparado diluyendo los antisueros para cada péptido 250 veces con TTBS, a 4°C con agitación durante la noche. Tras lavar, se añadió el anticuerpo anti-conejo de cabra marcado con fosfatasa alcalina (DAKO, Dinamarca) a la disolución para unirse, y a continuación se detectó OST311 recombinante usando un kit de coloración de fosfatasa alcalina (BIO-RAD, EEUU) (Fig. 20).

*Péptidos parciales*

311-148: GMNPPPYSQFLSRNEC (ID. SEC. Nº 49)

311-170: CNTPI PRRHTR (ID. SEC. Nº 50)

311-180: SAEDDSERDPLNVLC (ID. SEC. Nº 51)

311-210: LPSAEDNSPMASDC (ID. SEC. Nº 52)

## Ejemplo 23

*Construcción del sistema ELISA para detectar la proteína OST311**(1) Purificación del anticuerpo del antisuero de conejo anti péptido parcial de OST311*

Se rellenó la columna desechable de cromatografía Econo-Pac (BIO-RAD, EEUU) con 3 ml de suspensión de proteína A sepharose 4FF (Amersham Pharmacia, EEUU), y a continuación se lavó con 10 ml de tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,3) y 20 ml de PBS. Se añadieron 2 tipos de antisuero de conejo descritos en el Ejemplo 10 y 4 tipos del mismo descrito en el Ejemplo 22, de 800 a 900  $\mu$ l de cada uno, de manera que las fracciones del anticuerpo se adsorbieron a la resina. La columna se lavó con 9 ml de PBS para eliminar contaminantes, y a continuación se añadió 1 ml de tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,3), obteniendo de ese modo fracciones de elución de IgG. Tras la elución, se añadieron 10  $\mu$ l de un tampón de neutralización (Tris 1 M) a cada fracción siempre que fuera necesario neutralizar las disoluciones. Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración del anticuerpo contenido en la fracción de elución (coeficiente de absorbancia calculado como:  $1,34 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{(cm)}^{-1}$ ). A continuación, algunas fracciones se aplicaron juntas a una columna NAP25 y el disolvente se reemplazó con disolución de hidrógeno carbonato de sodio. Como resultado, se obtuvieron 5 a 15 mg de anticuerpos (estos anticuerpos policlonales se denominan a continuación en el presente documento anticuerpo 311-48, anticuerpo 311-114, anticuerpo 311-148, anticuerpo 311-170, anticuerpo 311-180 y anticuerpo 311-210) de cada antisuero de péptido.

*(2) Biotinilación de IgG anti OST311*

Se diluyeron los 6 tipos anteriores de anticuerpos policlonales anti péptido OST311 hasta 1 mg/ml en disolución de hidrógeno carbonato de sodio 50 mM. A continuación, se mezcló bien 1 mg de cada tipo de anticuerpo con disolución Biotin-ACS-Osu (1,82  $\mu$ g/ml) (Japón, Dojindo) disuelta en 10  $\mu$ l de dimetilformamida por inversión durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, la disolución mezclada se sometió a columna NAP10 para eliminar Biotin-ACS-Osu sin reaccionar y el disolvente se reemplazó con PBS, obteniendo de ese modo 6 tipos de anticuerpos policlonales anti péptido OST311 biotinilados.

*(3) Detección de OST311 en el medio acondicionado de las células que expresan OST311 por el procedimiento ELISA sándwich usando anticuerpo policlonal anti péptido OST de conejo*

Se construyó un sistema ELISA sándwich combinando los 6 tipos de anticuerpos policlonales anti péptido OST311 para la inmovilización y los 6 tipos anteriores de anticuerpos biotinilados para la detección. De esta manera, se examinó la detección de la proteína OST311 en el medio acondicionado de las células que expresan OST311.

Los 6 tipos de anticuerpos policlonales anti péptido OST311 para la inmovilización obtenidos por purificación de Proteína A se diluyeron hasta 10  $\mu$ g/ml en disolución de hidrógeno carbonato de sodio 50 mM. Se añadieron 50  $\mu$ l de cada disolución diluida a cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, EEUU), y a continuación se dejó en reposo durante 1 hora a 37°C, inmovilizando de ese modo la IgG. Posteriormente, se retiró la disolución de reacción, y a continuación se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de bloqueo Superblock en TBS (PIERCE, EEUU) por pocillo para llevar a cabo el bloqueo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras retirar la disolución, se añadió el sobrenadante de cultivo rápido OST311RQH Peak descrito en el Ejemplo 19 (5) o medio MEM $\alpha$  como un control, 50  $\mu$ l por pocillo, y a continuación se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora para la unión con los anticuerpos inmovilizados. Tras la reacción del anticuerpo, se lavó tres veces la disolución con TTBS, se añadieron por pocillo 50  $\mu$ l de cada uno de los 6 tipos anteriores de anticuerpos anti OST311 biotinilados (311-48, 311-114, 311-148, 311-170, 311-180 y 311-210) diluidos hasta 10  $\mu$ g/ml con TTBS que contenía Blockace al 10% (Dainippon Pharmaceutical, Japón), y a continuación se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, llevándose a cabo de ese modo la reacción del anticuerpo secundario. Cada pocillo se lavó tres veces con TTBS, y a continuación se añadieron por pocillo 50  $\mu$ l de estreptavidina marcada con HRP (DAKO, Dinamarca) diluida 10.000 veces con TTBS que contenía Blockace al 10% y posteriormente se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos para la unión con los anticuerpos biotinilados. A continuación cada pocillo se lavó tres veces con TTBS, y posteriormente se añadieron por pocillo 50  $\mu$ l de tetrametilbencidina, el sustrato cromogénico de peroxidasa (DAKO, Dinamarca), y a continuación se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos para desarrollar el color. Posteriormente, se añadieron por pocillo 50  $\mu$ l de disolución de ácido sulfúrico 0,5 M para detener la reacción. La medición se realizó usando un sistema de medición de absorbancia MTP300 (CORONA ELECTRIC, Japón) para una placa de 96 pocillos, y la absorbancia a 450 nm se dividió por la absorbancia a 570 nm. Cuando solamente se añadió MEM $\alpha$  como control, cada uno de valores obtenidos por 450 nm/570 nm fue 0,02 o menos en todos los casos.

En cambio, como se muestra en la Fig. 21A, con una combinación de anticuerpo 311-48 inmovilizado y detección con el anticuerpo 311-180, o una combinación de anticuerpo inmovilizado 311-180 y detección con anticuerpo 311-148, OST311RQH en el medio acondicionado podía detectarse significativamente más que el control. Por otra parte, con una combinación de anticuerpo 311-48 inmovilizado y detección con el anticuerpo 311-148, se deduce que no sólo puede detectarse el polipéptido de longitud total, sino también el fragmento del polipéptido parcial N terminal, porque los sitios antigénicos de ambos anticuerpos estaban contenidos en el péptido parcial N terminal (ID. SEC. N° 6) después de la escisión de la proteína OST311 descrita en el Ejemplo 9. Por el contrario, con una combinación de anticuerpo 311-210 inmovilizado y detección con anticuerpo 311-180, se deduce que no solo puede detectarse el péptido de longitud total, sino también el péptido parcial C terminal (ID. SEC. N° 8) después de la escisión descrita en el Ejemplo 9. Por consiguiente, el uso múltiple de estas combinaciones hace posible medir la cantidad absoluta y la relación de la presencia del polipéptido de longitud total OST311 y de los polipéptidos parciales en las muestras, tales como muestras biológicas.

#### (4) Determinación cuantitativa de la concentración de proteína OST311 recombinante mediante el procedimiento de ELISA sándwich usando anticuerpo policlonal de conejo anti péptido OST311

En el sistema ELISA anterior, se examinó la detección de OST311H recombinante purificada constituida por una dilución en serie de 1, 0,67, 0,33, 0,1, 0,067, 0,033 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$  con una combinación del anticuerpo 311-48 o del anticuerpo 311-180 como anticuerpo inmovilizado y anticuerpo 311-148 como anticuerpo para la detección. Como se muestra en la Fig. 21B, podía obtenerse de esta manera linealidad fina dentro de un intervalo de 0,1 a 1  $\mu\text{g/ml}$  (311-48:  $R^2 = 0,990$ , 311-180:  $R^2 = 0,996$ ). Este resultado reveló que puede detectarse OST311H recombinante al menos dentro de este intervalo de concentración.

#### Ejemplo 24

##### Examen del efecto de la administración única de proteína OST311 recombinante

Para examinar el efecto a corto plazo de las células CHO productoras de proteína OST311H de longitud total recombinante en ratones normales (BALB/c, machos, de 6 semanas de edad), se administró una vez la proteína de longitud total OST311H recombinante purificada, 5,0  $\mu\text{g}/0,1$  ml por ratón a través de la vena caudal. Se administró a un grupo de control, 0,1 ml de un vehículo (PBS) por ratón a través de la vena caudal. A la hora, 3 y 8 horas tras la administración, se realizó la extracción de sangre del corazón y la disección, se midieron los niveles de fosfato, de calcio y de vitamina D del suero, y a continuación se analizó la cantidad de expresión del cotransportador de sodio y fosfato en el túbulo proximal renal. El grupo al que se le administró OST311 y el grupo de control estaban constituidos por 6 ratones respectivamente. Se alojaron 6 ratones por grupo con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón) que contenía fosfato inorgánico al 1,03% y calcio al 1,18%.

##### (1) Cambios con el transcurso del tiempo en los niveles de fosfato del suero

Como se muestra en la Tabla 8, aunque no se observaron cambios significativos en los niveles de fosfato sérico a la hora y a las 3 horas tras la administración única con proteína OST311, se observó una disminución significativa a las 8 horas tras la administración. Este resultado aclaró que el efecto de OST311 requiere de 3 a 8 horas para bajar los niveles de fosfato sérico. Por otra parte, no se observaron cambios en los niveles de calcio en ningún momento.

TABLA 8

Niveles de fosfato del suero

| Tiempo                                         | 1               | 3               | 8               |
|------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Grupo al que se le administró vehículo (mg/dl) | 9,82 $\pm$ 0,61 | 9,99 $\pm$ 0,20 | 9,55 $\pm$ 0,29 |
| Grupo al que se le administró OST311 (mg/dl)   | 9,61 $\pm$ 0,51 | 9,96 $\pm$ 0,39 | 7,82 $\pm$ 0,27 |
| prueba t                                       | p > 0,5         | p > 0,5         | p < 0,005       |

##### (2) Expresión del cotransportador de sodio y fosfato en el túbulo proximal renal

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 11 (6), los riñones recogidos a la hora, 3 y 8 horas tras la administración se mezclaron juntos por grupos, y a continuación se prepararon las membranas de ribete en cepillo (BBM) del túbulo proximal. La relación de la presencia de proteína cotransportadora de sodio y fosfato (NaPi7) en las BBM

obtenidas se analizó por el procedimiento de transferencia Western. Como se muestra en la Fig. 22A, mientras que las cantidades de expresión de NaPi7 a la hora y 3 horas tras la administración fueron equivalentes a las del grupo al que se le administró vehículo, se mostró que NaPi7 en el grupo al que se le administró OST311 a las 8 horas tras la administración estaba significativamente disminuida en comparación con el grupo al que se le administró vehículo.

- 5 Mientras tanto, para examinar si la proteína NaPi7 disminuida estaba asociada con la regulación de la transcripción del ARN, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 11 (7), se preparó el ARN total de los riñones extirpados de cada ratón y se realizó una transferencia Northern usando la sonda descrita en el mismo. De esta manera, como se muestra en la Fig. 22B, mientras que los niveles de ARNm de NaPi7 a la hora y 3 horas tras la administración fueron equivalentes a los del grupo al que se le administró vehículo, se mostró que NaPi7 en el grupo al que se le administró OST311 a las 8 horas tras la administración, estaba significativamente disminuido en comparación con el grupo al que se le administró vehículo. Los resultados anteriores mostraron claramente que las disminuciones en los niveles de fosfato sérico debidos al efecto directo o indirecto de la proteína recombinante OST311 correlacionaban con la regulación negativa del cotransportador de sodio y fosfato en el túbulo renal en sus momentos de fluctuación, y que la supresión de NaPi-7 a nivel de transcripción del ARNm se presenta al menos como un factor que contribuye a la regulación negativa a nivel de la proteína.

### (3) Cambios con el transcurso del tiempo en los niveles de 1,25-dihidroxi vitamina D3 del suero

- 20 Se midieron los niveles séricos de 1,25-dihidroxivitamina D3 a la hora, 3 y 8 horas tras la administración por el procedimiento descrito en el Ejemplo 16 (1). Como se muestra en la Fig. 23, en el grupo al que se le administró OST311, ya se había observado una disminución significativa en el nivel sérico de 1,25-dihidroxivitamina D3 a las 3 horas tras la administración, y se observó otra disminución en el mismo a las 8 horas tras la administración.

### (4) Cambios en la expresión de los genes de enzimas que metabolizan la vitamina D

- 25 Para dilucidar si los niveles séricos disminuidos de 1,25-dihidroxivitamina D3 se debían a fluctuaciones en el gen de la 25-hidroxivitamina D-1- $\alpha$ -hidroxilasa (1 $\alpha$ OHasa) o de la 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (24OHasa) expresados en el riñón, se prepararon los ARN totales de los riñones a la 1, 3 y 8 horas tras la administración según el procedimiento descrito en el Ejemplo 11 (7), y a continuación se realizó una transferencia Northern usando la sonda descrita en el mismo. Como se muestra en la Fig. 24, ya 1 hora tras la administración, se observaron niveles disminuidos de ARNm del gen de la 1 $\alpha$ OHasa y niveles aumentados de ARNm del gen de la 24OHasa. Se mostró que esta tendencia es más significativa a las 8 horas tras la administración. En la Fig. 24, "vehículo" indica un disolvente de la proteína OST311 recombinante que comprende también fosfato 20 mM (pH 6,7) y el NaCl 0,3 M.

- 35 Estos resultados mostraron claramente que OST311 baja los niveles séricos de la 1,25-dihidroxivitamina D3 regulando la expresión del gen de la 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa (1 $\alpha$ OHasa) o de la 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (24OHasa) expresados en el riñón.

## 40 Ejemplo 25

### Examen de la actividad de OST311 con delección del extremo C terminal

#### (1) Construcción del sistema de expresión para OST311 que carece de la porción C terminal

- 45 Se sintetizaron los siguientes cebadores

OST311R693 ATGCGGCCGCTATCGACCGCCCCTGACCACCCC (ID. SEC. N° 53)

50 OST311R633 ATGCGGCCGCTACGGGAGCTCCTGTGAACAGGA (ID. SEC. N° 54)

OST311R618 ATGCGGCCGCTCAACAGGAGGCCGGGGCCGGGGT (ID. SEC. N° 55)

55 OST311R603 ATGCGGCCGCTCACGGGGTCATCCGGGGCCCGGGG (ID. SEC. N° 56)

- OST311R693, OST311R633, OST311R618 y OST311R603 son cebadores inversos para delecionar 20, 40, 45 y 50 residuos de aminoácidos de extremo 3' de OST311, respectivamente y para introducir un codón de terminación y una secuencia de reconocimiento de Not I. Cada uno de estos cebadores inversos y un cebador directo OST311ME1 (ID. SEC. N° 45) conteniendo la metionina de iniciación de OST311 y la secuencia de reconocimiento de EcoR I descrita en el Ejemplo 19 se combinaron para tener una concentración final de 0,2  $\mu$ M. Usando estos cebadores, polimerasa de ADN Pyrobest (TAKARA SHUZO, Japón) y 100 ng del ADN de plásmido OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 descrito en el Ejemplo 19 (2) como molde, se llevó a cabo la reacción de PCR durante 25 ciclos tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto. Cada ciclo de la reacción estaba constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. El producto de reacción obtenido se sometió a tratamiento con fenol/cloroformo, desproteinización y a continuación precipitación con etanol. El producto de reacción se digirió a continuación con EcoR I y Not I, y posteriormente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%, de modo que cada fragmento de ADN se separó y se recogió usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El fragmento de ADN

obtenido se unió al vector pEAK8 (EdgeBioSystems, EEUU) que se había digerido con *EcoR* I y *Not* I, obteniendo de ese modo los plásmidos pPKOST311 -Δ C20, -Δ C40, -Δ C45, -Δ C50. Los ADN plasmídicos se prepararon por medio de procedimientos convencionales, y a continuación se determinaron las secuencias de nucleótidos usando secuenciador de ADN por fluorescencia ABI3700 (PE Applied Biosystems, EEUU), confirmando de ese modo que los pares de bases se habían delecionado como se deseaba de cada uno de los extremos 3' terminales del gen de OST311RQH.

(2) Aislamiento de células CHO que expresan de manera estable el recombinante

Se introdujeron respectivamente los ADN plasmídicos pPKOST311 -Δ C20, -Δ C40, -Δ C45, -Δ C50 en células CHO ras clon-1 usando Transfectam (Promega, EEUU) según el manual adjunto del fabricante. Se obtuvieron las células CHO-OST311RQ -Δ C20, -Δ C40, -Δ C45 y -Δ C50 que mostraron resistencia al fármaco en medio MEMα que contenía puomicina 5 μg/ml y FCS al 10%. Estas células se inocularon respectivamente en placas de 24 pocillos, y a continuación se cultivaron en medio MEMα que contenía puomicina 5 μg/ml y FCS al 10% hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, el medio se reemplazó con un medio DF (DMEM/F-12) sin suero. 3 días más tarde, se recogió el medio acondicionado. El medio acondicionado obtenido se sometió al procedimiento de transferencia Western usando el anticuerpo policlonal 311-148 ó 311-180 específico de OST311 descrito en el Ejemplo 22, confirmando de ese modo la expresión de cada proteína relevante en una posición correspondiente a cada peso molecular predicho.

(3) Experimento de trasplante de células CHO que expresan OST311 con delección del extremo C terminal

Las células CHO que expresan los anteriores polipéptidos OST311 con delección de 20, 40, 45 y 50 residuos se trasplantaron por separado por vía subcutánea en ratones atímicos (de 6 semanas de edad, BALB/c-nude, machos, 6 ratones por grupo) de manera similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 13. Como grupos de control, se trasplantaron las células CHO que expresan OST311RQH de longitud total y las células CHO ras clon-1 por separado por vía subcutánea (n=6). Cada grupo de ratones se alojó en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón).

El día 3 tras el trasplante celular, se extrajo sangre del corazón, y a continuación se midieron los niveles de fosfato y calcio sérico, y los niveles séricos de 1,25-dihidroxitamina D3 por un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 20. Como se muestra en la Fig. 25, en todos los grupos trasplantados con células CHO-OST311RQ -Δ C20, -Δ C40, -Δ C45 y -Δ C50, se observaron disminuciones significativas en los niveles de fosfato sérico, equivalentes a las del grupo trasplantado con las células que expresan OST311RQH de longitud total (prueba t, \*\* p < 0,001). Además, también se observaron disminuciones significativas en los niveles séricos de 1,25-dihidroxitamina D3 en los grupos trasplantados con células CHO-OST311RQ -Δ C20, -Δ C40, -Δ C45 y -Δ C50 (cuando se definió como 100% un nivel sérico promedio del grupo trasplantado con células CHO ras clon-1, longitud total: 3,1%, Δ C40: 9,4%, Δ C45: 10,0% y Δ C50: 68,1%). Estos resultados mostraron claramente que incluso cuando se delecionaron al menos 50 aminoácidos del extremo C terminal de la proteína OST311, se mantuvo la actividad de disminución del fosfato sérico o la actividad de disminución del nivel de 1,25-dihidroxitamina D3 sérica.

Ejemplo 26

Examen de la actividad de OST311 con delección del extremo N terminal

(1) Construcción del sistema de expresión para OST311 que carece de 9 residuos de aminoácidos del extremo N terminal

Se sintetizaron los siguientes oligo ADN.

OST311SGFW:

**aattccaccATGTTGGGGGCCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCTTGTGCAGCGTCTGC  
AGCATGAGCGTCCTgcatGC (ID. SEC. Nº 57)**

OST311SGRV:

**aattGCatgcAGGACGCTCATGCTGCAGACGCTGCACAAGGCACAGACCCAGAGCCTG  
AGGCGGGCCCCCAACATggtgg (ID. SEC. Nº 58)**

OST311SGFW es un oligo ADN que está constituido por una secuencia genética que codifica una porción del péptido señal constituida por los residuos de aminoácidos desde la metionina de iniciación de OST311 hasta la 24ª Ala de ID. SEC. Nº 2, y contiene una secuencia de reconocimiento de *EcoR* I en su extremo 5' terminal. OST311SGRV

es una hebra complementaria de OST311SGFW, y contiene una secuencia de reconocimiento *EcoR* I en su extremo 5' terminal. Además, se ha introducido el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción *Sph* I en el lado 3' de OST311SGFW y el lado 5' de OST311SGRV. La 23ª Arg dentro de la secuencia del péptido señal se sustituyó con His mediante la introducción del sitio de reconocimiento *Sph* I. Los anteriores oligo ADN se hibridaron según procedimientos convencionales, obteniendo de ese modo fragmentos de ADN de doble hebra que contenían secuencias de reconocimiento *EcoR* I en ambos extremos y la secuencia de reconocimiento *Sph* I en una posición correspondiente al 23º residuo aminoácido en el péptido señal, y que codifica el péptido señal de longitud total que comienza a partir de la metionina de iniciación de OST311 y que contiene un residuo modificado. Los fragmentos de ADN obtenidos se insertaron en los vectores pEAK8 digeridos con *EcoR* I (EdgeBioSystems, EEUU). A continuación se seleccionaron los ADN plasmídicos en los que estaban presentes ambos promotores EF1 y los fragmentos de ADN anteriores dentro del vector en dirección directa, obteniendo de ese modo el plásmido pPKFGSG.

A continuación, se sintetizaron los siguientes cebadores.

OST311dN9: ATATGCATGCCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCAC (ID. SEC. Nº 59)

OST311dN9 es un cebador directo diseñado para contener un sitio de reconocimiento de *Sph* I en su 5' extremo, y el 24º residuo Ala de ID. SEC. Nº 2 seguido por una secuencia de aminoácido que comienza desde el 34º residuo Ser del mismo. Usando una combinación de este cebador y un cebador inverso OST311HNt (Ejemplo 19, ID. SEC. Nº 46) que se había diseñado para tener una secuencia de reconocimiento *Not* I y 6 residuos de histidina añadidos a la porción del extremo C terminal seguido por un codón de terminación, y el ADN del plásmido OST311RQH/TRES-EGFP/pEAK8 descrito en el Ejemplo 19 (2) como molde, se realizó la amplificación por PCR de la manera descrita en el Ejemplo 25 (1). El producto de PCR obtenido se digirió con *Sph* I y *Not* I, y a continuación se insertó en el vector plasmídico pPKFGSG digerido con *Sph* I y *Not* I descrito anteriormente según procedimientos convencionales.

Se determinó la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido OST311 ΔN9-pPKFGSG usando el secuenciador de ADN por fluorescencia ABI3700 (PE Applied Biosystems, EEUU), de manera que se confirmó que la secuencia de genes insertada contenía un péptido señal desde la metionina de iniciación hasta la 24ª Ala del gen de OST311RQH (en el que la 23ª Arg se había sustituido con His), contenía la delección de sólo una secuencia genética correspondiente a 9 residuos aminoácidos desde la siguiente 25ª Tyr hasta la 33ª Gly, y codificaba la secuencia completa desde la 34ª Ser al codón de terminación que contenía el marcador de histidina.

#### (2) Aislamiento de las células CHO que expresan de manera estable OST311 recombinante

Se introdujo el ADN plasmídico ΔN9-pPKFGSG en células CHO ras clon-1 usando Transfectam (Promega, EEUU) según el manual adjunto del fabricante, y a continuación se obtuvieron las células CHO-OST311RQ-ΔN9 que mostraban resistencia al fármaco en medio MEMα que contenía puromicina 5 μg/ml y FCS al 10%. Se recogió el medio acondicionado de las células obtenidas de la manera descrita en el Ejemplo 25. A continuación se realizó la transferencia Western usando el anticuerpo policlonal 311-148 específico de OST311 descrito en el Ejemplo 22, o un anticuerpo policlonal 311-237 obtenido nuevo inmunizando un conejo con un polipéptido parcial desde la 237º Gly hasta la 251º Ile de ID. SEC. Nº 2. De ese modo, se confirmó la expresión de una proteína relevante en la posición correspondiente al peso molecular predicho. Estos resultados revelaron que el péptido señal de OST311, en el que se había sustituido la 23º Arg de ID. SEC. Nº 2 con His, funcionaba de manera suficiente para secretar la proteína OST311 recombinante, y que incluso cuando se había delecionado al menos una porción desde la 25º Tyr hasta la 33º Gly, la proteína recombinante podía estar presente de manera estable hasta cierto punto en el medio de cultivo tras la secreción.

#### (3) Experimento de trasplante de células CHO que expresan OST311 con delección de 9 aminoácidos en el extremo N terminal

Las células anteriores CHO-OST311RQ-ΔN9 se trasplantaron por vía subcutánea a ratones atímicos (de 8 semanas de edad, BALB/c-nude, machos, 6 ratones por grupo) de manera similar a los procedimientos descritos en el Ejemplo 13. Como grupos de control, se trasplantaron por vía subcutánea de modo similar células CHO que expresan OST311RQH de longitud total y células CHO ras clon-1 respectivamente (n=6). Cada grupo de ratones atímicos se alojó en una jaula de plástico con acceso *ad libitum* al agua de grifo y alimento sólido CE2 (CLEA JAPAN, Japón).

El día 4 tras el trasplante celular, se recogió sangre de la cavidad orbital usando capilares de vidrio, y a continuación se midieron los niveles de fosfato sérico en la forma descrita en el Ejemplo 20. De esta manera, en el grupo trasplantado con células CHO-OST311RQ-ΔN9, se observó una disminución significativa en los niveles de fosfato sérico, que fue equivalente al del grupo trasplantado con células que expresan el recombinante de longitud total (grupo de células CHO ras clon-1: 6,85 ± 0,12 mg/dl, grupo CHO-OST311RQ: 3,91 ± 0,23 mg/dl (p < 0,001, para el grupo de células CHO ras clon-1), grupo CHO-OST311RQ-ΔN9: 4,33 ± 0,15 mg/dl (p < 0,001, para el grupo de células CHO ras clon-1).

Estos resultados revelaron que aún cuando se delecionaron al menos 9 residuos de aminoácidos constituidos por la 25ª Tyr a 33ª Gly de ID. SEC. Nº 2, la actividad biológica de OST311 permaneció intacta.

## Ejemplo 27

Examen de *Escherichia coli* que produce OST311 recombinante(1) Construcción del vector de expresión de OST311 en *Escherichia coli* OST311/pET3a

Se sintetizaron los siguientes cebadores.

OST311N: TGTATCCCAATGCCTCCCCACTG (ID. SEC. N° 60)

OST311Bm: ATGGATCCCTAGATGAACTTGGCGAAGGG (ID. SEC. N° 61)

Se realizó la PCR usando como molde el plásmido OST311/pCAGGS preparado en el Ejemplo 19, OST311N (ID. SEC. N° 60) y OST311Bm (ID. SEC. N° 61) como cebadores, y polimerasa de ADN pfu (Promega, EEUU). Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, la reacción se realizó durante 35 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Tras la reacción, se realizó el tratamiento de fenol/cloroformo, para inactivar la enzima, y a continuación se recogió el ADN mediante precipitación con etanol. El ADN se digirió con *Bam*H I, los fragmentos de ADNc de OST311 diana se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, y a continuación se recogieron usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). Mientras tanto, el vector plasmídico pET3a (Novagen, EEUU) se digirió con *Nde* I, y a continuación se generaron extremos romos usando fragmentos Klenow (Roche, Suiza). El vector se digirió además con *Bam*H I, el fragmento de ADN plasmídico se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y a continuación se recogió usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El fragmento de ADNc de OST311 obtenido de esta manera se unió al plásmido pET3a digerido usando un kit de unión de ADN versión 2 (TAKARA SHUZO, Japón). Posteriormente, el producto se introdujo en DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para clonación, y a continuación se extrajo un plásmido. La secuencia de nucleótidos del plásmido se confirmó para cerciorarse de que el ADNc de OST311 se había insertado en pET3a según lo esperado. El plásmido se denominó OST311/pET3a.

(2) Construcción del vector OST311/pET28 para la expresión de OST311 en *Escherichia coli*

Se sintetizaron los siguientes cebadores.

OST311Nd: ATCATATGTATCCCAATGCCTCCCCACTG (ID. SEC. N° 62)

OST311Not: ATGCGGCCGCCTAGATGAACTTGGCGAAGGG (ID. SEC. N° 63)

Se realizó la PCR usando como molde el plásmido OST311/pET3a, OST311Nd (ID. SEC. N° 62) y OST311Not (ID. SEC. N° 63) como cebadores, y LA Taq (TAKARA SHUZO, Japón). Tras mantener la temperatura a 94°C durante 1 minuto, la reacción se realizó durante 35 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Tras la reacción, se llevó a cabo el tratamiento con fenol/cloroformo para inactivar la enzima. El fragmento de ADN amplificado se recogió por medio de precipitación con etanol. El fragmento de ADN se digirió con *Nde* I y *Not* I, el fragmento de ADN de OST311 diana se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, y a continuación se recogió usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). Mientras tanto, el vector plasmídico pET28 (Novagen, EEUU) se digirió con *Nde* I y *Not* I, y a continuación se desfosforiló usando fosfatasa alcalina de intestino de ternera (TAKARA SHUZO, Japón). El producto se separó a continuación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y posteriormente se recogió el plásmido digerido procedente usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). El ADNc de OST311 obtenido de esta manera se unió al plásmido pET28 digerido usando un kit de unión de ADN versión 2 (TAKARA SHUZO, Japón), y a continuación el producto unido se introdujo en DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para clonación, extrayendo de este modo un plásmido. La secuencia de nucleótidos del plásmido se confirmó para cerciorarse de que el ADNc de OST311 que permitía la expresión de OST311 recombinante que tenía una secuencia His-Tag añadida al lado N terminal se había insertado en pET28. Este plásmido se denominó OST311/pET28. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos del His-OST311 recombinante codificadas por este vector se muestran en la Fig. 26.

(3) Expresión de His-OST311 recombinante en *Escherichia coli* y preparación del mismo

Se introdujo el plásmido OST311/pET28 en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* Codon Plus RP (STRATAGENE, EEUU) para la transformación, y a continuación se obtuvieron los clones. Los clones obtenidos de *Escherichia coli* se inocularon en 100 ml de medio LB que contenía 10 mg de kanamicina (SIGMA, EEUU) y se cultivaron a 37°C durante la noche. La suspensión de células bacterianas se inoculó en 1 l del medio LB hasta A<sub>600</sub> = 0,1, y a continuación se cultivó con agitación usando un matraz Sakaguchi de 3 litros a 37°C. Se midió la absorbancia de la suspensión del cultivo con el tiempo. Cuando alcanzó A<sub>600</sub> = 0,6 a 1,0, se añadió isopropil-1-tio- $\beta$ -galactósido (IPTG) (Wako Pure Chemical Industries, Japón) en una concentración de 1 mM. 4 horas de más tarde, se recogieron las células por centrifugación (7700g x 15 minutos). Las células recogidas se suspendieron en 20 ml de tampón Tris clorhidrato 0,1 M (pH 7,5) que contenía DTT 1 mM, y a continuación se lisaron usando French Press. La disolución que contenía las células lisadas se centrifugó (7700g x 15 minutos), y a continuación la fracción del precipitado se suspendió en

15 ml de tampón Tris clorhidrato 0,1 M (pH 7,5). Se añadió DNasa I (Roche, Suiza) a la suspensión a 0,1 mg/ml, y a continuación se agitó a 4°C durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la centrifugación (23.400g x 15 minutos), y posteriormente la fracción del precipitado se recogió como cuerpo de inclusión. El cuerpo de inclusión obtenido se lavó suspendiendo en 10 ml de tampón Tris clorhidrato 20 mM (pH 8) que contenía urea 0,75 M y Tritón-X al 1%, y a continuación se centrifugó (23.400g x 15 minutos) para recoger el precipitado. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces.

El cuerpo de inclusión lavado se suspendió en 5 ml de una disolución desnaturalizante (tampón fosfato 50 mM (pH 8) que contenía DTT 1 mM y clorhidrato de guanidina de 6 M), y a continuación se disolvió mediante agitación de la suspensión a 37°C durante 1 hora. El material insoluble se eliminó como precipitado por medio de centrifugación (23.400g x 15 minutos), y a continuación se equilibró la disolución con tampón fosfato 50 mM que contenía clorhidrato de guanidina 6 M (pH 6). La muestra disuelta se aplicó a una columna rellena con Ni-NTA Agarosa (QIAGEN, Alemania), y a continuación se lavó con tampón fosfato 50 mM que contenía clorhidrato de guanidina 6 M (pH 6). La proteína adsorbida a la columna se eluyó usando tampón fosfato 50 mM (pH 4,5) que contenía imidazol 500 mM (Nacalai Tesque, Japón) y clorhidrato de guanidina 6 M, purificando de esta manera His-OAT311 desnaturalizado. La concentración se obtuvo en base a la absorbancia UV a 280 nm de la muestra purificada, y a continuación se añadió tampón fosfato 50 mM (pH 6) que contenía clorhidrato de guanidina 6 M a la muestra para tener una concentración final de 2 mg/ml, preparando de esta manera la disolución de His-OST311 desnaturalizado. Se añadió cisteína a la muestra como agente reductor para tener una concentración final de 1 mM, se diluyó 100 veces con tampón fosfato 20 mM (pH 6) que contenía clorhidrato de guanidina 0,6 M y Tween 20 al 0,1% para comenzar el replegamiento. La incubación se realizó a 4°C durante 3 días o más.

La disolución de replegamiento se dializó contra tampón acetato 0,1 M (pH 4,8) a 4°C. La disolución de replegamiento dializada se concentró aproximadamente 10 veces usando una membrana de ultrafiltración, y a continuación se purificó por medio de HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón). La proteína se eluyó usando tampón fosfato 20 mM que contenía glicerol al 10% (pH 6) con un gradiente lineal de NaCl desde 0,5 M hasta 2 M. Este patrón de elución se muestra en la Fig. 27. El análisis SDS-PAGE y la medición de espectrometría de masas revelaron que entre los dos tipos de picos de proteínas eluidas, His-OST311 estaba contenida en un pico eluido a una concentración salina más baja. Como se describió anteriormente, a partir de aproximadamente 1 l de células cultivadas pudieron prepararse aproximadamente 0,6 mg del producto final purificado, His-OST311.

#### (4) Construcción del vector pET22b-MK-OST311 para la expresión de MK-OST311

Se sintetizaron los siguientes cebadores.

OST311MK1: gaattcatatgaaatacccgaaacgcttccccgctgctgggctccagctg (ID. SEC. Nº 64)

OST311MK2: cccaagcttgccggccgcttagatgaactggc (ID. SEC. Nº 65)

Se amplificó una secuencia diana por PCR usando el anterior plásmido de expresión de His-OST311, OST311/pET28, como molde y OST311MK1 (ID. SEC. Nº 64) y OST311MK2 (ID. SEC. Nº 65) como cebadores. En el ADNc OST311 obtenido por este procedimiento, 27 nucleótidos después del codón iniciación (ATG) se habían convertido a codones de tipo *Escherichia coli*. El producto de PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, Alemania), y a continuación se digirió con enzimas de restricción *Nde* I (TAKARA SHUZO, Japón) y *Not* I (TAKARA SHUZO, Japón) a 37°C durante 1 hora. El producto de PCR digerido se separó por electroforesis en agarosa, y a continuación se purificó con un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, Alemania). El fragmento de ADN obtenido se digirió con enzimas de restricción *Nde* I y *Not* I a 37°C durante 1 hora, y a continuación se unió al vector plasmídico pET22b (Novagen, EEUU), que se había separado y purificado por medio de electroforesis en agarosa, usando un kit DNA Ligation Ver 2 (TAKARA SHUZO, Japón) a 16°C durante 15 minutos. El producto unido se introdujo en JM109 de *Escherichia coli* (TAKARA SHUZO, Japón) para su clonación, y a continuación se extrajo un plásmido mediante procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido se determinó para cerciorarse de que el ADNc de OST311 obtenido se había insertado dentro del vector pET22b según lo esperado. Este plásmido se denominó pET22-MK-OST311. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del MK-OST311 recombinante codificado por el vector se muestran en la Fig. 26.

#### (5) Expresión de MK-OST311 en *Escherichia coli* y preparación del mismo

Se introdujo el plásmido pET22-MK-OST311 en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* Codon Plus RP (STRATAGENE, EEUU), y a continuación se obtuvieron los clones transformados. Los clones obtenidos de *Escherichia coli* se inocularon en 100 ml de medio LB que contenía 10 mg de ampicilina y a continuación se cultivó a 37°C durante la noche. La suspensión de células bacterianas se inoculó en 1 l de medio LB hasta  $A_{600} = 0,1$ , y a continuación se cultivó con agitación usando un matraz Sakaguchi de 3 litros a 37°C. Se añadió IPTG al cultivo de células bacterianas para inducir la expresión del recombinante, y a continuación se prepararon los cuerpos de inclusión de manera similar al procedimiento de preparación anterior de His-OST311.

Los cuerpos de inclusión lavados se suspendieron en 5 ml de disolución desnaturalizante (tampón fosfato 50 mM (pH 8) que contenía DTT 1 mM y clorhidrato de guanidina 6 M), y a continuación se disolvió agitando la suspensión a

37°C durante 1 hora. El producto disuelto se diluyó 2 veces usando una disolución desnaturalizante, y a continuación se diluyó 100 veces usando tampón fosfato 20 mM (pH 6) que contenía clorhidrato de guanidina 0,6 M y Tween 20 al 0,1% para comenzar el replegamiento. La incubación se realizó a 4°C durante 3 días o más. Se mostró que bajo condiciones de adición de oxidante y un pH de 7 o más, la proteína precipitaba de modo que la eficacia de replegamiento disminuía significativamente. La disolución de replegamiento se dializó contra tampón acetato 0,1 M (pH 4,8) a 4°C. La disolución de replegamiento dializada se concentró aproximadamente 10 veces usando una membrana de ultrafiltración, y a continuación se purificó por medio de HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón). La proteína se eluyó usando tampón fosfato 20 mM que contenía glicerol al 10% (pH 6) con un gradiente lineal de NaCl de 0,5 M a 2 M. Como se muestra en la Fig. 28, hubo 2 picos de elución de proteínas, y el análisis SDS-PAGE y la medición de espectrometría de masas reveló que MK-OST311 estaba contenida en un pico eluido a una concentración salina más baja. De esta manera, a partir de aproximadamente 1 l de células cultivadas en el matraz, pudieron purificarse aproximadamente 0,6 mg del producto final purificado, MK-OST311.

#### (6) PEGilación de MK-OST311

Se ajustaron 10 ml de MK-OST311 (0,05 mg/ml) purificados con una columna de intercambio iónico para tener pH 4,8 usando ácido acético al 10%. Se añadieron 25 mg de PEG activado (Sharewater, EEUU) con un peso molecular de 20.000 disuelto en tampón acetato 10 mM (pH 4,8) a esta disolución con agitación en hielo. 15 minutos más tarde, se añadió ciano borohidruro de sodio 1 M (Nacalai Tesque, Japón) disuelto en tampón acetato 10 mM (pH 4,8) a la disolución para tener una concentración final de 15 mM, y a continuación se agitó la disolución a 4°C durante 16 horas. La OST311 PEGilada por esta reacción se purificó por medio de HPLC usando la columna de intercambio catiónico SP-5PW (TOSOH, Japón). La proteína se eluyó usando tampón fosfato 20 mM que contenía glicerol al 10% (pH 6) con un gradiente lineal de NaCl de 0,5 M a 2 M. Como se muestra en la Fig. 29, MK-OST311 PEGilada eluyó como un único pico en el lado de fuerza iónica más baja comparado con el de MK-OST311.

#### (7) Examen de la actividad de His-OST311 recombinante

Para examinar la actividad biológica de la His-OST311 purificada recombinante, se llevó a cabo una administración única de la proteína recombinante, 4,5 µg/0,1 ml cada uno, a ratones normales (de 5 semanas de edad, BALB/c, machos, 6 ratones por el grupo) a través de la vena caudal de la manera descrita en el Ejemplo 24. 9 horas más tarde, se midieron los niveles de fosfato y de 1,25-dihidroxivitamina D3 del suero mediante un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 20. Se realizó una única administración de la misma dosis del recombinante purificado procedente de células CHO-OST311H a un grupo de control positivo, y se realizó una única administración de un vehículo que comprendía tampón fosfato 20 mM (pH 6,9) y NaCl 0,3 M, 0,1 ml cada uno, a un grupo al que se le administró vehículo, ambos a través de la vena caudal.

Como se muestra en la Fig. 30A, en el grupo al que se administró His-OST311 a las 9 horas tras la administración, se observó un efecto significativo de disminución de los niveles de fosfato sérico comparado con el grupo al que se le administró vehículo. El grado de disminución fue equivalente al del grupo al que se le administró células CHO productoras de proteína recombinante. Además, los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D3 sérica a las 9 horas tras la administración en el grupo al que se administró His-OST311 también mostraron una disminución significativa como se muestra en la Fig. 32.

Como se describió en el Ejemplo 24 (3) y (4), los niveles significativamente disminuidos de 1,25-dihidroxivitamina D3 sérica ya se observaban a las 4 horas tras la administración única de células CHO productoras de proteína OST311. Antes de este punto temporal, a la hora tras la administración, se observó expresión disminuida de 25-hidroxivitamina D-1-α-hidroxilasa (1αOHasa) y expresión aumentada de 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (24OHasa) en los riñones. Por consiguiente, se llevó a cabo la administración única de His-OST311, 4,5 µg/0,1 ml por ratón, a ratones BALB/c (de 5 semanas de edad, machos) a través de la vena caudal, y a continuación se extirparon los riñones a la hora y 4 horas más tarde. Los cambios en la expresión del gen 1αOHasa y del gen 24OHasa en los riñones se analizaron mediante el procedimiento de transferencia Northern. Se llevó a cabo la administración única de la misma dosis de recombinante purificada procedente de células CHO-OST311H a un grupo de control positivo, y la administración única de un vehículo que comprendía tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) y NaCl 0,3 M, 0,1 ml cada uno, a un grupo al que se le administró vehículo, ambos a través de la vena caudal. Como se muestra en la Fig. 31, de manera similar a las células CHO que producen recombinante, His-OST311 provocó la expresión disminuida del gen de 1αOHasa y la expresión aumentada del gen de 24OHasa ya a la hora tras la administración. Se reveló que His-OST311 tiene actividad en la regulación de la expresión de genes de enzimas que metabolizan la vitamina D equivalente a las células CHO que producen recombinante. Además, como se muestra en la Fig. 32, los cambios en los niveles de la 1,25-dihidroxivitamina D3 sérica mostraron una disminución moderada a las 4 horas tras la administración con recombinante, y mostraron una disminución más significativa a las 8 horas. Se reveló que este tipo de cambios fue casi coherente con la de los cambios con el tiempo como se observó en el experimento de administración de células CHO que producen recombinante CHO descrito en el Ejemplo 24 (3).

De los resultados anteriores, se reveló que His-OST311 recombinante producida por *Escherichia coli* tiene actividades biológicas de al menos, actividad de disminución del fosfato del suero y actividad reguladora del metabolismo de la vitamina D, equivalentes a las actividades del recombinante secretado producido por las células CHO-OST311H.

## (8) Examen de la actividad de MK-OST311 PEGilado

Se examinó la actividad biológica de MK-OST311 PEGilado llevando a cabo una administración única de MK-OST311 PEGilado, 5,0 µg/0,1 ml por ratón, a ratones normales (de 5 semanas de edad, BALB/c, machos, 8 ratones por grupo) a través de la vena caudal de la manera descrita en el Ejemplo 24, y a continuación se midieron los niveles de fosfato sérico a las 9 horas después de la administración por un procedimiento similar al del Ejemplo 20. Se llevó a cabo la administración única de un vehículo que comprendía PB 20 mM (pH 6,0), glicerol al 10%, NaCl 1 M y Tween 20 al 0,1%, 0,1 ml/ratón, a un grupo al que se le administró vehículo a través de la vena caudal. A las 8 horas después de la administración, se recogió sangre de la cavidad orbital usando capilares de vidrio, y a continuación se midieron los niveles de fosfato inorgánico de los sueros obtenidos. Como se muestra en la Fig. 30B, se observó un efecto significativo de disminución de los niveles de fosfato sérico en el grupo al que se le administró MK-OST311 PEGilado, comparado con el grupo al que se le administró vehículo. Los resultados revelaron que cuando se PEGiló el recombinante producido por *Escherichia coli*, no se inhibió su actividad biológica.

## Ejemplo 28

## Introducción de mutación de aminoácidos en el sitio de escisión

Como se describió en el Ejemplo 9, se mostró que OST311 se escindió en una posición entre los residuos aminoácidos 179°, Arg, y 180°, Ser, de ID. SEC. N° 2. Mientras tanto, como se describió en el Ejemplo 19 se confirmó que esta escisión se inhibía por la sustitución simultánea de ambos residuos aminoácidos de la 176°, Arg, y 179°, Arg, de OST311 con Gln. Estos hechos sugieren una posibilidad de que esta escisión se deba a alguna proteasa que reconoce un motivo constituido por la secuencia adyacente RXXR o RRXXR. Por otra parte, cuando el recombinante de longitud total constituido por el polipéptido representado por ID. SEC. N° 4 se administra *in vivo*, puede tener lugar la misma escisión que se describió anteriormente o una escisión similar del mismo. Por lo tanto, los residuos aminoácidos 175° al 180° de ID. SEC. N° 2 se sustituyeron respectivamente con Ala, Gln o Trp, y a continuación se examinó como afectó la sustitución a los patrones de expresión y secreción en cada recombinante mutante en las células CHO.

## (1) Construcción del gen OST311 con mutaciones en el sitio de escisión

Se sintetizaron los siguientes cebadores.

|            |                                              |
|------------|----------------------------------------------|
| pyh23PA1F  | AACACCCCCATAGCACGGCGGCACA (ID. SEC. N° 66)   |
| pyh23PA1R  | TGTGCCGCCGTGCTATGGGGGTGTT (ID. SEC. N° 67)   |
| pyh23RA1F  | ACCCCCATACCAGCGCGGCACACCCG (ID. SEC. N° 68)  |
| pyh23RA1R  | CGGGTGTGCCGCGCTGGTATGGGGGT (ID. SEC. N° 69)  |
| pyh23RA2F  | CCCATACCACGGGCGCACACCCGGAG (ID. SEC. N° 70)  |
| pyh23RA2R  | CTCCGGGTGTGCGCCCGTGGTATGGG (ID. SEC. N° 71)  |
| pyh23HA1F  | ATACCACGGCGGGGCCACCCGGAGCGC (ID. SEC. N° 72) |
| pyh23HA1R  | GCGCTCCGGGTGGCCCGCCGTGGTAT (ID. SEC. N° 73)  |
| pyh23TA1F  | CCACGGCGGCACGCCCGAGCGCCG (ID. SEC. N° 74)    |
| pyh23TA1R  | CGGCGCTCCGGGCGTGCCGCCGTGG (ID. SEC. N° 75)   |
| pyh23RA3F  | CGGCGGCACACCGCGAGCGCCGAGGA (ID. SEC. N° 76)  |
| pyh23RA3R  | TCCTCGGCGCTCGCGGTGTGCCGCCG (ID. SEC. N° 77)  |
| pyh23SA1F  | CGGCACACCCGGGCGCCGAGGACGA (ID. SEC. N° 78)   |
| pyh23SA1R  | TCGTCCTCGGCGGCCCGGGTGTGCCG (ID. SEC. N° 79)  |
| pyh23RKQ1F | ACCCCCATACCACAGCGGCACACCCG (ID. SEC. N° 80)  |
| pyh23RKQ1R | CGGGTGTGCCGCTGTGGTATGGGGGT (ID. SEC. N° 81)  |
| pyh23RKQ2F | CCCATACCACGGCAGCACACCCGGAG (ID. SEC. N° 82)  |
| pyh23RKQ2R | CTCCGGGTGTGCTGCCGTGGTATGGG (ID. SEC. N° 83)  |
| pyh23RKQ3F | CGGCGGCACACCCAGAGCGCCGAGGA (ID. SEC. N° 84)  |

## ES 2 344 679 T3

pyh23RKQ3R TCCTCGGCGCTCTGGGTGTGCCGCCG (ID. SEC. Nº 85)

pyh23RWF CGGCGGCACACCTGGAGCGCCGAGG (ID. SEC. Nº 86)

pyh23RWR CCTCGGCGCTCCAGGTGTGCCGCCG (ID. SEC. Nº 87)

pyh23PA1F y pyh23PA1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 652ª citosina del ADNc de OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina causa la sustitución del 174º residuo aminoácido, Pro, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina P174A.

pyh23RA1F y pyh23RA1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 655ª citosina y la 656ª guanina del ADNc de OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina y citosina, respectivamente, causan la sustitución del 175º residuo aminoácido, Arg, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R175A.

pyh23RA2F y pyh23RA2R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 658ª citosina y la 659ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina y citosina, respectivamente, causan la sustitución del 176º residuo aminoácido, Arg, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R176A.

pyh23HA1F y pyh23HA1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 661ª citosina y la 662ª adenina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina y citosina, respectivamente, causan la sustitución del 177º residuo aminoácido, His, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina H177A.

pyh23TA1F y de pyh23TA1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 664ª adenina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina causa la sustitución del 178º residuo aminoácido, Thr, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina T178A.

pyh23RA3F y pyh23RA3R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 667ª citosina y la 668ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina y citosina, respectivamente, causan la sustitución del 179º residuo aminoácido, Arg, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R179A.

pyh23SA1F y pyh23SA1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 670ª adenina la 671ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con guanina y citosina, respectivamente, causan la sustitución del 180º residuo aminoácido, Ser, de ID. SEC. Nº 2 con Ala. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina S180A.

pyh23RKQ1F y pyh23RKQ1R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 656ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con adenina causa la sustitución del 175º residuo aminoácido, Arg, de ID. SEC. Nº 2 con Gln. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R175Q.

pyh23RKQ2F y pyh23RKQ2R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 659ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con adenina causa la sustitución del 176º residuo aminoácido, Arg, de ID. SEC. Nº 2 con Gln. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R176Q.

pyh23RKQ3F y pyh23RKQ3R son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 668ª guanina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con adenina causa la sustitución del 179º residuo aminoácido, Arg de ID. SEC. Nº 2 con Gln. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R179Q.

pyh23RWF y pyh23RWR son los cebadores directo e inverso para introducir una mutación, en la que la sustitución de la 667ª citosina del ADNc OST311 (ID. SEC. Nº 1) con timina causa la sustitución del 179º residuo aminoácido, Arg de ID. SEC. Nº 2 con Trp. A continuación, en el presente documento, esta mutación se denomina R179W.

### (1)-1 Construcción del gen de OST311P174AH

Se prepararon 2 tipos de disoluciones de reacción (100 µl de cada una) usando polimerasa de ADN Pyrobest (TAKARA SHUZO, Japón) según el manual adjunto del fabricante. Para una disolución de reacción, se utilizaron OST311ME1 (ID. SEC. Nº 45) y pyh23PA1F (ID. SEC. Nº 66) como cebadores a una concentración final de 0,2 µM, y para la otra disolución de reacción, se utilizaron pyh23PA1R (ID. SEC. Nº 67) y OST311HNt (ID. SEC. Nº 46) como cebadores a una concentración final de 0,2 µM. A cada disolución de reacción, se añadieron 10 ng del plásmido

## ES 2 344 679 T3

OST311/pCAGGS descrito en el Ejemplo 19 (1) como molde, y a continuación la disolución se mantuvo a 94°C durante 1 minuto. A continuación, se realizó la reacción de PCR durante 40 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Los dos tipos de disoluciones de reacción se diluyeron 10 veces respectivamente, y posteriormente se añadió 1 µl de cada disolución a 100 µl de una disolución de reacción preparada según el documento adjunto al kit de polimerasa de ADN Pyrobest (TAKARA SHUZO, Japón). Se añadieron OST311ME1 (ID. SEC. N° 45) y OST311HNt (ID. SEC. N° 46) como cebadores a la disolución para tener una concentración final de 0,2 µM, y a continuación la disolución se mantuvo a 94°C durante 1 minuto. A continuación, la reacción de PCR se realizó durante 30 ciclos, estando cada ciclo constituido por 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 30 segundos. Después de la reacción de PCR, la disolución se mantuvo además a 72°C durante 7 minutos. Los productos de reacción obtenidos de esta manera se recogieron usando Gene Clean II (BIO101, EEUU) según el manual adjunto del fabricante. Los productos se digirieron a continuación con *EcoR* I y *Not* I, y a continuación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% para separar fragmentos de ADN de aproximadamente 800 pb. El fragmento se recogió usando Gene Clean II (BIO101, EEUU). Los fragmentos de ADN obtenidos de esta manera se insertaron en los sitios de *EcoR* I y *Not* I del vector pEAK8 (EdgeBio, EEUU), obteniendo de ese modo el plásmido OST311P174AH-pEAK8. El ADN del plásmido se preparó según procedimientos convencionales, y la secuencia de nucleótidos se determinó usando un secuenciador de ADN de fluorescencia ABI3700 (PE Applied Systems, EEUU). De esta manera, se confirmó que la mutación P174H se había introducido según lo esperado. Por otra parte, se confirmó que se había añadido un marcador de histidina al extremo C terminal. El polipéptido codificado por un gen mutante que tiene introducida la mutación P174A en el mismo se denomina OST311P174AH.

### (1)-2 Preparación del gen de OST311R175AH

El gen de OST311R175AH se preparó usando los cebadores pyh23RA1F (ID. SEC. N° 68) y pyh23RA1R (ID. SEC. N° 69) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-3 Preparación del gen de OST311R176AH

El gen de OST311R176AH se preparó usando los cebadores pyh23RA2F (ID. SEC. N° 70) y pyh23RA2R (ID. SEC. N° 71) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-4 Preparación del gen de OST311H177AH

El gen de OST311H177AH se preparó usando los cebadores pyh23HA1F (ID. SEC. N° 72) y pyh23HA1R (ID. SEC. N° 73) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-5 Preparación del gen de OST311T178AH

El gen de OST311T178AH se preparó usando los cebadores pyh23TA1F (ID. SEC. N° 74) y pyh23TA1R (ID. SEC. N° 75) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-6 Preparación del gen de OST311R179AH

El gen de OST311R179AH se preparó usando los cebadores pyh23RA3F (ID. SEC. N° 76) y pyh23RA3R (ID. SEC. N° 77) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-7 Preparación del gen de OST311S180AH

El gen de OST311S180AH se preparó usando los cebadores pyh23SA1F (ID. SEC. N° 78) y pyh23SA1R (ID. SEC. N° 79) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-8 Preparación del gen de OST311R175QH

El gen de OST311R175QH se preparó usando los cebadores pyh23RKQ1F (ID. SEC. N° 80) y pyh23RKQ1R (ID. SEC. N° 81) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

### (1)-9 Preparación del gen de OST311R176QH

El gen de OST311R176QH se preparó usando los cebadores pyh23RKQ2F (ID. SEC. N° 82) y pyh23RKQ2R (ID. SEC. N° 83) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

(1)-10 *Preparación del gen de OST311R179QH*

El gen de OST311R179QH se preparó usando los cebadores pyh23RKQ3F (ID. SEC. N° 84) y pyh23RKQ3R (ID. SEC. N° 85) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

(1)-11 *Preparación del gen de OST311R179WH*

El gen de OST311R179WH se preparó usando los cebadores pyh23RWF (ID. SEC. N° 86) y pyh23RWR (ID. SEC. N° 87) por un procedimiento similar al del punto (1)-1.

(2) *Expresión transitoria de los genes de OST311 con mutación en el sitio de escisión y preparación del medio acondicionado*

Se inocularon células rápidas pEAK (EdgeBiosystems, EEUU) sobre una placa de 12 pocillos. Los 11 tipos de plásmidos de expresión para OST311 mutantes anteriores se transfectaron en las células por medio de un procedimiento con fosfato de calcio según el documento adjunto al sistema pEAK (EdgeBiosystems, EEUU). Las células se dejaron reposar durante 4 horas, el medio se reemplazó con 1,5 ml de medio MEM $\alpha$  sin suero, las células se cultivaron a 37°C durante 2 días, y a continuación se recogió el medio acondicionado.

(3) *Evaluación de la expresión de los genes de OST311 con la mutación en el sitio de escisión*

El medio acondicionado obtenido de esta manera se sometió a transferencia Western de la manera descrita en el Ejemplo 6 (3), y a continuación se examinó la presencia de OST311 recombinante con la mutación en el sitio de escisión en el medio acondicionado. El anticuerpo policlonal específico para OST311, 311-148 descrito en el Ejemplo 22 se utilizó para la detección. De esta manera, como se muestra en la Fig. 33, se observó un producto de degradación que contenía el polipéptido representado por ID. SEC. N° 6 en aproximadamente 16 kDa, de manera similar al tipo natural, para la OST311 recombinante con las mutaciones introducidas P174A, R175A, R175Q, H177A, T178A o S180A entre los que tenían sustituciones en los residuos de aminoácidos 174° hasta 180°. Sin embargo, no se observaron productos de degradación para ninguno de los OST311 recombinantes con las mutaciones introducidas R176A, R179A, R176Q, R179Q o R179W. Estos resultados sugieren que, en particular, los residuos de aminoácidos 176° Arg y 179° Arg desempeñan un papel importante en la escisión que tiene lugar entre los residuos de aminoácidos 179° Arg y 180° Ser. Es decir, la escisión se inhibe o se suprime por la sustitución de ambos residuos al menos con cualquier aminoácido de entre Ala, Gln o Trp. Por consiguiente, se espera que esté promovida la producción del polipéptido de longitud total usando este hallazgo.

## Ejemplo 29

Como se muestra en el Ejemplo 6, se escinde un producto recombinante obtenido por la expresión de OST311 en células de CHO o células COS entre la 179<sup>a</sup> arginina y 180<sup>a</sup> serina localizadas inmediatamente después del motivo RXXR, como se mostró en el Ejemplo 9. Como se muestra claramente en el Ejemplo 18, la actividad inductora de hipofosfatemia de la proteína OST311 se mantuvo en la proteína de longitud total que no se había escindido en este sitio. Además, resultó clara la implicación del motivo RXXR en esta escisión a partir del experimento de introducción de la mutación mostrado en los Ejemplos 19 y 28. Para producir y obtener OST311 recombinante de manera eficaz, evitar esta escisión es un problema importante, y la introducción de la mutación en el motivo RXXR mostrado en el Ejemplo 28 es uno de los procedimientos eficaces. Se sabe que la furina es una de las proteinasas que reconocen el motivo RXXR. Esta enzima está localizada en la región Trans-golgi, y se cree que escinde la proteína post traducida al reconocer el motivo RXXR en el proceso de secreción.

(1) *Implicación de la furina en la escisión de OST311*

El plásmido OST311/pCAGGS se introdujo en células LoVo deficientes en furina usando Transfectum (Promega, EEUU). A continuación, las células se cultivaron durante 48 horas. Cuando se analizó la proteína OST311 expresada y secretada de manera transitoria en la disolución del cultivo por medio de transferencia Western usando anticuerpo 311-148, no se detectó el producto escindido. Este resultado sugiere que la furina está implicada en la escisión observada cuando se produce OST311.

(2) *Evitar la escisión de OST311*

Se asumió de los resultados anteriores que la inhibición de la actividad de furina fue eficaz para mejorar la productividad de OST311, en la que no se escindió entre la 179<sup>a</sup> arginina y la 180<sup>a</sup> serina. Por consiguiente, resulta razonable que OST311 se exprese en un huésped, tal como las células Lovo que no tienen actividad de furina, o bajo una condición en la que la actividad de furina esté suprimida por la adición de un inhibidor de furina. Para suprimir la actividad

de furina de las células de CHO-OST311H, se expresó de manera transitoria  $\alpha$ 1-antitripsina Portland ( $\alpha$ 1-PDX) según el procedimiento informado por Benjannet S y col. (J. Biol Chem 272: 26210-26218, 1997), y a continuación se recogió el medio acondicionado. La relación del polipéptido de longitud total en los productos recombinantes aumentó, comparada con la del medio acondicionado de las células de control CHO-OST311H sin este gen. Por consiguiente, se concluyó que la eficacia de la producción de la proteína OST311 de longitud total puede elevarse introduciendo una sustancia que suprima la actividad de furina de manera extrínseca o intrínseca.

### Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se proporciona el uso de un polipéptido como se definió en ID. SEC. N° 4 que regula el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio y/o la calcificación. Se da a conocer el ADN que codifica el polipéptido, y se proporcionan también una composición farmacéutica que contiene el polipéptido como un ingrediente activo, y un anticuerpo que reconoce el polipéptido, una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo como un ingrediente activo, un procedimiento de diagnóstico que usa el anticuerpo, y una composición de diagnóstico.

### Texto libre del listado de secuencias

ID. SEC. N° 12: ADN sintético

ID. SEC. N° 13: ADN sintético

ID. SEC. N° 14: ADN sintético

ID. SEC. N° 15: ADN sintético

ID. SEC. N° 16: ADN sintético

ID. SEC. N° 17: ADN sintético

ID. SEC. N° 18: ADN sintético

ID. SEC. N° 19: ADN sintético

ID. SEC. N° 20: ADN sintético

ID. SEC. N° 21: ADN sintético

ID. SEC. N° 22: ADN sintético

ID. SEC. N° 23: ADN sintético

ID. SEC. N° 24: ADN sintético

ID. SEC. N° 25: ADN sintético

ID. SEC. N° 26: ADN sintético

ID. SEC. N° 27: ADN sintético

ID. SEC. N° 28: Péptido sintético

ID. SEC. N° 29: Péptido sintético

ID. SEC. N° 30: ADN sintético

ID. SEC. N° 31: ADN sintético

ID. SEC. N° 32: ADN sintético

ID. SEC. N° 33: ADN sintético

ID. SEC. N° 34: ADN sintético

ID. SEC. N° 35: ADN sintético

ID. SEC. N° 36: ADN sintético

## ES 2 344 679 T3

|    |                                   |
|----|-----------------------------------|
|    | ID. SEC. Nº 37: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 38: ADN sintético     |
| 5  | ID. SEC. Nº 39: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 40: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 41: ADN sintético     |
| 10 | ID. SEC. Nº 42: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 43: ADN sintético     |
| 15 | ID. SEC. Nº 44: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 45: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 46: ADN sintético     |
| 20 | ID. SEC. Nº 47: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 48: ADN sintético     |
| 25 | ID. SEC. Nº 49: Péptido sintético |
|    | ID. SEC. Nº 50: Péptido sintético |
|    | ID. SEC. Nº 51: Péptido sintético |
| 30 | ID. SEC. Nº 52: Péptido sintético |
|    | ID. SEC. Nº 53: ADN sintético     |
| 35 | ID. SEC. Nº 54: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 55: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 56: ADN sintético     |
| 40 | ID. SEC. Nº 57: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 58: ADN sintético     |
| 45 | ID. SEC. Nº 59: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 60: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 61: ADN sintético     |
| 50 | ID. SEC. Nº 62: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 63: ADN sintético     |
| 55 | ID. SEC. Nº 64: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 65: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 66: ADN sintético     |
| 60 | ID. SEC. Nº 67: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 68: ADN sintético     |
| 65 | ID. SEC. Nº 69: ADN sintético     |
|    | ID. SEC. Nº 70: ADN sintético     |

## ES 2 344 679 T3

ID. SEC. N° 71: ADN sintético

ID. SEC. N° 72: ADN sintético

5 ID. SEC. N° 73: ADN sintético

ID. SEC. N° 74: ADN sintético

10 ID. SEC. N° 75: ADN sintético

ID. SEC. N° 76: ADN sintético

ID. SEC. N° 77: ADN sintético

15 ID. SEC. N° 78: ADN sintético

ID. SEC. N° 79: ADN sintético

20 ID. SEC. N° 80: ADN sintético

ID. SEC. N° 81: ADN sintético

ID. SEC. N° 82: ADN sintético

25 ID. SEC. N° 83: ADN sintético

ID. SEC. N° 84: ADN sintético

30 ID. SEC. N° 85: ADN sintético

ID. SEC. N° 86: ADN sintético

ID. SEC. N° 87: ADN sintético

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada del grupo constituido por hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo, osteodistrofia renal, calcificación ectópica, osteoporosis e hipervitaminosis D.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está modificado por medio de al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por polietilenglicol, dextrano, poli (N-vinil-pirrolidona), homopolímero de polipropilenglicol, copolímero de poli-óxido de propileno y óxido de polietileno, poliol polioxietilado y alcohol polivinílico.

3. Uso de un anticuerpo que reacciona con el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades óseas.

4. Uso de un anticuerpo que reacciona con el polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 4, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada del grupo constituido por la osteoporosis, el raquitismo resistente a la vitamina D, la osteodistrofia renal, las enfermedades óseas asociadas a la diálisis, la osteopatía con hipocalcificación, la enfermedad de Paget, la osteomalacia inducida por tumores y el raquitismo/osteomalacia hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH).

5. Un anticuerpo que es un anticuerpo neutralizante del polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos representada por ID. SEC. N° 4.

FIG.1

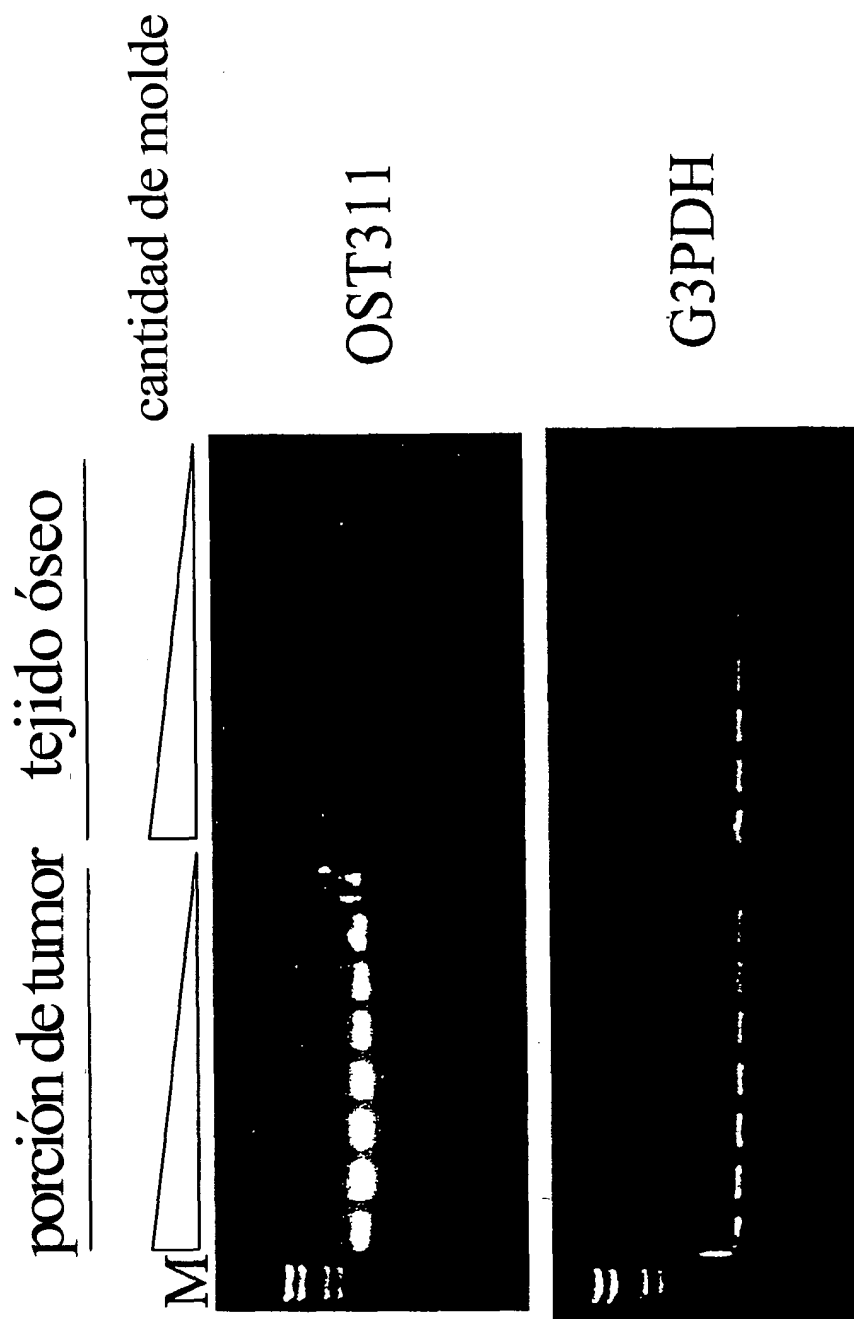
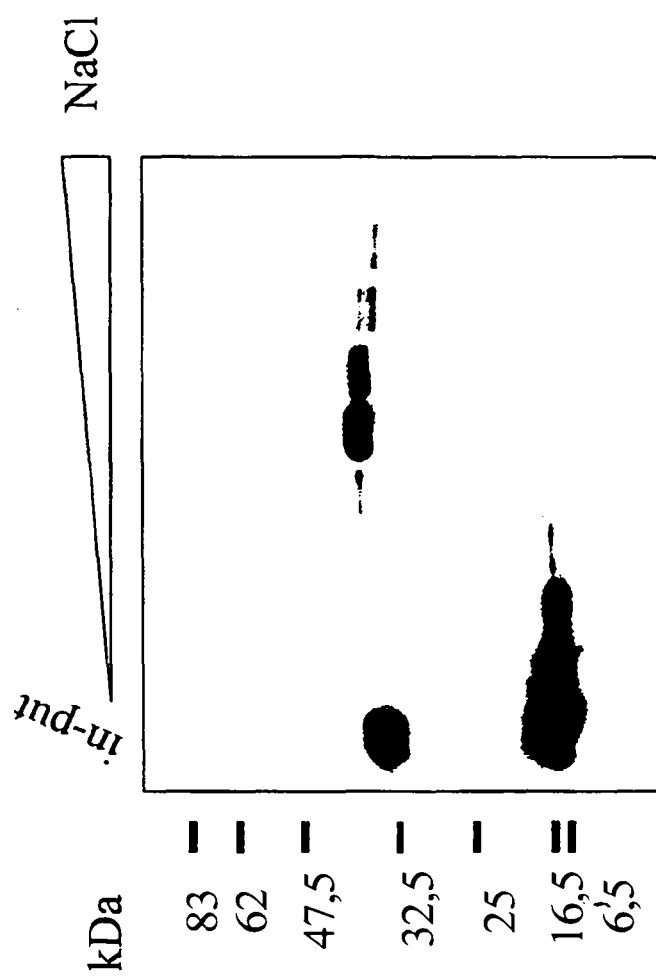
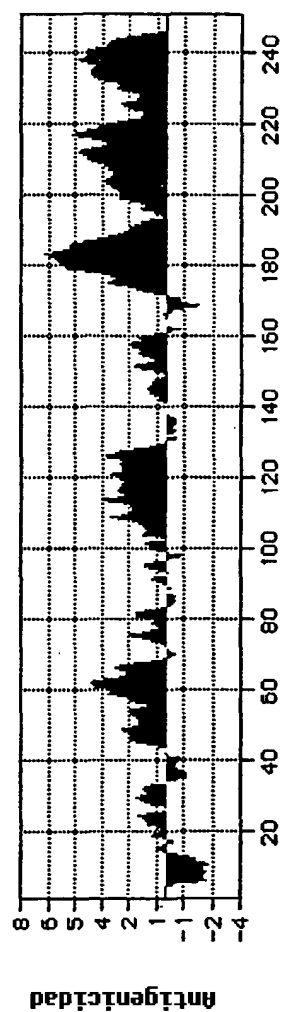


FIG.2

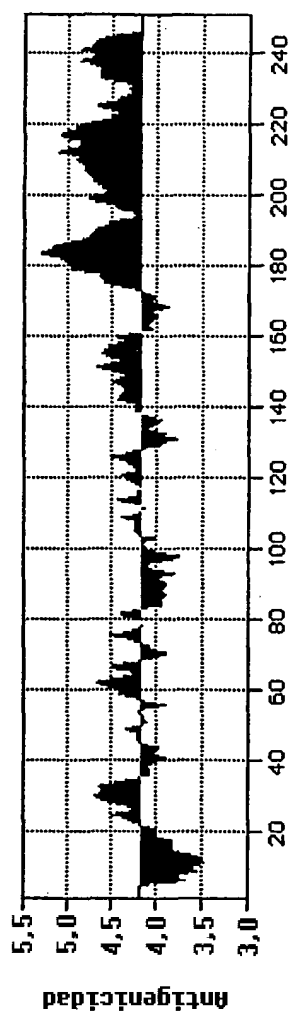


**FIG.3A**

Antigenicidad de Parker: Ventana = 11



Índice de Antigenicidad de Protrusión: Ventana = 11



Antigenicidad de Welling: Ventana = 11

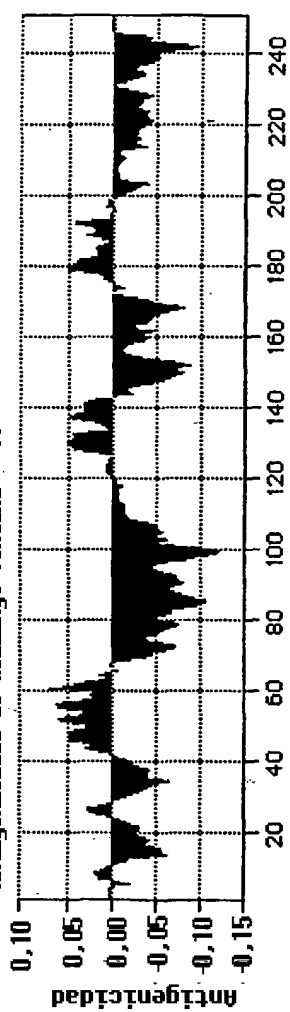
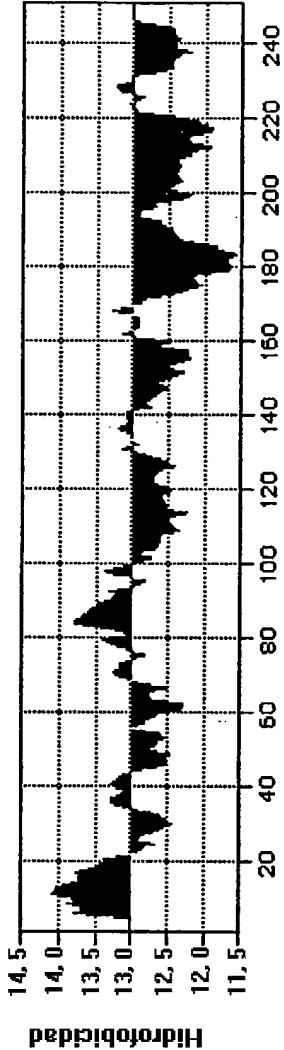
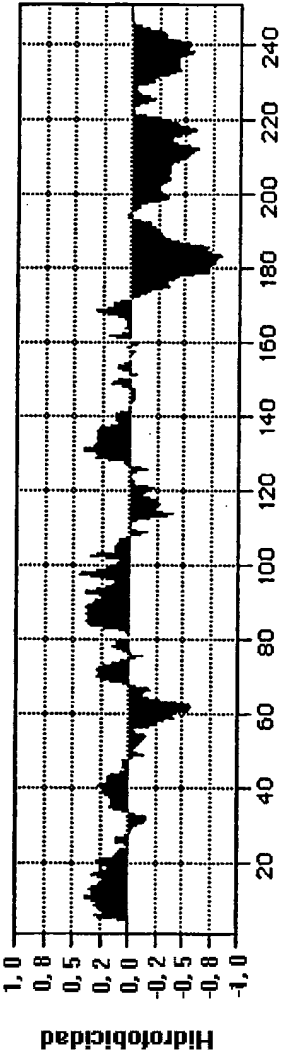


FIG.3B

Hidrofobicidad de Manavalan:    Ventana =11



Hidrofobicidad de Sweet/Eisenberg:    Ventana =11



Hidrofobicidad de von Heijne:    Ventana =11

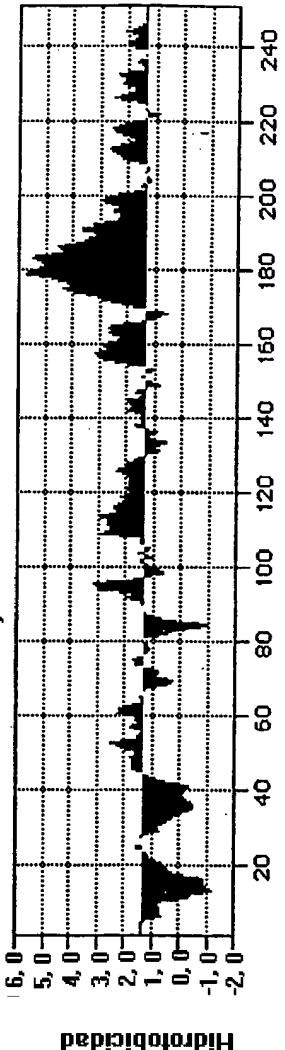
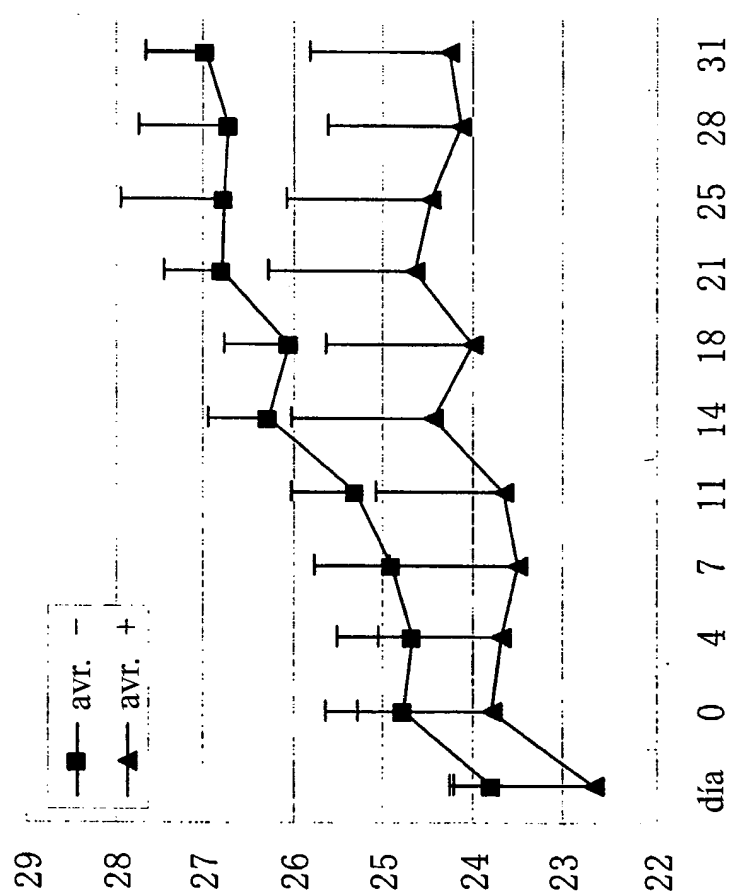
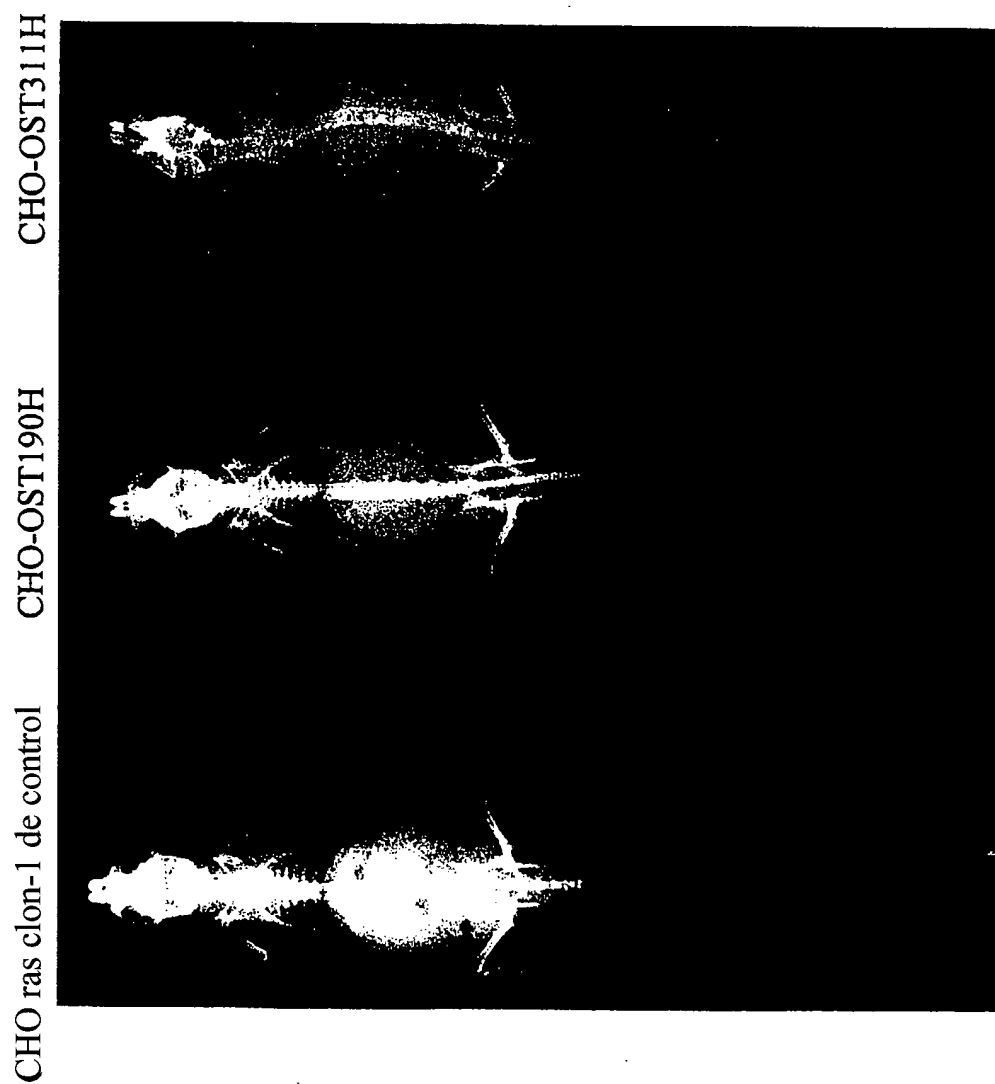


FIG.4



**FIG.5**



Residuos N° 82 al N° 251 de la secuencia de aminoácidos de ID. Sec. N° 2

% de coincidencia 69, 4

[illegible]

FIG.7A

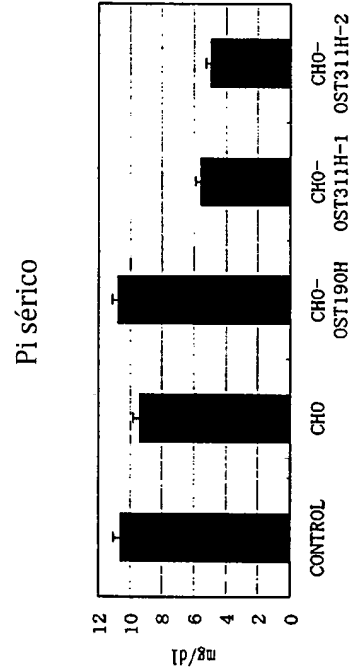


FIG.7B

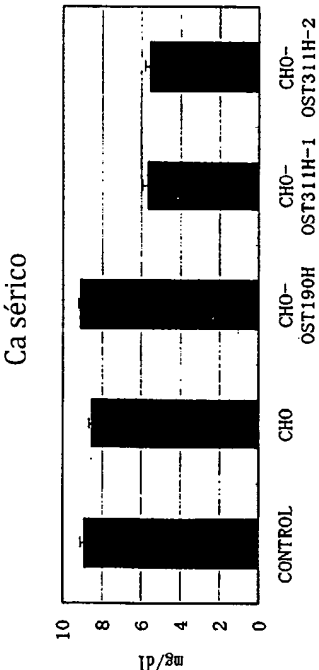


FIG.7C

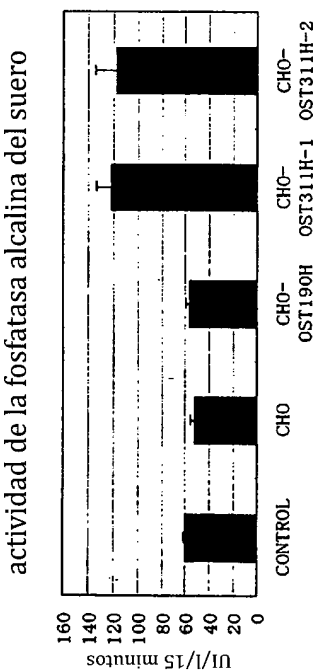


FIG.8

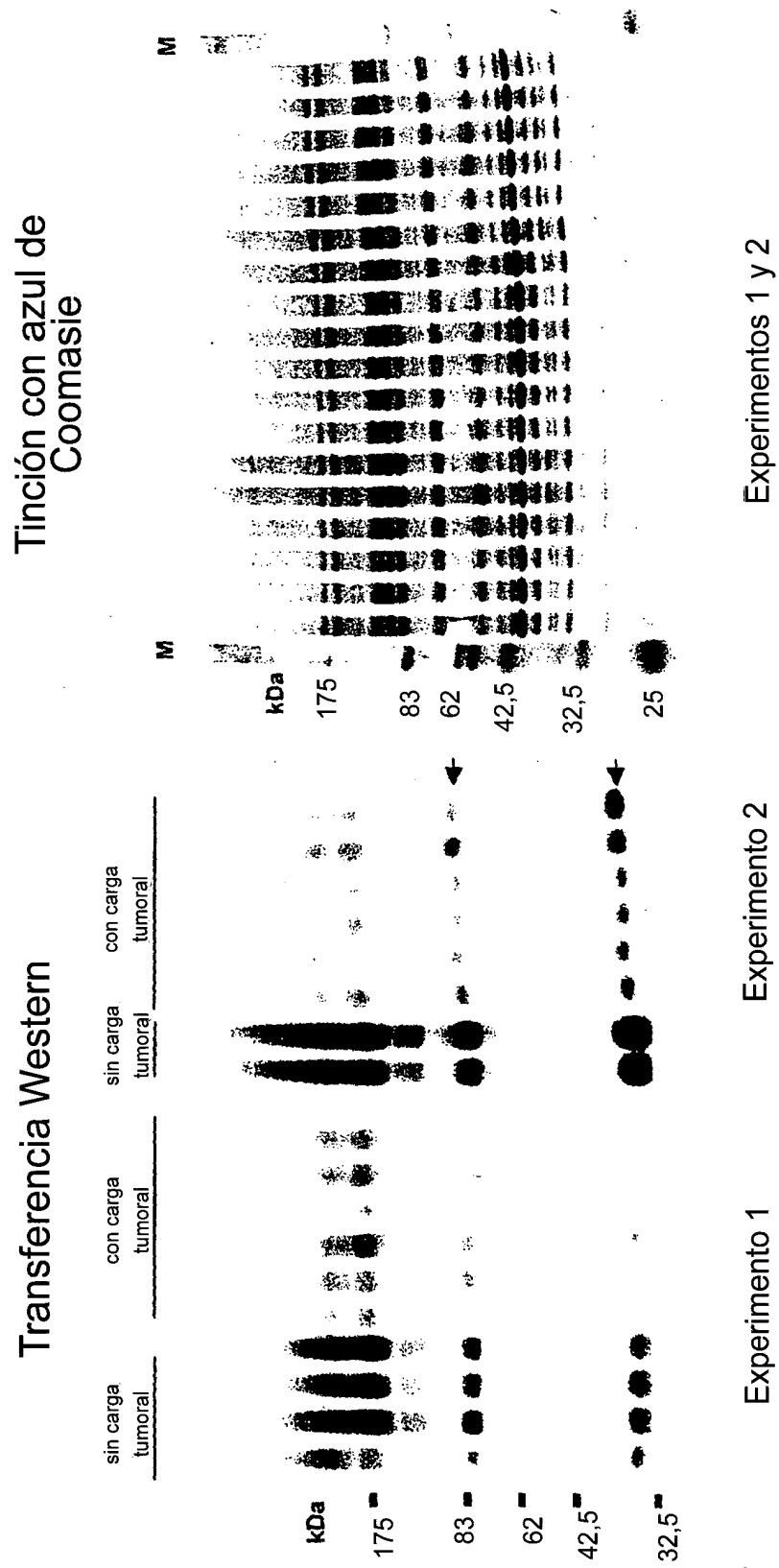


FIG. 9A

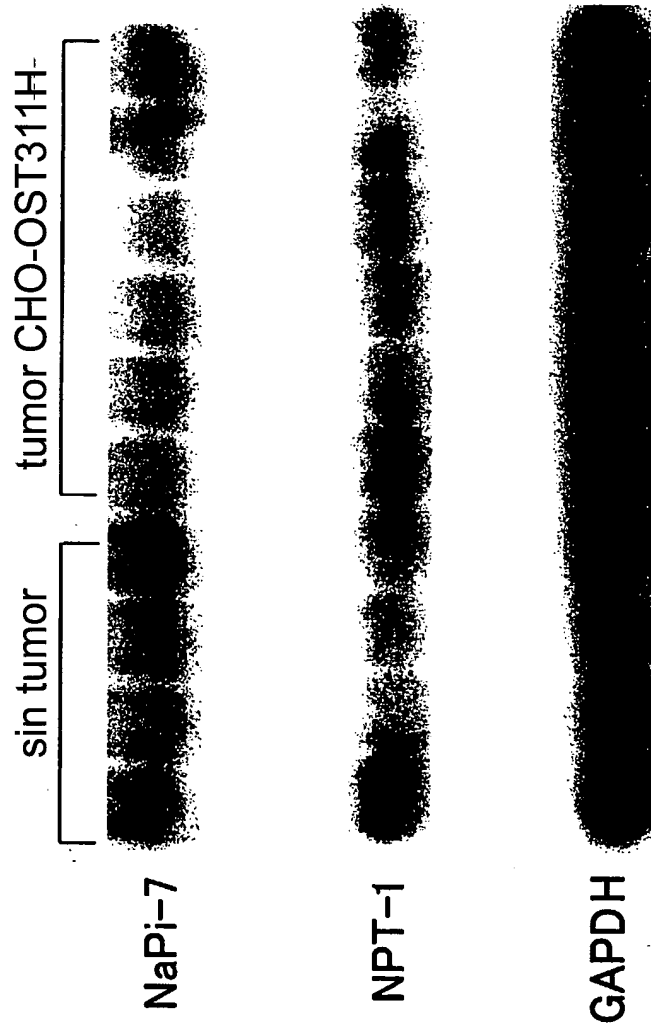


FIG.9B

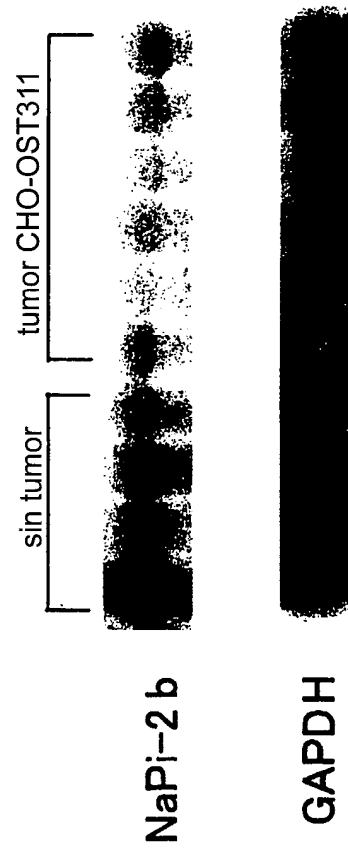


FIG.9C

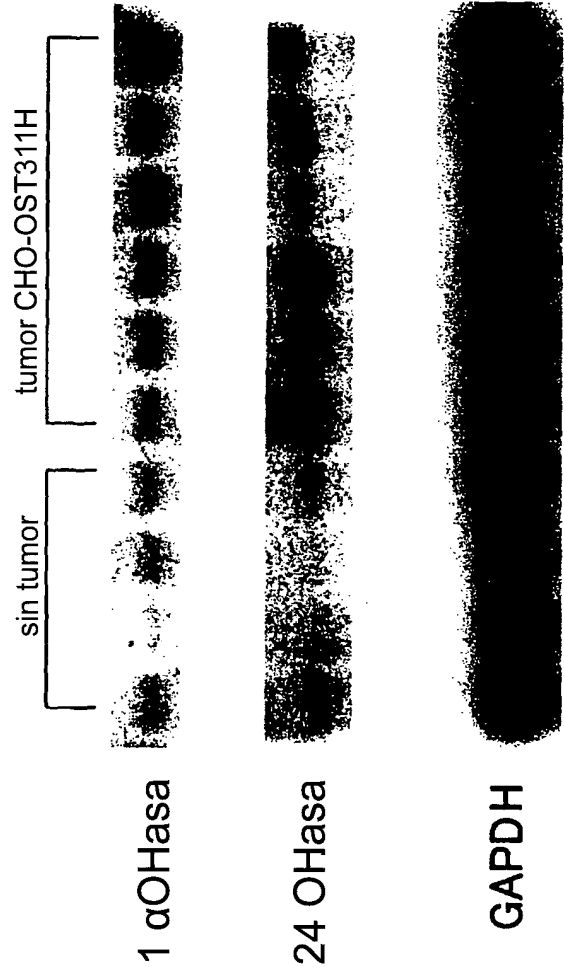


FIG.10

sin tumor      CHO      OST190H      OST311H

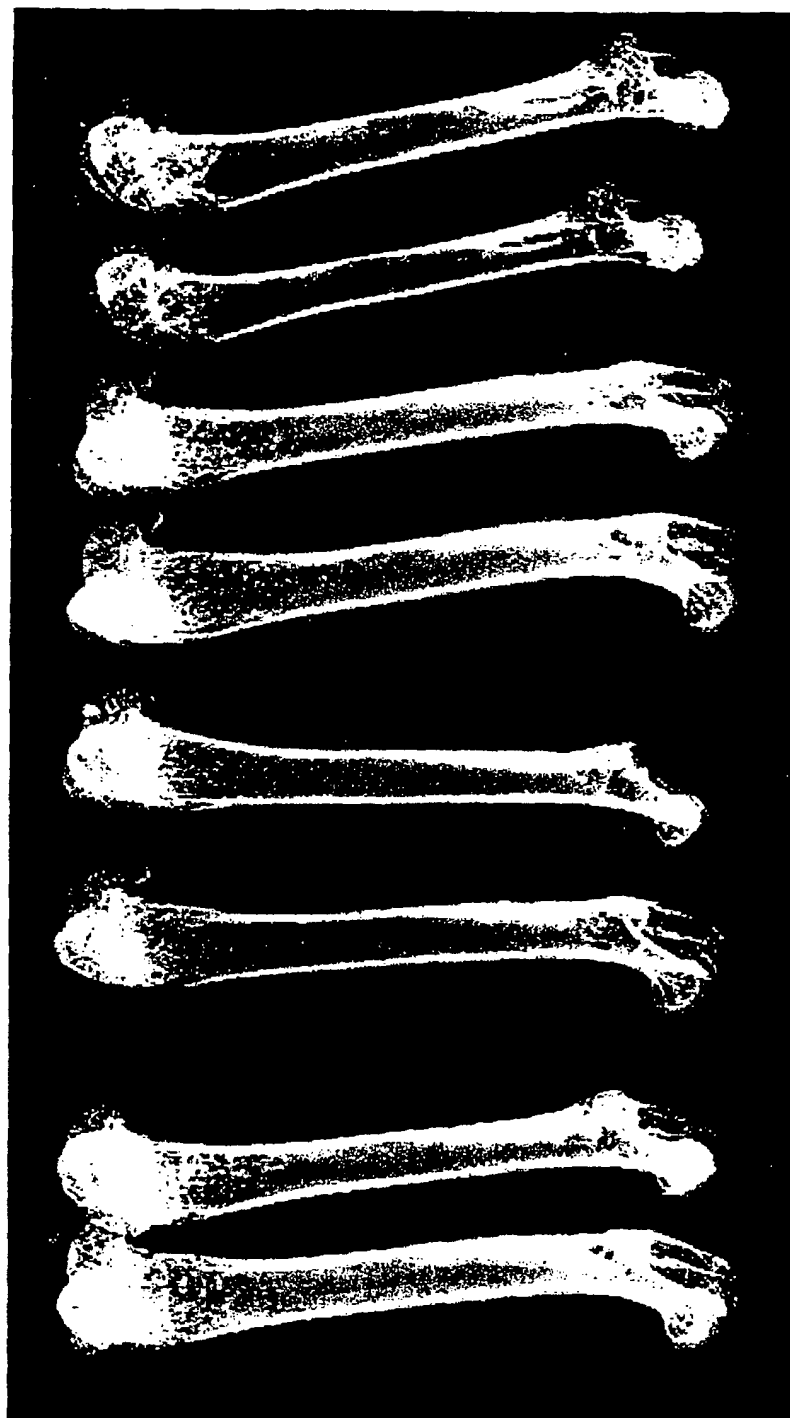


FIG.11A

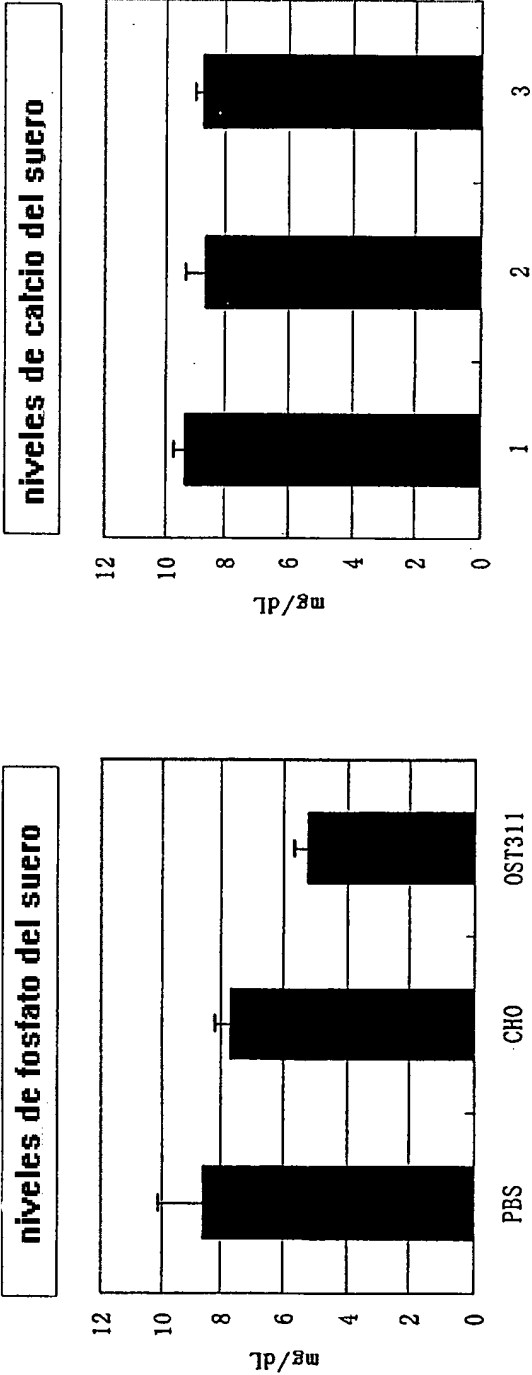


FIG.11B

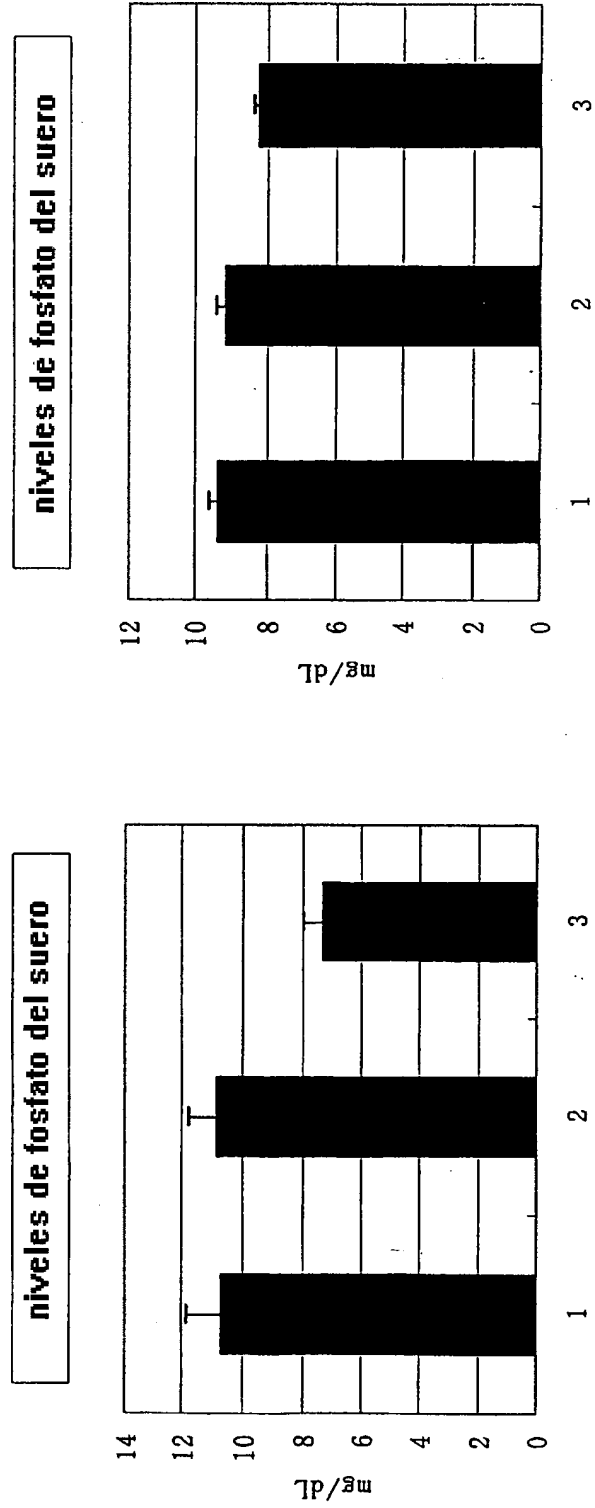


FIG.12

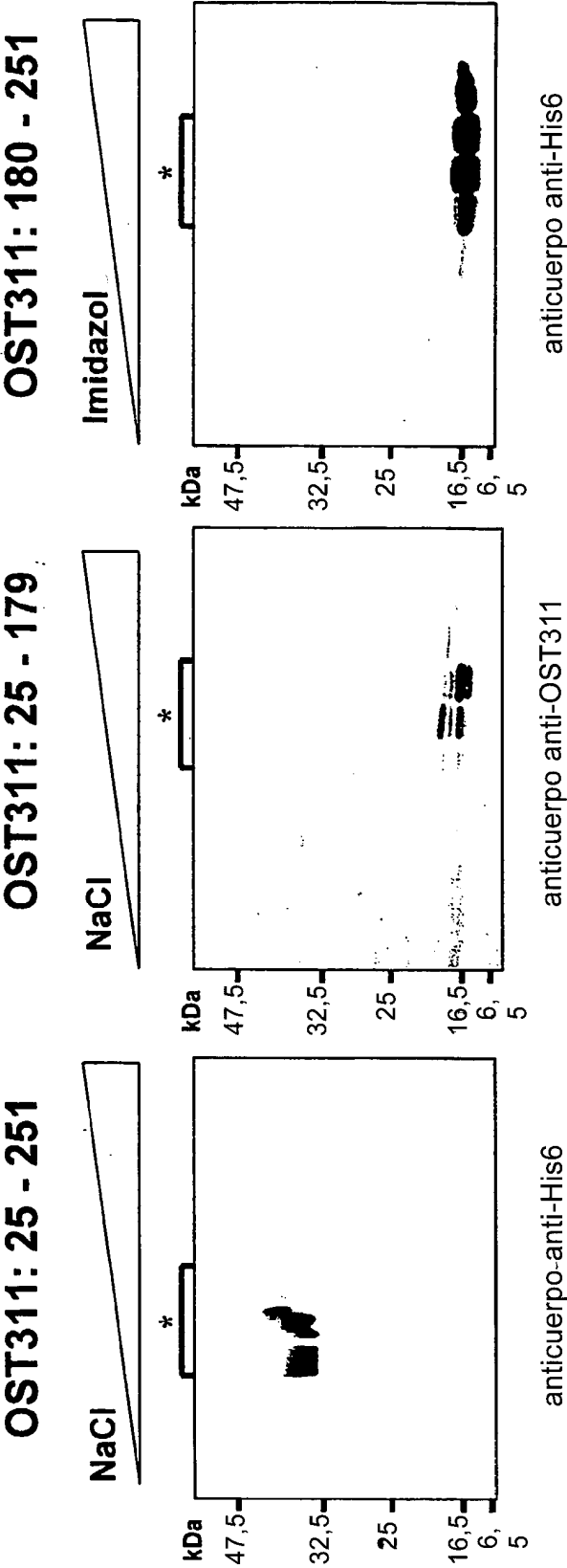


FIG.13

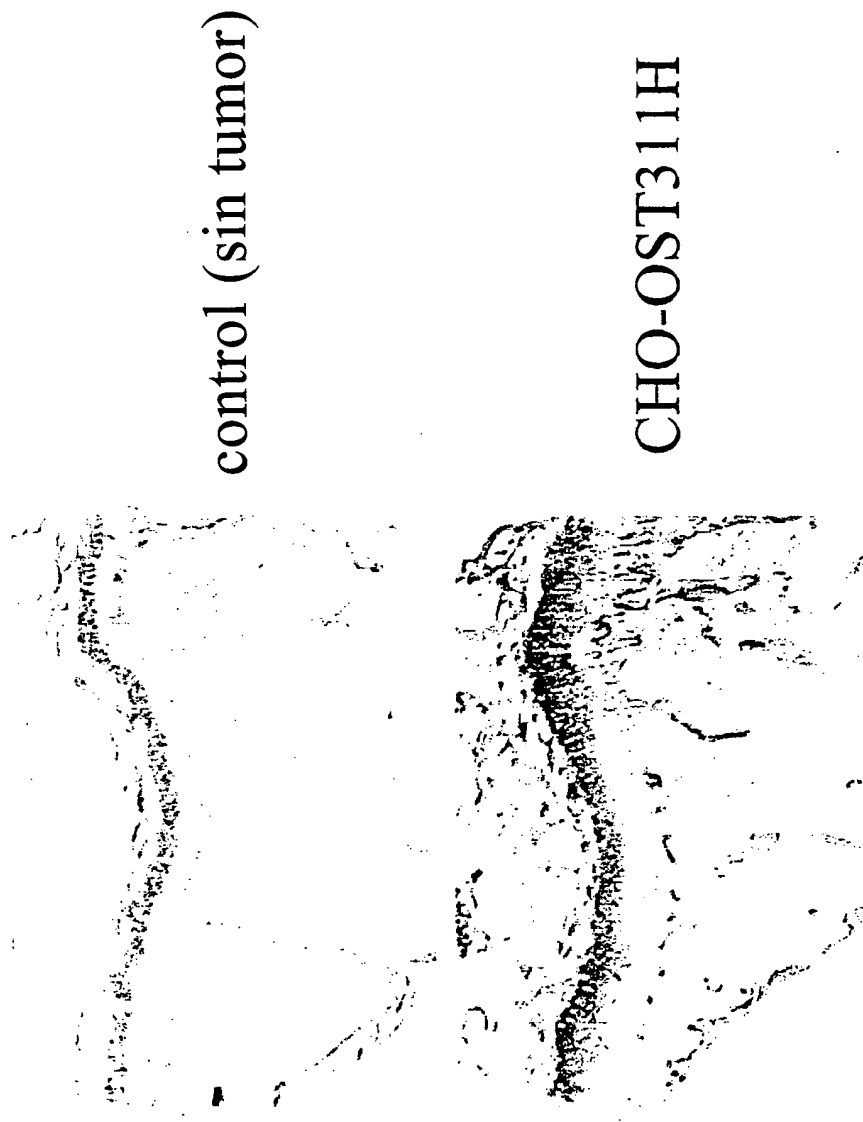
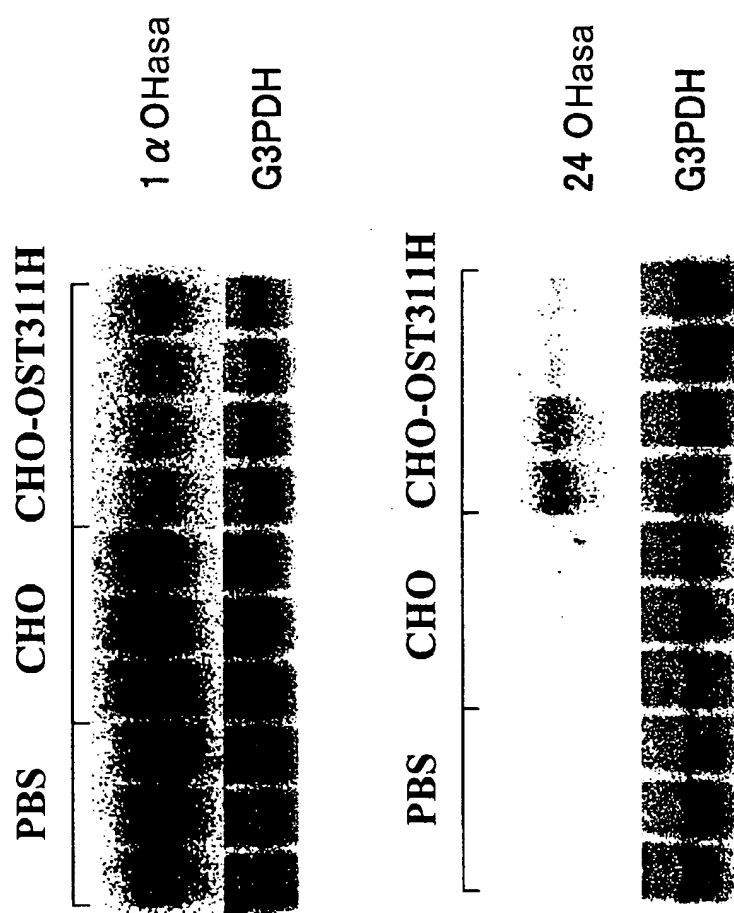


FIG.14



15

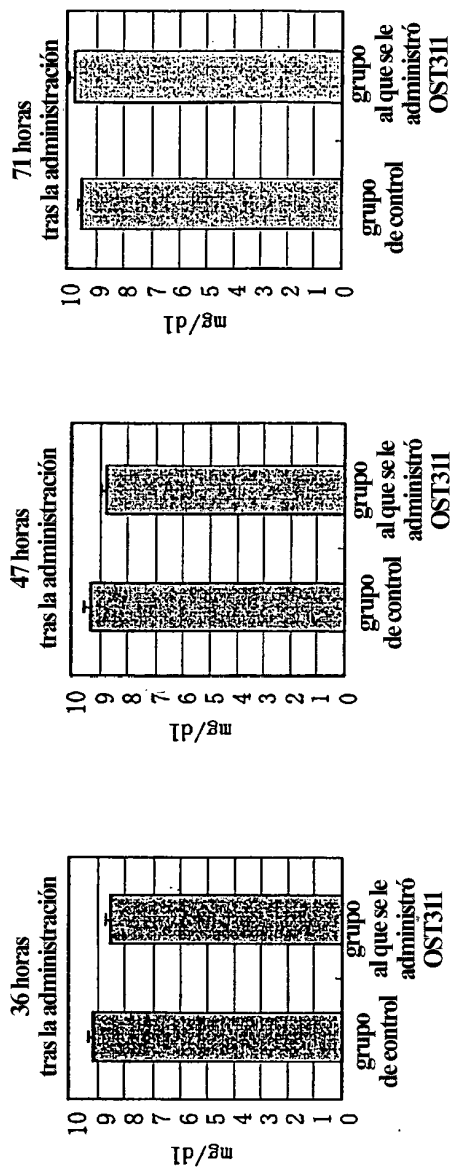
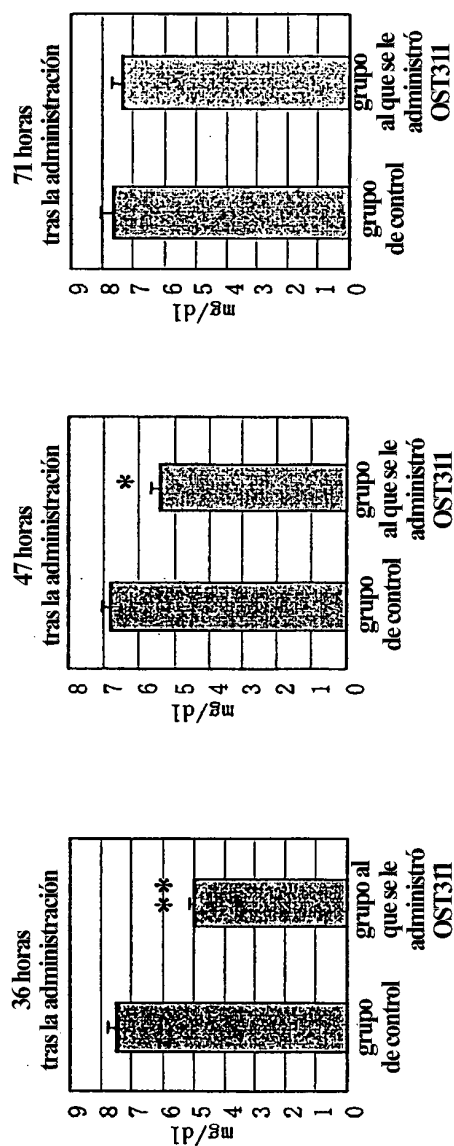
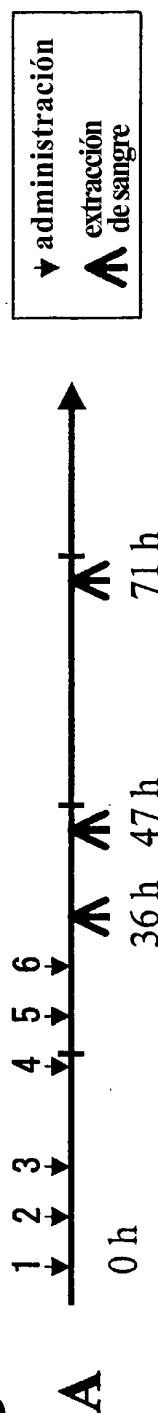


FIG.16

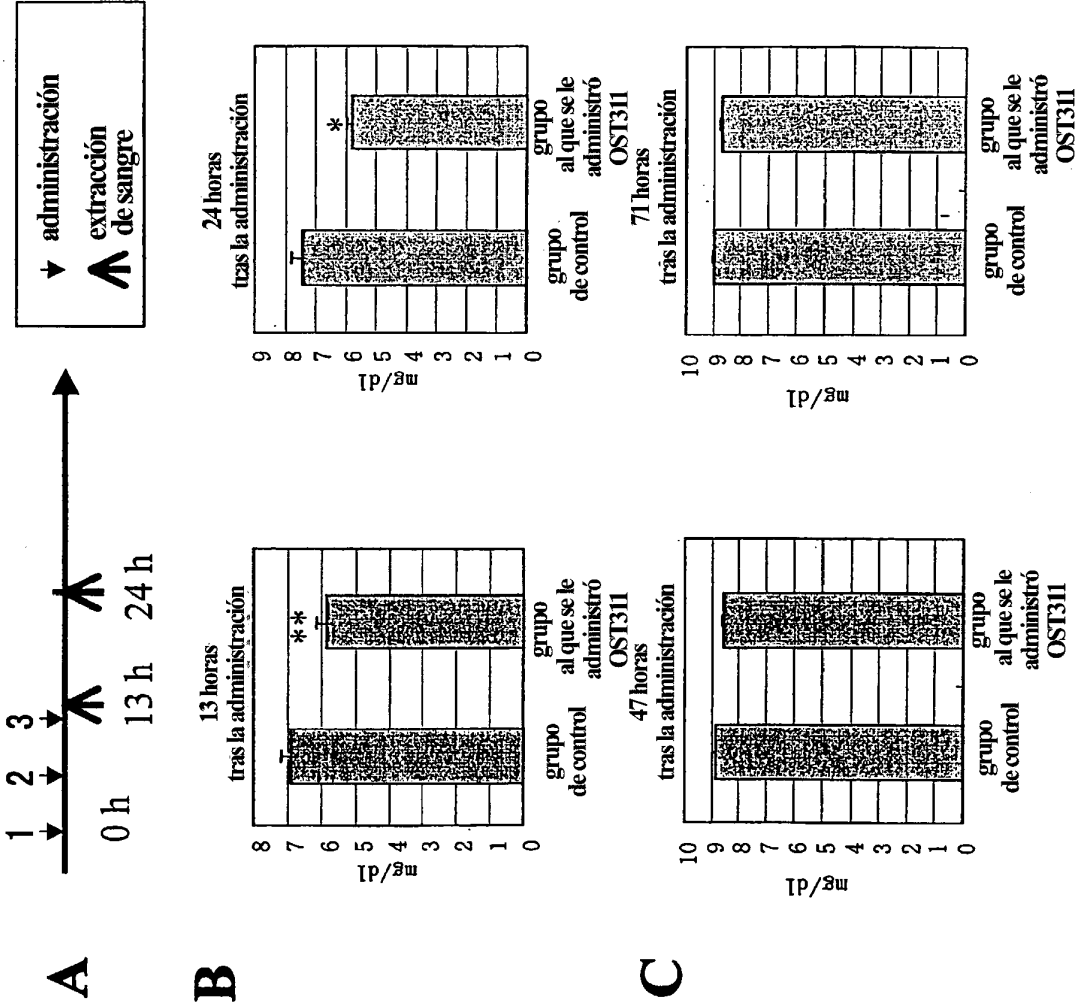


FIG.17

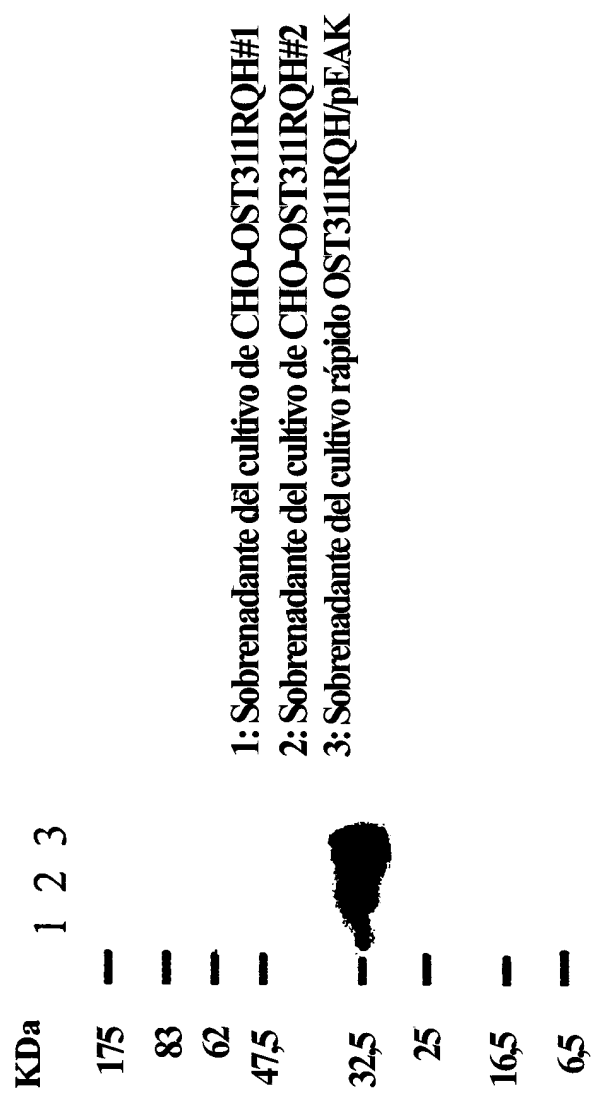


FIG.18

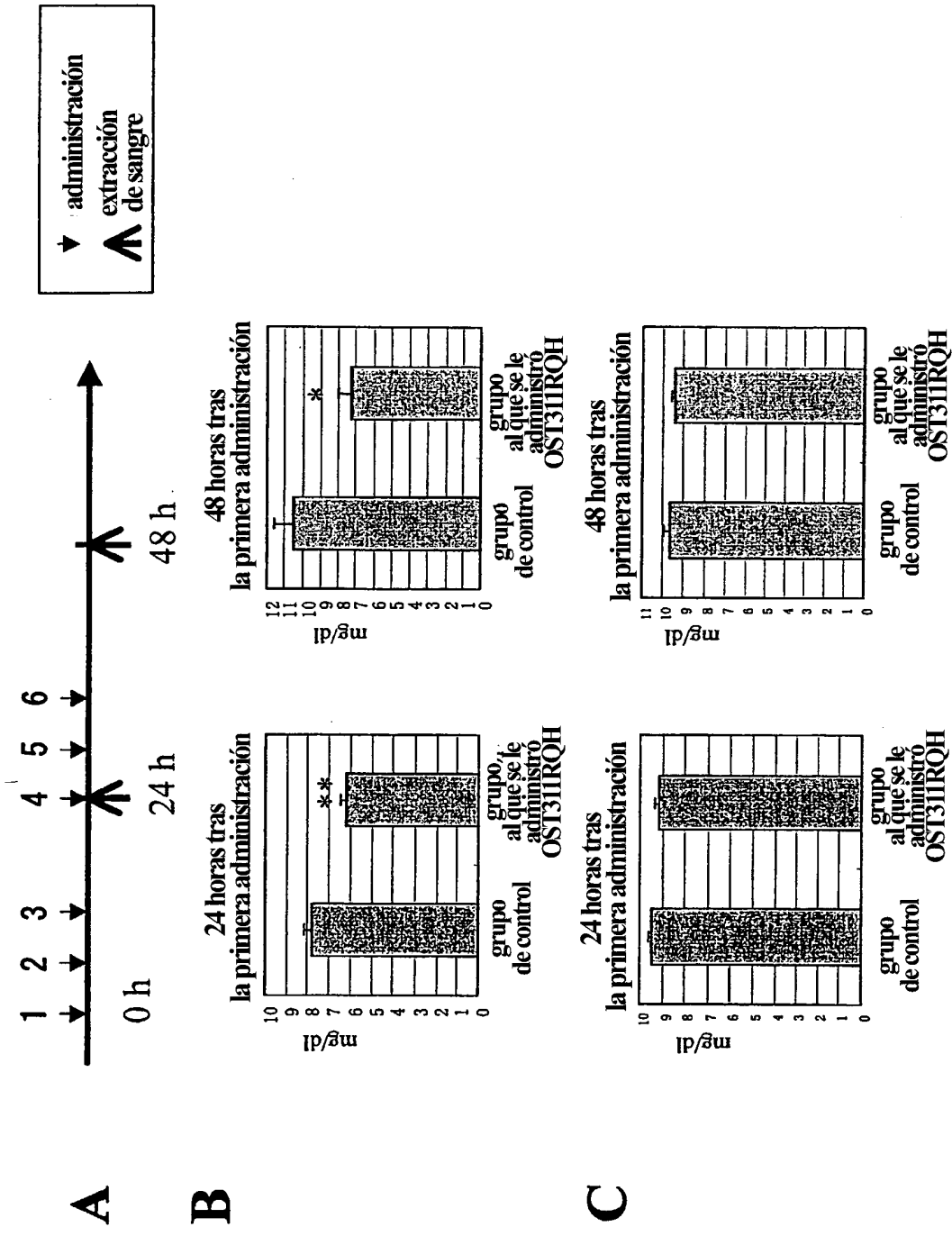


FIG.19

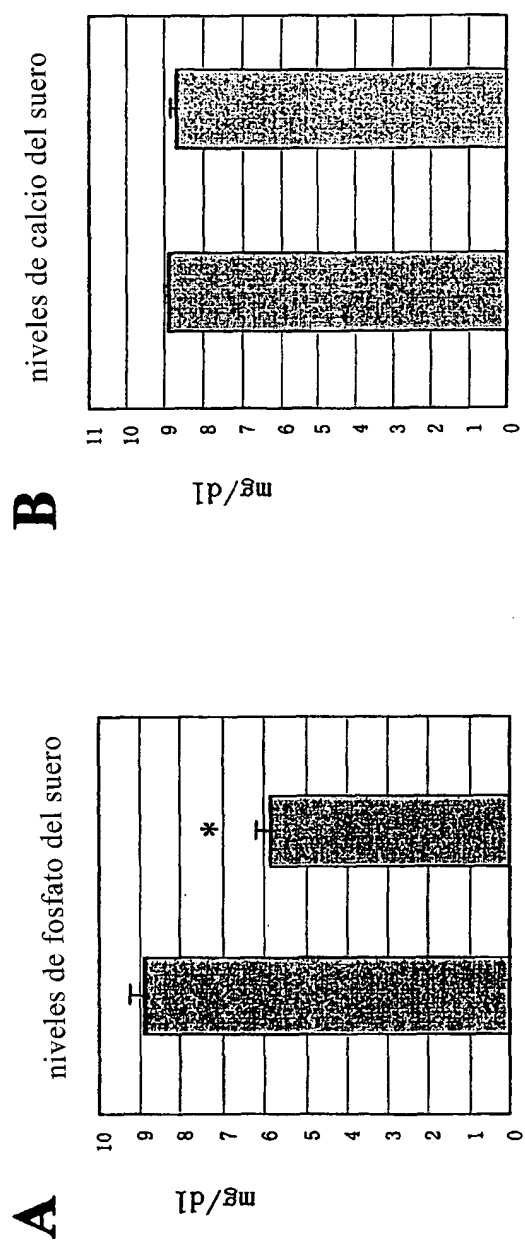


FIG.20



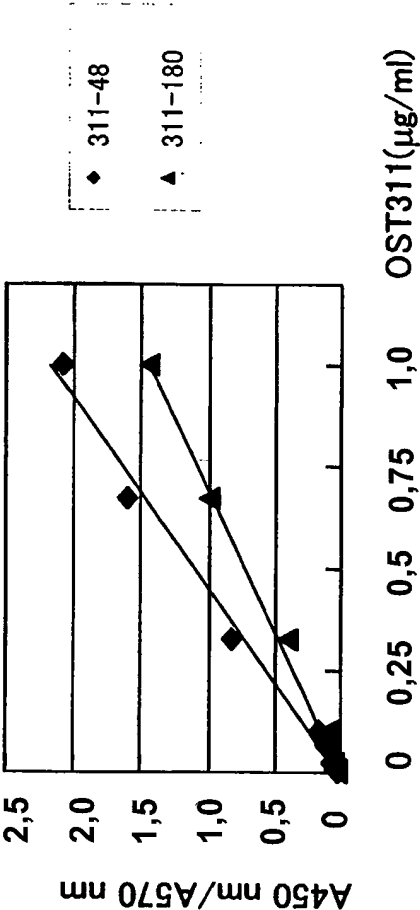
FIG.21

A

| anticuerpo biotinilado<br>para detección | anticuerpo inmovilizado |         |         |         |         |         |  |  |  |  |
|------------------------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--|--|--|--|
|                                          | 311-48                  | 311-114 | 311-148 | 311-170 | 311-180 | 311-210 |  |  |  |  |
| 311-48                                   | 0,014                   | 0,022   | 0,027   | 0,019   | 0,019   | 0,016   |  |  |  |  |
| 311-114                                  | 0,024                   | 0,018   | 0,020   | 0,016   | 0,018   | 0,018   |  |  |  |  |
| 311-148                                  | 0,131                   | 0,127   | 0,102   | 0,119   | 0,106   | 0,098   |  |  |  |  |
| 311-170                                  | 0,030                   | 0,027   | 0,041   | 0,027   | 0,029   | 0,027   |  |  |  |  |
| 311-180                                  | 0,082                   | 0,081   | 0,110   | 0,080   | 0,103   | 0,069   |  |  |  |  |
| 311-210                                  | 0,064                   | 0,060   | 0,071   | 0,052   | 0,059   | 0,052   |  |  |  |  |

B

A450 nm/A570 nm



**FIG. 22**

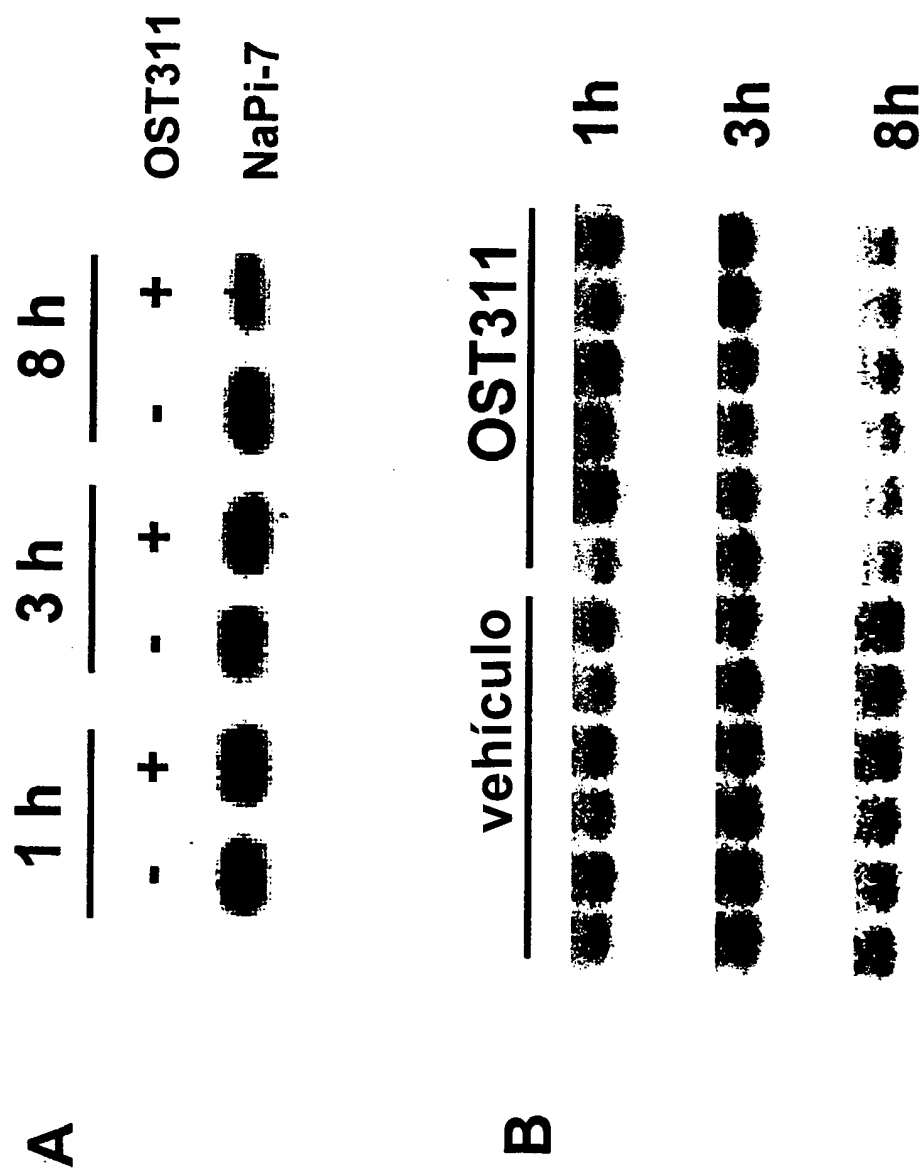


FIG.23

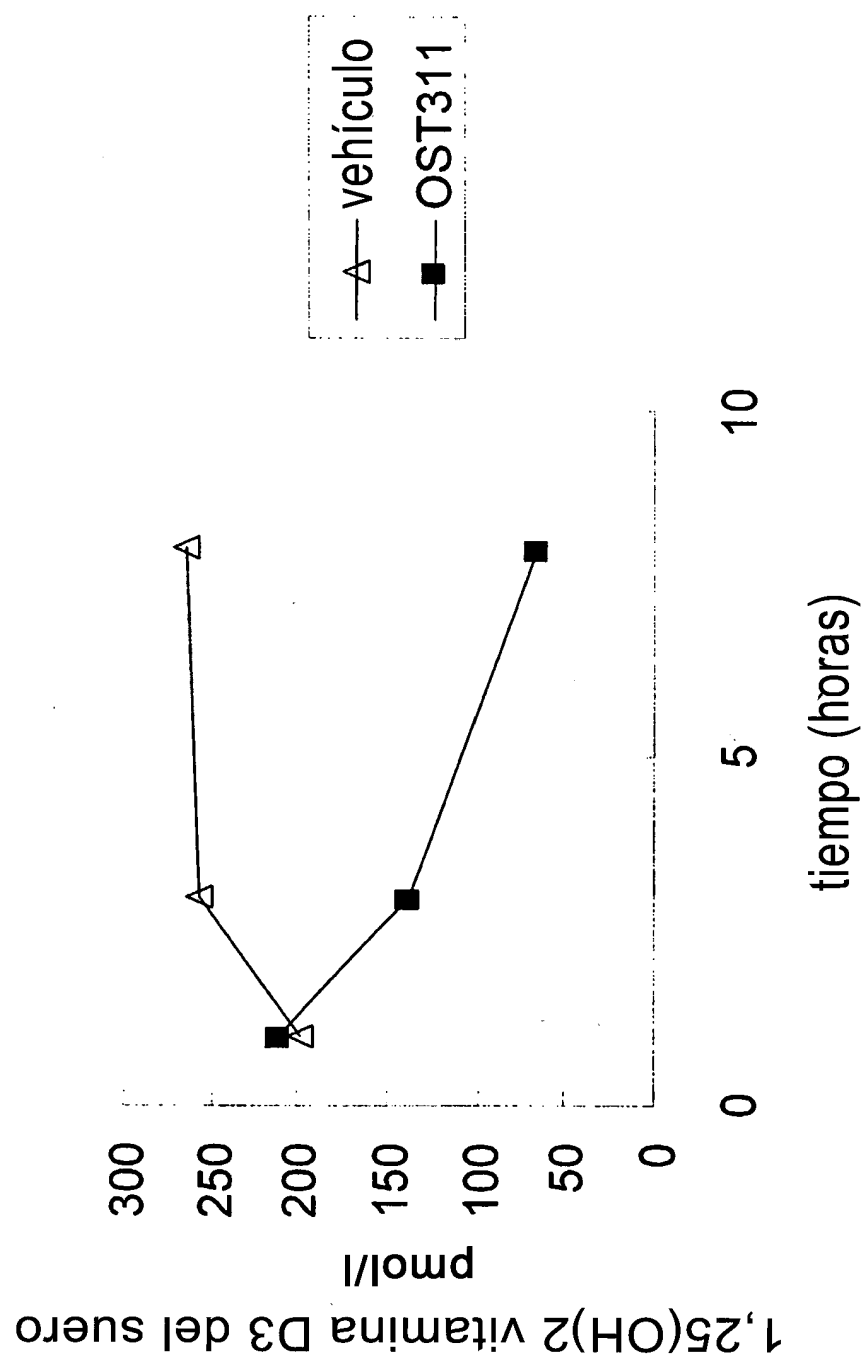
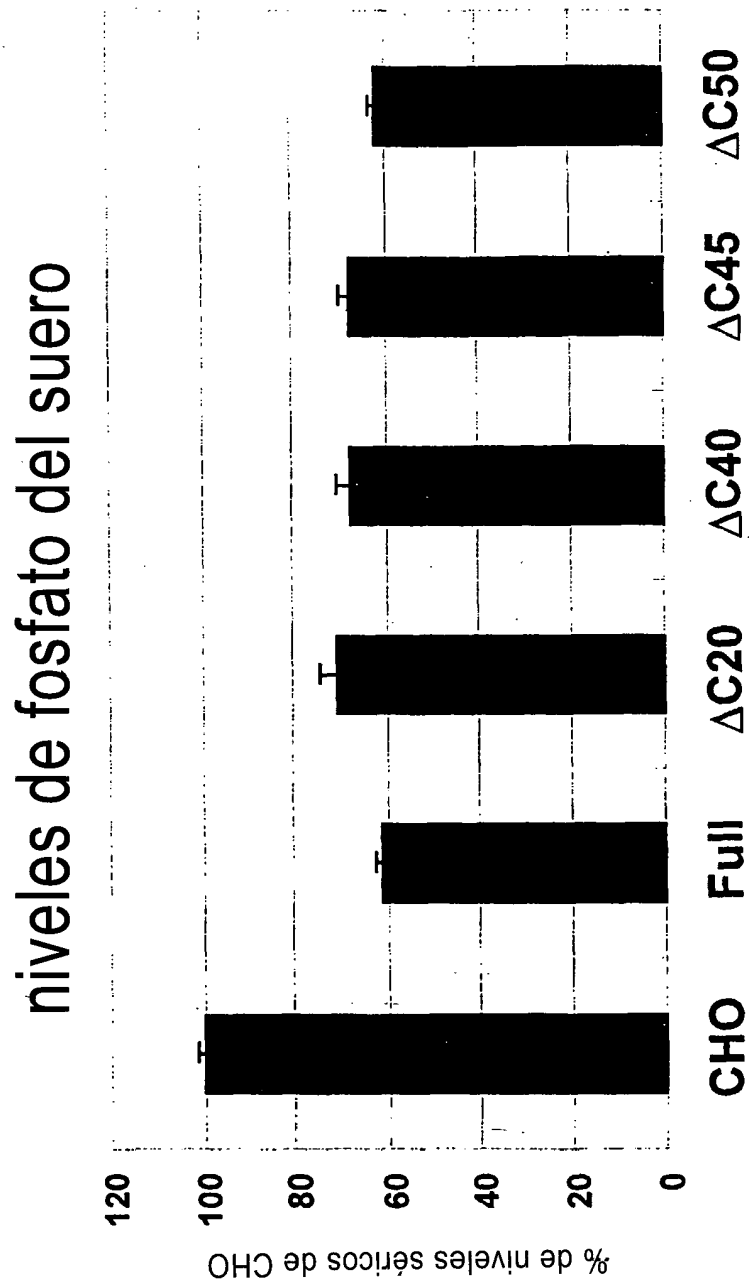


FIG.24



FIG.25



# FIG.26

His—OST311

MK—OST311

ATGGGCAGCAGCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCGCGGCGAGCCAT  
M G S S H H H H H S S S G L V P R G S H  
atgTATCCCAATGCCTCCCCACTGCTGGCTCCAGCTGGGTGGCTGATCCACCTGTAC  
M Y P N A S P L L G S S W G G L I H L Y  
ACAGCCACAGCCAGGAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGC  
T A T A R N S Y H L Q I H K N G H V D G  
GCACCCCATCAGACCATCTACAGTGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTG  
A P H Q T I Y S A L M I R S E D A G F V  
GTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTCAGAGGCAACATTTT  
V I T G V M S R R Y L C M D F R G N I F  
GGATCACACTATTTCGACCCGAGAACTGCAGGTTCCAAACACAGACGCTGGAAACGGG  
G S H Y F D P E N C R F Q H Q T L E N G  
TAGGACGTCTACACTCTCCTCAGTATCAGTTCTGGTCAGTCTGGCCGCGGAGAGA  
Y D V Y H S P Q Y H F L V S L G R A K R  
GGCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCTCTGCCGAGGACGAG  
A F L P G M N P P Y S Q F L S R R N E  
ATCCCCCTAATTCATTCAACACCCCGATACACGGGGGCACACCGGAGCGCCGAGGAC  
I P L I H F N T P I P R R H T R S A E D  
GACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCTGAAGCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCG  
D S E R D P L N V L K P R A R M T P A P  
GGCTCGTGTTCACAGGAGCTCCCGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCA  
A S C S Q E L P S A E D N S P M A S D P  
TTAGGGGTGGTCAGGGCGGTGAGTGAACACGACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGGC  
L G V V R G G R V N T H A G G T G P E G  
TGCGGCCCTTCGCCAAGTTCTATAG  
C R P F A K F I \*

atgaaaTACCGGAACGCTTCCCCGCTGCTGGgtccagctgGGGTGGCCTGATCCACCTG  
M K Y P N A S P L L G S S W G G L I H L  
TACACAGCCACAGCCAGGAAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAGAATGGCCATGTGGAT  
Y T A T A R N S Y H L Q I H K N G H V D  
GGCGACCCCATCAGACCATCTACAGTGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTT  
G A P H Q T I Y S A L M I R S E D A G F  
GTGGTATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTCAGAGGCAACATT  
V V I T G V M S R R Y L C M D F R G N I  
TTTGATCACACTATTTCGACCCGAGAACTGCAGGTTCCAAACACAGACGCTGGAAAC  
F G S H Y F D P E N C R F Q H Q T L E N  
GGTACGACGCTACCACTCTCCTCAGTATCAGTTCTGGTCAGTCTGGGCCGCGGAG  
G Y D V Y H S P Q Y H F L V S L G R A K  
AGAGCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCTGTCCCCGGAGGAC  
R A F L P G M N P P Y S Q F L S R R N  
GAGATCCCCCTAATTCATTCAACACCCCGATACACGGGGGCACACCGGAGCGCGGAG  
E I P L I H F N T P I P R R H T R S A E  
GACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCTGAAGCCCGCGGCGGATGACCCCGGCC  
D D S E R D P L N V L K P R A R M T P A  
CCGGCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAGCGCGGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGAC  
P A S C S Q E L P S A E D N S P M A S D  
CCATTAGGGGTGGTCAGGGCGGTGAGTGAACACGACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAA  
P L G V V R G G R V N T H A G G T G P E  
GGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCTATAG  
G C R P F A K F I \*

ES 2 344 679 T3

FIG.27

His-OST311

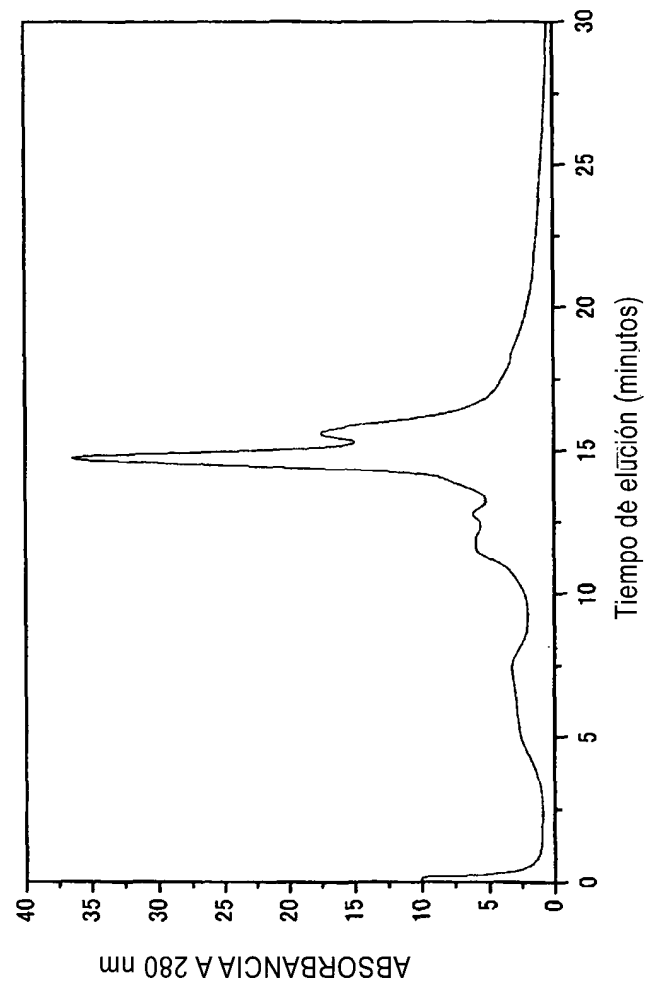


FIG.28

MK-OST311

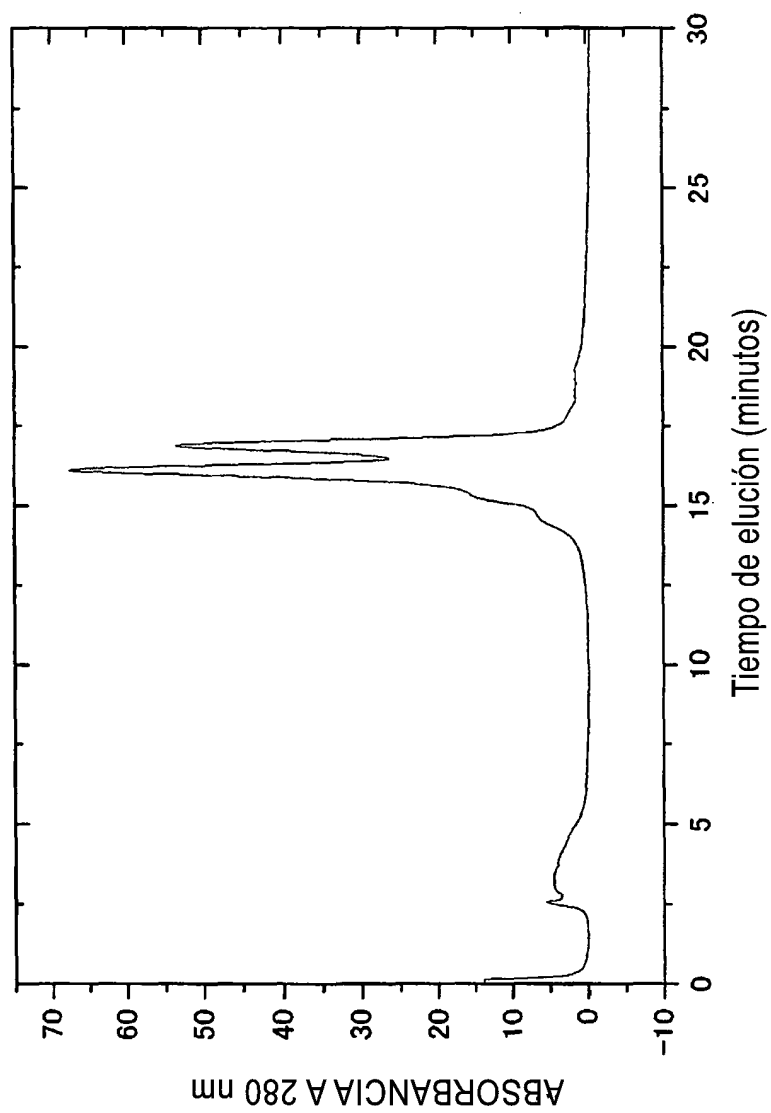


FIG.29

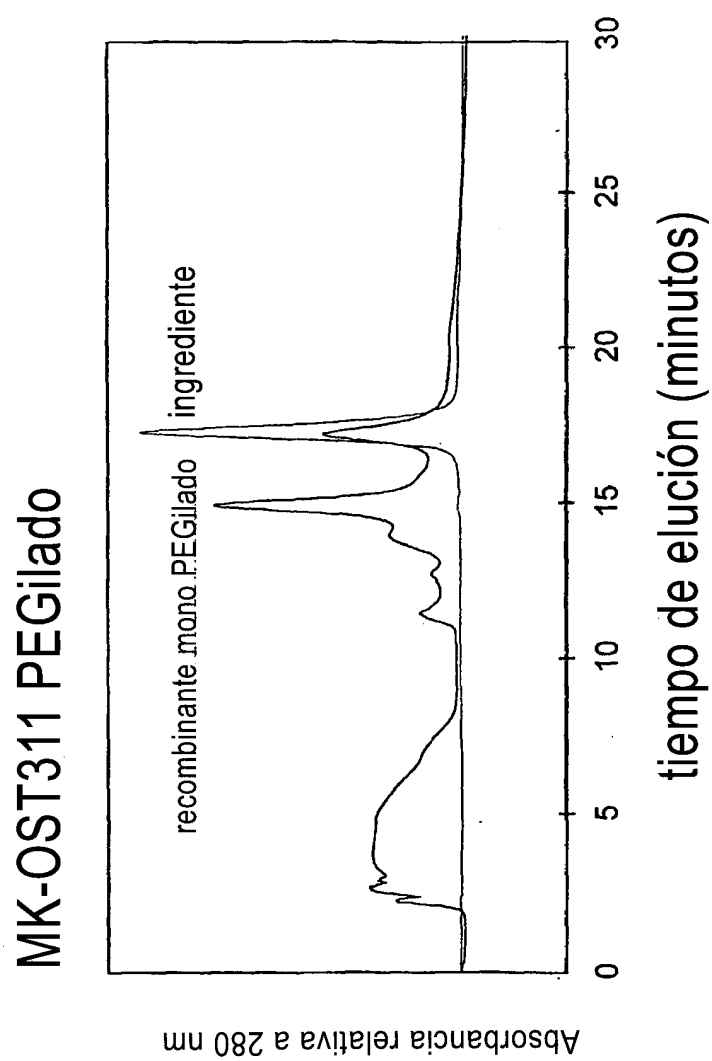


FIG.30

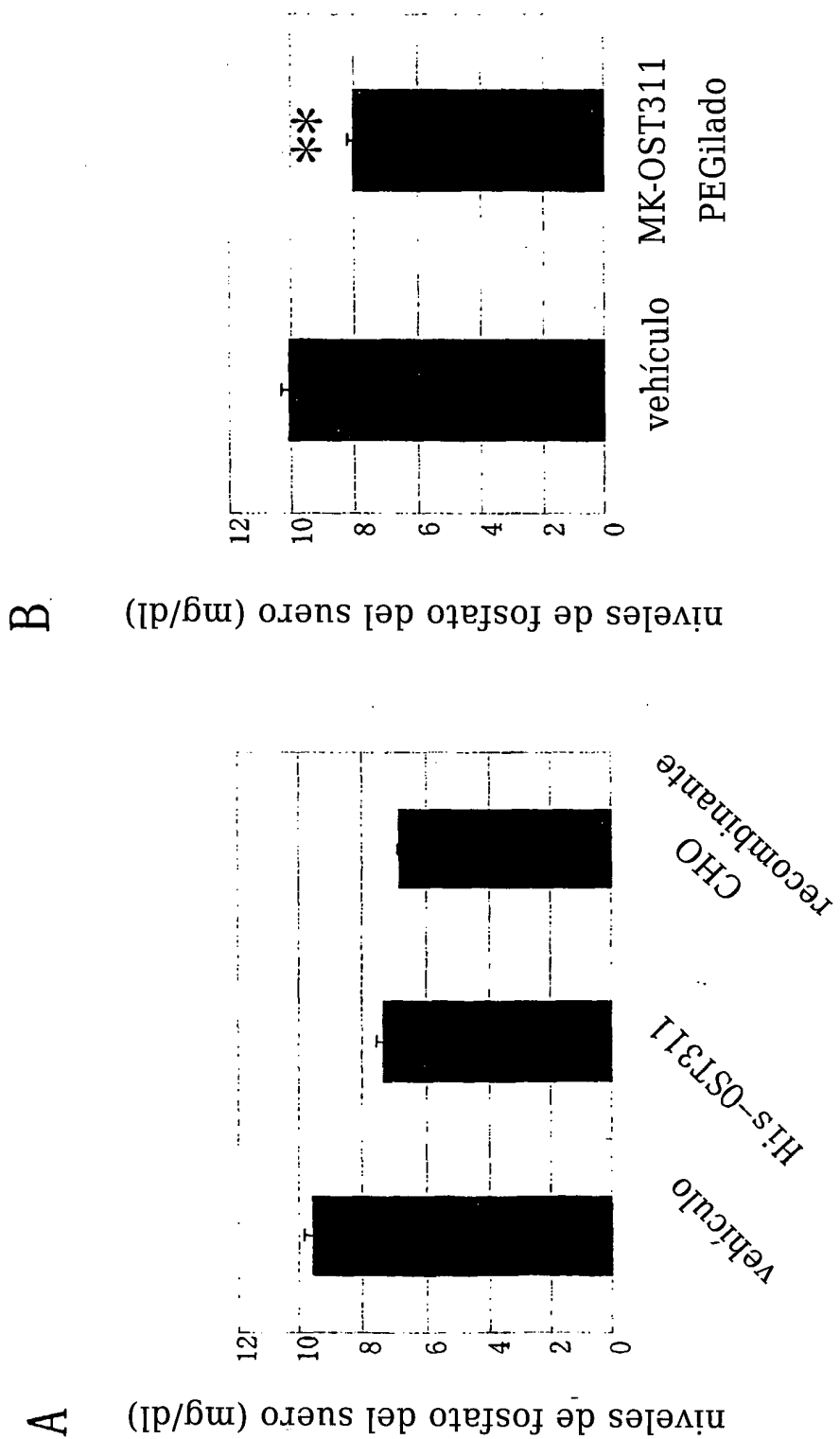


FIG.31

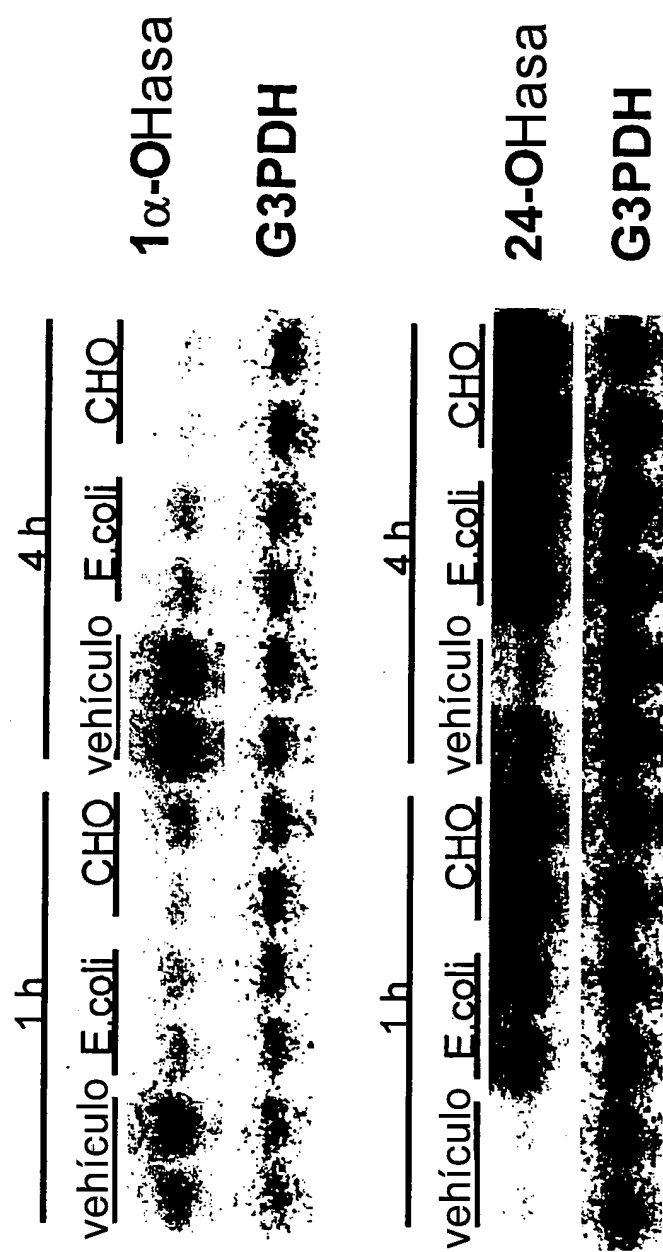


FIG.32

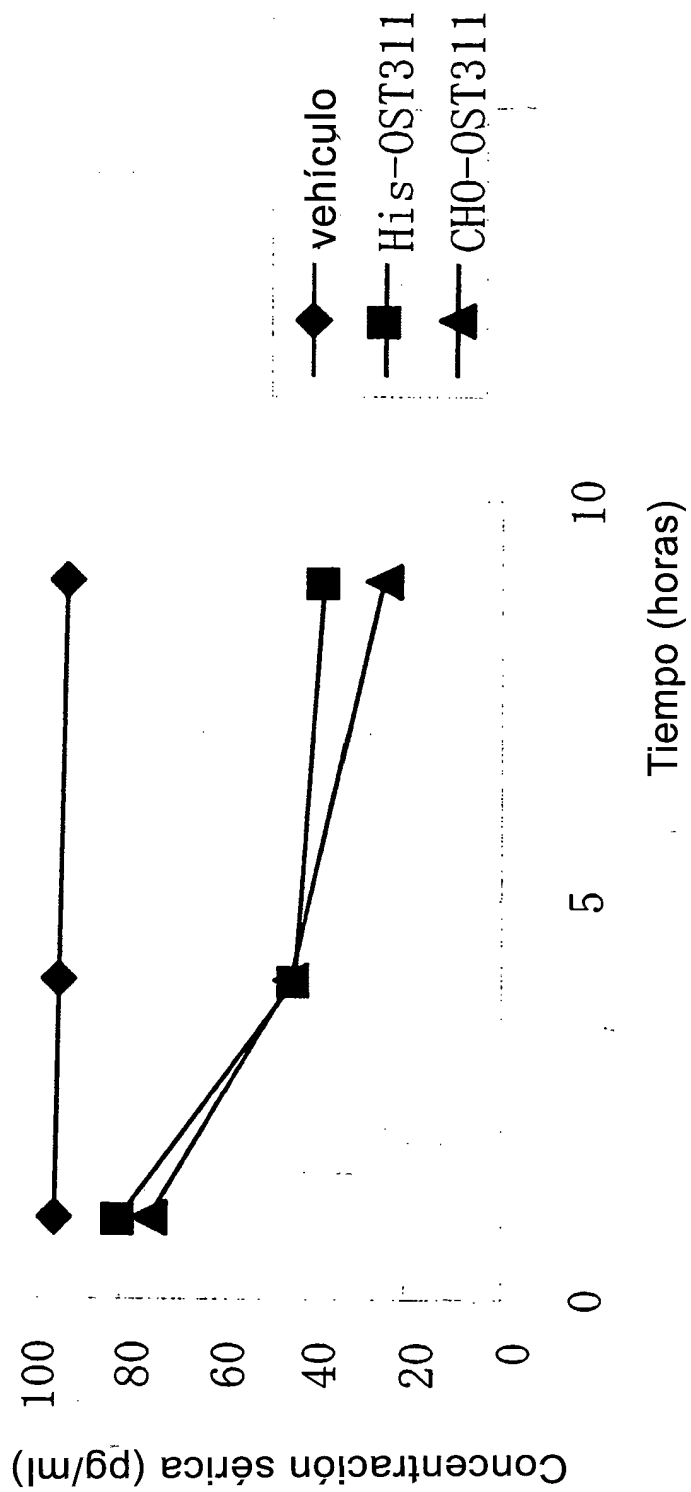
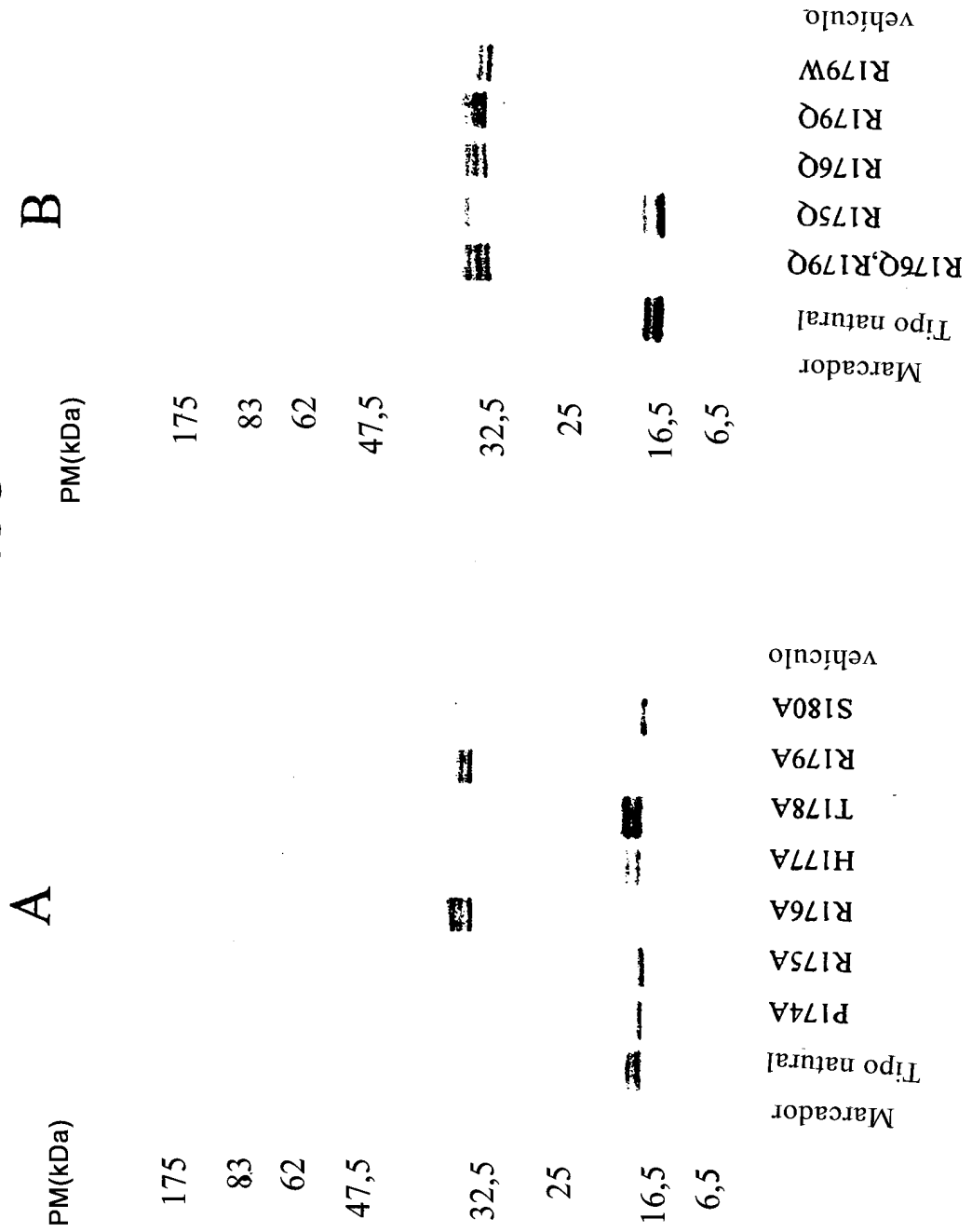


FIG.33



# ES 2 344 679 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

|    |                                                                                                                           |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA                                                                                         |
| 5  | <120> ADN que codifica un polipéptido que regula el metabolismo del fosfato, el metabolismo del calcio y la calcificación |
|    | <130> PH-1268PCT                                                                                                          |
| 10 | <140>                                                                                                                     |
|    | <141>                                                                                                                     |
| 15 | <150> JP2000-245144                                                                                                       |
|    | <151> 11-08-2000                                                                                                          |
|    | <150> JP2000-287864                                                                                                       |
| 20 | <151> 21-09-2000                                                                                                          |
|    | <150> JP2000-391027                                                                                                       |
|    | <151> 22-12-2000                                                                                                          |
| 25 | <150> JP2001-121527                                                                                                       |
|    | <151> 19-04-2001                                                                                                          |
| 30 | <160> 87                                                                                                                  |
|    | <170> PatentIn Ver. 2.0                                                                                                   |
| 35 | <210> 1                                                                                                                   |
|    | <211> 2770                                                                                                                |
|    | <212> ADN                                                                                                                 |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                                                                                 |
| 40 | <220>                                                                                                                     |
|    | <221> CDS                                                                                                                 |
| 45 | <222> (133)..(885)                                                                                                        |
| 50 |                                                                                                                           |
| 55 |                                                                                                                           |
| 60 |                                                                                                                           |
| 65 |                                                                                                                           |

# ES 2 344 679 T3

<400> 1

5 gaatccagtc taggatcctc acaccagcta cttgcaaggg agaaggaaaa ggccagtaag 60

10 gcctggggcca ggagagtcctc gacaggagtg tcaggtttca atctcagcac cagccactca 120

15 gagcagggca cg atg ttg ggg gcc cgc ctc agg ctc tgg gtc tgt gcc ttg 171  
Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu

20 tgc agc gtc tgc agc atg agc gtc ctc aga gcc tat ccc aat gcc tcc 219  
Cys Ser Val Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser

25 15 20 25

30 cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc cac ctg tac aca gcc 267  
Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala

35 30 35 40 45

40 aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac aag aat ggc cat gtg 315  
Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val

45

50

55

60

65

# ES 2 344 679 T3

|    | 50                                                              | 55  | 60  |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 5  | gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc ctg atg atc aga tca |     |     | 363 |
|    | Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser |     |     |     |
| 10 | 65                                                              | 70  | 75  |     |
| 15 | gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg atg agc aga aga tac |     |     | 411 |
|    | Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr |     |     |     |
| 20 | 80                                                              | 85  | 90  |     |
| 25 | ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga tca cac tat ttc gac |     |     | 459 |
|    | Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp |     |     |     |
| 30 | 95                                                              | 100 | 105 |     |
| 35 | ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg gaa aac ggg tac gac |     |     | 507 |
|    | Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp |     |     |     |
| 40 | 110                                                             | 115 | 120 | 125 |
| 45 | gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc agt ctg ggc cgg gcg |     |     | 555 |
|    | Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala |     |     |     |
| 50 | 130                                                             | 135 | 140 |     |
| 55 | aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc ccg tac tcc cag ttc |     |     | 603 |
|    | Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe |     |     |     |
| 60 | 145                                                             | 150 | 155 |     |
| 65 | ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac ttc aac acc ccc ata |     |     | 651 |
|    | Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile |     |     |     |
|    | 160                                                             | 165 | 170 |     |

## ES 2 344 679 T3

aacaggtaaa ctagaaattt ccccttcacg aaggtagaga gaaggggtct ctcccaacat 1185

5 atttctcttc cttgtgcctc tcctctttat cacttttaag cataaaaaaa aaaaaaaaaa 1245

10 aaaaaaaaaa aaaaagcagt gggttcctga gctcaagact ttgaagggtg agggaagagg 1305

15 aaatcggaga tcccagaagc ttctccactg ccctatgcat ttatgittaga tgccccgac 1365

20 ccactggcat ttgagtgtgc aaaccttgac attaacagct gaatggggca agttgatgaa 1425

25 aacactactt tcaagccttc gttcttctt gagcatctct ggggaagagc tgtcaaaaga 1485

ctggtggttag gctggtgaaa acttgacagc tagacttgat gcttgctgaa atgaggcagg 1545

30 aatcataata gaaaactcag cctccctaca gggtagagcac cttctgtctc gctgtctccc 1605

35 tctgtgcagc cacagccaga gggcccagaa tggccccact ctgttcccaa gcagttcatg 1665

40 atacagcctc accttttggc cccatctctg gtttttgaaa atttgggtcta aggaataaat 1725

45 agcttttaca ctggctcacg aaaatctgcc ctgctagaat ttgcttttca aaatggaaat 1785

50 aaattccaac tctcctaaga ggcatttaat taaggctcta cttccagggt gagtaggaat 1845

ccattctgaa caaactacaa aaatgtgact gggaaggggg ctttgagaga ctgggactgc 1905

55 tctgggttag gttttctgtg gactgaaaaa tcgtgtcctt ttctctaaat gaagtggcat 1965

60 caaggactca gggggaaaga aatcagggga catgttatag aagtatgaa aagacaacca 2025

65

# ES 2 344 679 T3

catggtcagg ctcttgtctg tggctctctag ggctctgcag cagcagtggc tcttcgatta 2085

5 gttaaaactc tcctaggctg acacatctgg gtctcaatcc ccttggaaat tcttggtgca 2145

10 tttaatgaag ccttacccca ttactgcggt tcttcctgta agggggctcc attttcctcc 2205

15 ctctcttttaa atgaccacct aaaggacagt atattaacaa gcaaagtcga ttcaacaaca 2265

20 gcttcttccc agtcactttt ttttttctca ctgccatcac atactaacct tatactttga 2325

25 tctattcttt ttggttatga gagaaatggt gggcaactgt ttttacctga tggttttaag 2385

ctgaacttga aggactgggt cctattctga aacagtaaaa ctatgtataa tagtatatag 2445

30 ccatgcatgg caaatatttt aatatttctg ttttcatttc ctgttggaag tattatcctg 2505

35 cataatagct attggaggct cctcagtgaag agatcccaaa aggattttgg tggaaaacta 2565

40 gttgtaatct cacaaactca acaactaccat caggggtttt ctttatggca aagccaaaat 2625

45 agctcctaca atttcttata tccctcgtca tgtggcagta tttatttatt tatttggaag 2685

tttgccatc cttctatatt tatagatatt tataaaaaatg taacccttt ttcctttctt 2745

50 ctgttttaaaa taaaaataaa attta 2770

55 <210> 2

<211> 251

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 344 679 T3

<400> 2

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

# ES 2 344 679 T3

|    | 130                                                             | 135 | 140     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 5  | Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg |     |         |
|    | 145                                                             | 150 | 155 160 |
| 10 | Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg |     |         |
| 15 |                                                                 | 165 | 170 175 |
| 20 | His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val |     |         |
|    | 180                                                             | 185 | 190     |
| 25 | Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln |     |         |
|    | 195                                                             | 200 | 205     |
| 30 | Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu |     |         |
| 35 | 210                                                             | 215 | 220     |
| 40 | Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly |     |         |
|    | 225                                                             | 230 | 235 240 |
| 45 | Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile                     |     |         |
|    | 245                                                             | 250 |         |
| 50 | <210> 3                                                         |     |         |
|    | <211> 684                                                       |     |         |
| 55 | <212> ADN                                                       |     |         |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                       |     |         |
|    | <220>                                                           |     |         |
| 60 | <221> CDS                                                       |     |         |
|    | <222> (1)..(684)                                                |     |         |
| 65 |                                                                 |     |         |

# ES 2 344 679 T3

<400> 3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | tat ccc aat gcc tcc cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc | 48  |
|    | Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile |     |
| 10 | 1 5 10 15                                                       |     |
| 15 | cac ctg tac aca gcc aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac | 96  |
|    | His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His |     |
| 20 | 20 25 30                                                        |     |
| 25 | aag aat ggc cat gtg gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc | 144 |
|    | Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala |     |
| 30 | 35 40 45                                                        |     |
| 35 | ctg atg atc aga tca gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg | 192 |
|    | Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val |     |
| 40 | 50 55 60                                                        |     |
| 45 | atg agc aga aga tac ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga | 240 |
|    | Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly |     |
| 50 | 65 70 75 80                                                     |     |
| 55 | tca cac tat ttc gac ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg | 288 |
|    | Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu |     |
| 60 | 85 90 95                                                        |     |
| 65 | gaa aac ggg tac gac gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc | 336 |

# ES 2 344 679 T3

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val  
 100 105 110  
 5  
 agt ctg ggc cgg gcg aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc 384  
 10 Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro  
 115 120 125  
 15 ccg tac tcc cag ttc ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac 432  
 Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His  
 20 130 135 140  
 25 ttc aac acc ccc ata cca cgg cgg cac acc cgg agc gcc gag gac gac 480  
 Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp  
 145 150 155 160  
 30 tcg gag cgg gac ccc ctg aac gtg ctg aag ccc cgg gcc cgg atg acc 528  
 Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr  
 35 165 170 175  
 40 ccg gcc ccg gcc tcc tgt tca cag gag ctc ccg agc gcc gag gac aac 576  
 Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn  
 180 185 190  
 45 agc ccg atg gcc agt gac cca tta ggg gtg gtc agg ggc ggt cga gtg 624  
 Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val  
 50 195 200 205  
 55 aac acg cac gct ggg gga acg ggc ccg gaa ggc tgc cgc ccc ttc gcc 672  
 Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala  
 60 210 215 220  
 aag ttc atc tag 684  
 65 Lys Phe Ile  
 225

# ES 2 344 679 T3

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

10

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

15

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His

20

20

25

30

25

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala

35

40

45

30

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val

50

55

60

35

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly

40

65

70

75

80

45

Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu

85

90

95

50

55

60

65

# ES 2 344 679 T3

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val  
100 105 110

5

Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro  
115 120 125

10

Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His  
130 135 140

15

Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp  
145 150 155 160

20

Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr  
165 170 175

25

Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn  
180 185 190

35

Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val  
195 200 205

40

Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala  
210 215 220

45

Lys Phe Ile  
225

55

60

<210> 5

<211> 465

<212> ADN

65

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 344 679 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(465)

5

<400> 5

10     tat ccc aat gcc tcc cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc     48  
       Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

15             1                     5                     10                     15

20     cac ctg tac aca gcc aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac     96  
       His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His

                  20                     25                     30

25

30     aag aat ggc cat gtg gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc     144  
       Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala

                  35                     40                     45

35

40     ctg atg atc aga tca gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg     192  
       Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val

                  50                     55                     60

45     atg agc aga aga tac ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga     240  
       Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly

50             65                     70                     75                     80

55

60

65

# ES 2 344 679 T3

tca cac tat ttc gac ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg 288  
 Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu  
 5 85 90 95  
 gaa aac ggg tac gac gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc 336  
 Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val  
 10 100 105 110  
 agt ctg ggc cgg gcg aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc 384  
 Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro  
 15 115 120 125  
 ccg tac tcc cag ttc ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac 432  
 Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His  
 20 130 135 140  
 ttc aac acc ccc ata cca cgg cgg cac acc cgg 465  
 Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg  
 25 145 150 155  
 <210> 6  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

# ES 2 344 679 T3

<400> 6

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

# ES 2 344 679 T3

<210> 7

<211> 219

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(216)

<400> 7

15      agc gcc gag gac gac tcg gag cgg gac ccc ctg aac gtg ctg aag ccc      48

         Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro

20            1                    5                    10                    15

25      cgg gcc cgg atg acc ccg gcc ccg gcc tcc tgt tca cag gag ctc ccg      96

         Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro

                         20                    25                    30

30      agc gcc gag gac aac agc ccg atg gcc agt gac cca tta ggg gtg gtc      144

35      Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val

                 35                    40                    45

40      agg ggc ggt cga gtg aac acg cac gct ggg gga acg ggc ccg gaa ggc      192

         Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly

45            50                    55                    60

50      tgc cgc ccc ttc gcc aag ttc atc tag      219

         Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

55            65                    70

<210> 8

60 <211> 72

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 344 679 T3

<400> 8

```

5      Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro
      1              5              10              15

10     Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro
      20              25              30

15     Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val
      35              40              45

20     Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly
      50              55              60

25     Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
      65              70

```

<210> 9

<211> 543

40 <212> ADN

<213> *Mus sp.*

<220>

45 <221> CDS

<222> (1)..(540)

50

55

60

65

# ES 2 344 679 T3

<400> 9

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | gcc ctg atg att aca tca gag gac gcc ggc tct gtg gtg ata aca gga | 48  |
|    | Ala Leu Met Ile Thr Ser Glu Asp Ala Gly Ser Val Val Ile Thr Gly |     |
| 10 | 1 5 10 15                                                       |     |
| 15 | gcc atg act cga agg ttc ctt tgt atg gat ctc cac ggc aac att ttt | 96  |
|    | Ala Met Thr Arg Arg Phe Leu Cys Met Asp Leu His Gly Asn Ile Phe |     |
| 20 | 20 25 30                                                        |     |
| 25 | gga tcg ctt cac ttc agc cca gag aat tgc aag ttc cgc cag tgg acg | 144 |
|    | Gly Ser Leu His Phe Ser Pro Glu Asn Cys Lys Phe Arg Gln Trp Thr |     |
| 30 | 35 40 45                                                        |     |
| 35 | ctg gag aat ggc tat gac gtc tac ttg tcg cag aag cat cac tac ctg | 192 |
|    | Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr Leu Ser Gln Lys His His Tyr Leu |     |
| 40 | 50 55 60                                                        |     |
| 45 | gtg agc ctg ggc cgc gcc aag cgc atc ttc cag ccg ggc acc aac ccg | 240 |
|    | Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ile Phe Gln Pro Gly Thr Asn Pro |     |
| 50 | 65 70 75 80                                                     |     |
| 55 | ccg ccc ttc tcc cag ttc ctg gct cgc agg aac gag gtc ccg ctg ctg | 288 |
|    | Pro Pro Phe Ser Gln Phe Leu Ala Arg Arg Asn Glu Val Pro Leu Leu |     |
| 60 | 85 90 95                                                        |     |
| 65 | cat ttc tac act gtt cgc cca cgg cgc cac acg cgc agc gcc gag gac | 336 |
|    | Ile Phe Tyr Thr Val Arg Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp |     |
|    | 100 105 110                                                     |     |

# ES 2 344 679 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | cca ccg gag cgc gac cca ctg aac gtg ctc aag ccg cgg ccc cgc gcc | 384 |
|    | Pro Pro Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Pro Arg Ala |     |
| 5  | 115 120 125                                                     |     |
| 10 | acg cct gtg cct gta tcc tgc tct cgc gag ctg ccg agc gca gag gaa | 432 |
|    | Thr Pro Val Pro Val Ser Cys Ser Arg Glu Leu Pro Ser Ala Glu Glu |     |
| 15 | 130 135 140                                                     |     |
| 20 | ggt ggc ccc gca gcc agc gat cct ctg ggg gtg ctg cgc aga ggc cgt | 480 |
|    | Gly Gly Pro Ala Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Leu Arg Arg Gly Arg |     |
| 25 | 145 150 155 160                                                 |     |
| 30 | gga gat gct cgc ggg ggc gcg gga ggc gcg gat agg tgt cgc ccc ttt | 528 |
|    | Gly Asp Ala Arg Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Arg Cys Arg Pro Phe |     |
|    | 165 170 175                                                     |     |
| 35 | ccc agg ttc gtc tag                                             | 543 |
| 40 | Pro Arg Phe Val                                                 |     |
|    | 180                                                             |     |
| 45 | <210> 10                                                        |     |
|    | <211> 180                                                       |     |
|    | <212> PRT                                                       |     |
| 50 | <213> <i>Mus sp.</i>                                            |     |
| 55 |                                                                 |     |
| 60 |                                                                 |     |
| 65 |                                                                 |     |

# ES 2 344 679 T3

<400> 10

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

## ES 2 344 679 T3

<210> 11

<211> 13200

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

10

ggctctcatg gctttagctc taacatgttg tatgggttg gacacctga aaagtgctta 60

15

ggaggtcttg gggccagacc tggattcaaa tccaacctct tccacatgtt acctttctat 120

20

ctctaggcaa gttacttaaa ctgtgtgcat agatcagttt cctgatctat ataaagaaaa 180

25

taacagcatc tcctcaaaga gttattctga agatgaaatg ggttactaca agtaaagcac 240

30

ttagagcagt aagtggaaca gtaagctctc catgagcggt agttcttgct gtgattcttt 300

35

ggagaagcag cctaggaag gagaagacct tgtcctggct ctaccattta ttgctttgt 360

40

gcctttggac atggaaacac taagatttcc atttcttcat gttaaagtatt aaaatcttga 420

45

taatgcatgg agtgcctatc tcacagagtg gcagtgaggt tcaaataagc taatagatgt 480

50

gaaaatgctt tgtaaactat aaaaaaaaaac tgtacaaatg tagggtaaca aatgccatct 540

55

ctttctgtct atacctgtaa gcttgcactc attttgtatt atagttactt atttttatct 600

60

65

## ES 2 344 679 T3

gcctcctgca ttagatttga gctcctcaag ataggaatca catcttgctg tctcctatat 660

5 caacctgtac atgagtcctag cttagatgcct gtacatggca tatactcagt acagggaac 720

10 tggaagaata gcaaactcct tgtgtgtttt ttgggtgtg tgttccagta gcttgctccc 780

15 ctttagactg tatgtgccag gactattcca cccgacatca ggtgtagctt cccagagggc 840

20 tcaactgtgaa cagcatctgc aggcaggcat ccaacaccaa gctgagcact catgtacaga 900

25 cactaaatgt ggggacaccc tgcctgagg ctggatccc cagtgtcag ccagcagctg 960

ttccaatccc catgaggtct ctgaatgagt ctcttacta ctggagagac tactagttta 1020

30 gttgccctcg atagtccaaa ctagggaaat tgagaaattg aaccttgca tattcagtga 1080

35 agtccagact aaggaagctg agaaactgaa ccttggcctg ttcaactgacc tcaaggcctt 1140

40 acttcttttt ctccatttc aaaatcttcc caaatggca actttggctt ttgtgccct 1200

45 gctcctagct cccatcttcc atgaagtggg tgttcttaga ggatgccatc tgctgatgg 1260

50 tgtcatgtat ctctatatcc tgcaagctac ccaccaaacc ctgctcacag attaagcact 1320

55 ggatacatac ttgctgattg gaatttaaag aaaacaaaa taagtaaact cgacaggaga 1380

60 ttaattgcct aggagtcggt tgactgcttg actgaagctg gatttttttt gggaaccgct 1440

65

## ES 2 344 679 T3

ggctgccttc acatttcctg atggaagtgg gacaggtcaa cagacagccc agagtggcag 1500

5 ataacttttg cccacacgtc attcattttt tggagcgttg gcttgaaatt gaggggtgtg 1560

10 tgtgtctgga accgacgtgc cttccgtgcg cctccggggt ctttgcactt tctttcaatg 1620

15 ggctgattac aacacagagg atgtggacag tggagttttt cctgtttgat gtcacactgc 1680

20 taccctttaa aagtctgacg gcaaaaagga gggaatccag tctaggatcc tcacaccagc 1740

25 tacttgcaag ggagaaggaa aaggccagta aggcctgggc caggagagtc ccgacaggag 1800

30 tgtcaggttt caatctcagc accagccact cagagcaggg cacgatgttg ggggcccgcc 1860

35 tcaggctctg ggtctgtgcc ttgtgcagcg tctgcagcat gagcgtcctc agagcctatc 1920

40 ccaatgcctc cccactgctc ggctccagct ggggtggcct gatccacctg tacacagcca 1980

45 cagccaggaa cagctaccac ctgcagatcc acaagaatgg ccatgtggat ggcgaccccc 2040

50 atcagaccat ctacagttag tagggcttca ggctgggaag aaggggagca cccttgttgt 2100

55 ccatctacag gaggcttggg gaggttgggg actagactgg agggctaate caaccctcct 2160

60 agctttctgc ccaggaacca cttattgtct ttgtgtgtgt gtgtgtttgt gtgtgtgtgt 2220

65 gtgtgcgtgt gtatttaaaa cttaggggaa gattctgtca ctctcctaata tagcatttgc 2280

tggtttttct caatatgaat aatttttatt tcaactaaaa ccttcccccac agtaggagcc 2340

## ES 2 344 679 T3

atgttccctt tgccccgtca aaagattgaa aaaatgtaca gaaagaaagg caaggagtct 2400

5 aagagaaaaa gaagccaggc agatcaacag acactaagtt tcagctcatg gactttggac 2460

10 tgggttaact agggagggtg taaagattcc tgggtcatac ccagattggt atagataaat 2520

15 ctgggggctc tttccaactc tggccttata aaaattcttg gaaaaatgta ttaaagacag 2580

20 actgtccatg tatgttgtct tggtgagaat ggccaagtat acaaccatc caccattca 2640

25 tttgtccatg catccatcca tccatccatc catccatcca tccatccatc catccatcca 2700

tccaacaggt ttaatgggtg tttcagacac ccaggtaccc aggtaccag tatgagttgg 2760

30 tgattcttct ctgtggaact gaaagggtgc cagtcagtag caagtcaagc tagttagaaa 2820

35 ctattggca acatgagaca actggaatgt ttttaaagat caggtttggt gagaattgga 2880

40 tcacaatcca caataatcaa tccattagca atgattcaaa tgagggtccc tttgtgtgca 2940

45 cctatataag gggtaatgtg gtgaaagcag ggatagatat tgaaaaagac tggatcttct 3000

50 attttaagaa aacgtgagaa aacacctcaa agcatacaga aaaatgcaaa ctgatccaat 3060

55 atagctcaaa ttaaaggaaa gaaaaattag ttagacaatc tctaactaaa gaaaacatag 3120

60 gaattatgat ttgcccttta ttgttgtaat aaataaatta attatttttg ctgtgacott 3180

65

## ES 2 344 679 T3

gctgtgtgtg aggcatttat tcttctaggc tccaaaggct cttaaacctg gttgcaagat 3240

5

atacaacatg caaaattaag ttgcaagata tataacatgc gaaattgaca gtttaacctc 3300

10

ttcaagtact aaatgcatat tgacaggaga taaaaggaga gaggaaggtt ctctccgaat 3360

15

accaaacagg ttccagaact ccagagaata tagtaagact caggagtcaa catcttgga 3420

20

accaagtttg agtctcatgg caaaaatttc aattaaatct ggatacactt gatgcacccg 3480

25

aagtgttggt catcttattc aatggatatt taataggatc taccatgtgc ctggcattct 3540

30

accaagcgtt gtggctgaaa actaagacac aaccttcaa ggacctcatg gtctgtcgtc 3600

35

ctaccttgtc agccagctca ctaccagact ttcaggaaat gcaattttgc atgtctcatg 3660

40

gaggggacac cttactcta attcaagact atatgtgggc caggtgtggt ggctcacgcc 3720

45

tgtaatccca gcactctggg aggccgaggc aggcagatca cgaggtcagg agattgagac 3780

50

catcttggtt aacacagtga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaaaat tagccaggcg 3840

55

tgggtggcagg cgcctgtagt ccagctact tgggaggctg aggcaggaga atggcgtgaa 3900

cccgggaggc agagcttgca gtgagccgag attgcgccac tgcactccag cctgggtgac 3960

60

agagcgagac tccatctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagactat atgtgattta 4020

65

aaatgcagaa tagtagatta tggtaaatta ttttgattct cttagatgga aagggtgca 4080

## ES 2 344 679 T3

tccaactaga gaatgtttat acaactigtc tcgaatcctg gaatcccgtt gctgaaagga 4140

5 actccttaaa gacgtttctt cctgaacaag aattagggta gaacagaaca ggccggctac 4200

10 ggtggggagt gagtgtgaag agtcaacctc ctgggctggc agtctgaact tagacctttt 4260

15 ccttgaaagc ccacctcgta tcaggcccca agggatcact gagtgctagt tagagtgaat 4320

20 taaaatgact gagaagcagc aaaataaatt gaactgactt cagattttta aaaatagaaa 4380

25 tgtgattttg tttccttaga cataggcact agctaaacat tgcattttta aagagttaaa 4440

catgaatgcg gggaggggaa cttcgggtca gggtagtggg agggagatct acttttccta 4500

30 gtctatgtag ataacttttt gtactgttca atgagttgtc atgtgtatta tgggaaaaaa 4560

35 aaagtgcagg aaaaaattac aactacaat taaaagttac caaaagagg ccagatgcgg 4620

40 tggctcacgc gtataatctc agcactttgg gaggccgagg tgggaggatc acttgaagtc 4680

45 aggggttcga gaccagtctg gccaacatgg ggaaaccctg tctctactaa aaatacaaaa 4740

50 attagtgggg tgtggtgcct gcctgtagtc acagctactt gggaggctga ggcagaagaa 4800

55 tcgcttgtag ccagaggtg gagcttgagc tgagctgaga tcgcaccact gtgtccagc 4860

60 ctgggtgaca gagtgagact ccgtctcaaa aaaaaaacgt tacccaaaag aaagaggaaa 4920

65

## ES 2 344 679 T3

gattaatgca thtagataag aagcacaact aattaaatgt ctggtgaagg atttgtaatg 4980

5

acctcatcag tgactgttaa gcaatgtttt tacactgatg gaaacctaaa atgtgagggg 5040

10

tattttttcc cctcctaatt atccatttct attgaattct ggtttatctt attacittgc 5100

15

tgtaagaaat tcttaagagt tgagtgcaca acctatcttt gggtcactgg acttgacaaa 5160

20

atgaagttat ctctgccta ccagattctt caagctccct taggactcac aagcgtgct 5220

25

gccaggtacc cctctggtgt cttatcacc cgttccatga acaaggccat cctctgactc 5280

30

ccctttatcc ttattatag gaaacagcaa gagagagatg cttattgtcc ctggtaatat 5340

35

catttcctag atcctgctat tttcacttcc tccatcttcc ccataggaac tatctttatt 5400

40

gaagctgaat taccgtgag ctcttccagc cttttcata cgtttttctt ttgagggtgct 5460

45

caaagcactt cactgctatc atcttattta tcacttactg gccacaagag tagaatggag 5520

50

tagataattt tctacttcta taagcagagg ttgaagcaaa gtggtaatag taaaaattac 5580

tagcacttag gaagtgcctt ctaaaggata aaaacattat ct cattatgt cttcaagatg 5640

55

accaaagtag gtaaatgttt ctgctgtcct cattttatat gtgaaaaaac aagagttaaa 5700

60

gaacttaaat aactggctga aggtcagaca ggtagtaaaa gacctagagg acaccttgac 5760

65

cccaaatccc aagctgttcc aaggtcacac gcacggagac acctccgtca ttgaaggcaa 5820

## ES 2 344 679 T3

agtccattaa gcctgctcag ctccaacagg cggggctggt tgctccggca gtccatgggt 5880

5 tgttccttcc ttctgcaaaa ttctcccttg aatctgtgca gactgcgaaa agatgccttt 5940

10 tgaaagcaca aaggaaagaa actctgactc tctcacattt tctaaacttt cacattgggt 6000

15 cacactgttt gatggaagag tctgtgtgcc ctccgtagca gcttctcaca gttcctcaac 6060

20 caccgcggga tgttttctag ggggactggc tctggaaacc aggagcgtgt gtgccataca 6120

25 cactgcccac actgacccca agcatcaagc cagcacacct gtcaaggcat gggcccggca 6180

30 taaacagcag gtcagaacac gccacgtgat gtccctctgtt tgctcgacac ttctgagtca 6240

35 cttttaccac cattatcccc ttcgatcacc accctatgaa gtaggcagga cagccattgt 6300

40 tctatttcac agctgaggaa actgaggcta gtgcaaggtc agcaagtggc acaattggga 6360

45 ccaaaatcca agtcccctgg ttcttggcac ctggetcagt gccccttccc cgagccctta 6420

50 gtgctgctgt gactccttgt cctcactgcc tgcagcatgt attttagcat ttgatattgt 6480

55 cttctcagac tcttagtgat ttctgctgga ggcttggtac cgggtggtgg gaagatgtct 6540

60 ctgacctgag ttccaatcct gtcttagttt ccttaccact taaattagga tattgctgct 6600

65 actactacta ctaataataa taataatcag tactaacaat ataaaatttg ttttgagaat 6660

## ES 2 344 679 T3

ttaaaatatg taaagtgcct agagtgcac cgctcaaaga ccattactaa atgtaatttt 6720

5 ttccaatta gactgaaaag tcaccagaac agaaaccatt tctttttttt tttttttgag 6780

10 acggagtctc gctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggt gcaatctcgg ctactgcta 6840

15 gctccgcctc ccaggttcat gccattctcc tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac 6900

20 aggtgcccac caacacacct ggctaatttt ttttgtattt tagtagagaa gaggtttcac 6960

25 cgtgttagcc aggatggctt tgatctcctg acctcatgat ccacccgcct cagcctccca 7020

30 gagtgctggg attacaggca tgagccaccg caccagtcg aaaccatttc ttacacgttc 7080

35 cttatatttc tccaaagggt taccacaaaa ctagccatac atttgagaca cataggcaga 7140

40 caccactgtg gaggaattta agcatccttt gcgcctgtca taccacagtc cactttctgg 7200

45 gaagctttcc tcaaggttcc cctcagccaa actttgaaac aaattaactt ctctctttgg 7260

50 ccctcttctt ttctcacctt tctggggctt gtctccaccc tcattccctc tgttccgcgt 7320

55 cagtccaatt tcagtccta tcattgattc tactcagcta gtacctaatt attgctgctt 7380

60 attttctca aaggctcttg tattgagcct gcatgggata ggagaagagc tttggccttt 7440

65 aaatcacccc cacaaggctc catcacttgc taggcacaaa cattgggcat ttacaacctc 7500

70 tccaagctac agttgcagaa gaggaattag aatccctgca tgggattcta gctgcctccc 7560

## ES 2 344 679 T3

tggaggctat gaggtcagat gagatgcacc tagaaattct gtgataggca actggaagta 7620

5 gccccaaaga cctaaagtaa tgatttttaa cagaaaatgt caggtaatta aataacatgt 7680

10 ggggaagaaa tctcgctgaa ttatcacgca tgttacacca gtatatgac taattgtgcc 7740

15 ttgtccacaa aacagtaatt taaagccatt atcaattact taagaggtag gtcgtgtgaa 7800

20 tgggtttcag gcccttgctg gagactagtt ttgagaggg gacactgaaa gtccatgagg 7860

25 ggctgcacct ggagaggta caccaagtg agaaaatgac aaagaaccaa cccaagaaga 7920

30 gccaagaaga aaattccatc cgtcacttat attgattcaa cataaacagt tataccctct 7980

35 gctcctaagc agctcactct aaggaacgca ctggataggt aaactcagct aaagcaagtt 8040

40 aaatggaata catgctgtaa tagaggtgaa ggcattgtcc tgaggagctg agaaggaaga 8100

45 acaactgatt ttgaatggaa agatgaggaa agtcttcata gagatggtga cgcctgagcc 8160

50 tgggtcttgaa gagtgagtga cttcaataag tagagaagga agaggagat caactctact 8220

55 accattctgt acacatactg ggtgttgact gatgtattag acaattacac agacatccag 8280

60 gaggagaatc agactctatg gcaagctgga tccttgaaag acatctcagc atagatttaa 8340

65 aaatcacaaa gtagaaggca tggaagaatg tgactatcac cacaaacatt caaaggtatt 8400

## ES 2 344 679 T3

agtaaggcaa aagggaataat aaagacggtc caggtagaga gagagaaaca tgtgttcagc 8460

5

acaggtagaa gaattccagg agctcagagt gcccataca ggcaacaaga tgaagcagga 8520

10

ggtgaatgac tgtatgtgtg ttgggggcaa gagaggatgt cagaagaaac gctgaatatg 8580

15

cagaaatgag gctgaattta agagtgtga agttatcacc acccttaaaa tcaatccagg 8640

20

gaggtttcat gaaggtaggt ttcaggagg tgcttgaagg tgggaattgg atggcaatga 8700

25

gtctttgccc tgccgtgttt tctccatagg tgccctgatg atcagatcag aggatgctgg 8760

30

ctttgtggtg attacagggtg tgatgagcag aagatacctc tgcattggatt tcagaggcaa 8820

35

atttcittga cagacatag acttttctag cttacaatt ccatttgcag tgtaccctgg 8940

40

tgacctgttt ccactgatac ttcattgcagt ctaagtatga attaaacgtg aatgctcacg 9000

45

tttaatagct ggggtttgaa ctcaggcaat ctggctccag atcccaggct ctcagccct 9060

50

agtctgcact gccattgga acccactttt tttttttatt attatacttt aagttttagg 9120

55

gtacatgtgc acattgtgca ggtagttac atacgtatac atgtgcatg ctggtgtgct 9180

60

gcaccacta actcatcatc tagcattagg tatatctccc aatgctatcc ctccccctc 9240

65

ccccacccc acaacagtcc ccagagtgtg atgttccct tctgtgtcc atgtgatctc 9300

## ES 2 344 679 T3

attgttcaat tcccacctac gagtgagaat atgcggtgtt tggttttttg ttcttgcgat 9360

5 agtttactga gaatgatggt ttccaatttc atccatgtcc ctacaaagga catgaactca 9420

10 tcatttttta tggctgcata gtattccatg gtgtatatgt gccacatttt cttaatccag 9480

15 tctatcattg ttggacattt gggttgtgga acccactttt gaatctagca caggccctgg 9540

20 tatgtagtgc taggtcctca agtcatgtca attcacgttg taaagtaacat tagaaagggt 9600

25 gaaaagccat tgggtgtcttc ttgattctgg gactagctgt gactttgggt aaatctcctc 9660

acttctccaa acttcagcat ttccacttgg aaaaagcgaa gtggaataga ccacgtgacc 9720

30 tgtggagctc cctccagtta aagattttta attaataacc cctgccccaa ttgtgatagc 9780

35 tattcattcg gatttgtaag caaaggattt cccaaactaa aggctgctgg cctcttttgg 9840

40 aggattttga gatagtaaaa tagtaggact gcttatctca ggagtctctg accaccacac 9900

45 atgcccacta gaaactccac aagaacagag actttctgtt ttgctttctg ctgcatccca 9960

50 gcccctacaa tagtgtctgg ctagagtagg taaacaaaca aacaaaaaat ctgttgaacc 10020

actattgaaa tatagataac taactaaaca tccgttaacc cctctaggca tgtagatagt 10080

55 cctgatctgt aaactgctta ctttgtggag cttgaggatt aaaagaaata acaggcaaag 10140

60

65

# ES 2 344 679 T3

gccttcgtgg ggcactcagt aaaacccagt actagtggta gaggattcaa acccagctca 10200

5

tctgtcagea aagttcatgt ctccaatccc gtcagtgctc tcattcatgt ttgaccctat 10260

10

aaactccatc cccctctcctt tctccagtaa agagacaaac ccaagccaat tttcagccag 10320

15

cagaggcttg gaaaagatag agggcaggaa ggacaagggtg gtgcctactc caggaaaacc 10380

20

acaggccagg ccagcccggg cctccaggca gtaagcggag gcccagtag tcgtagtctc 10440

25

tgaaagggcg aactatatag tcagggttg agcattaatc aaaaccactc taccacagca 10500

gggaacaaag ggggtgaaggc tcaacgcctt aagaactgca gagcttcagg ccggctggca 10560

30

caagcatgtg gcccaggag gagctgggga gtgggtgggg ccccactgc cagccttcac 10620

35

gtggttcgct cttgtccttc cagcactatt tcgaccgga gaactgcagg ttccaacacc 10680

40

agacgctgga aaacgggtac gacgtctacc actctctca gtatcacttc ctggtcagtc 10740

45

tgggccgggc gaagagagcc ttctgccag gcatgaaccc accccgtac tccagttcc 10800

50

tgtcccggag gaacgagatc cccctaattc attcaacac ccccatacca cggcggcaca 10860

cccggagcgc cgaggacgac tcggagcggg acccctgaa cgtgctgaag ccccgggccc 10920

55

ggatgacccc ggccccggcc tcctgttcac aggagctccc gagcgccgag gacaacagcc 10980

60

cgatggccag tgaccatta ggggtgggtc ggggcggtcg agtgaacacg cacgctgggg 11040

65

# ES 2 344 679 T3

gaacggggccc ggaaggctgc cgcccccttcg ccaagttcat ctagggctgc tggaaggga 11100

5 ccctcttttaa cccatccctc agcaaagca gctcttccca aggaccaggt cccttgacgt 11160

10 tccgaggatg ggaaaggatg caggggcatg tatggaattt gctgcttctc tggggtcctt 11220

15 tccacaggag gtctgtgag aaccaacctt tgaggcccaa gtcattgggtt ttcaccgcct 11280

20 tcctcactcc atatagaaca cctttcccaa taggaaaccc caacaggtaa actagaaatt 11340

25 tccccctcat gaaggtagag agaaggggtc tctcccaaca tatttctctt ccttgtgcct 11400

ctcctcttta tcacttttaa gcataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagcag 11460

30 tgggttcctg agctcaagac ttgaagggtg tagggaagag gaaatcggag atcccagaag 11520

35 ctctctcact gccctatgca tttatgttag atgccccgat cccactggca tttagagtgtg 11580

40 caaaccttga cattaacagc tgaatggggc aagttgatga aaacactact ttcaagcctt 11640

45 cgttcttcct tgagcatctc tggggaagag ctgtcaaaag actggtggtg ggctggtgaa 11700

50 aacttgacag ctagacttga tgcttgctga aatgaggcag gaatcataat agaaaactca 11760

55 gcctccctac agggtagaca cttctgtctt cgtgtctctc ctctgtgcag ccacagccag 11820

60 agggcccaga atggccccac tctgttccca agcagttcat gatacagcct caccttttgg 11880

65

## ES 2 344 679 T3

ccccatctct ggtttttgaa aatttgggtct aaggaataaa tagcttttac actggctcac 11940

5 gaaaatctgc cctgctagaa ttgtcttttc aaaatggaaa taaattccaa ctctcctaag 12000

10 aggcatttaa ttaaggctct acttccaggt tgagtaggaa tccattctga acaaactaca 12060

15 aaaatgtgac tgggaagggg gctttgagag actgggactg ctctgggtta ggttttctgt 12120

20 ggactgaaaa atcgtgtcct tttctctaaa tgaagtggca tcaaggactc agggggaaaag 12180

25 aaatcagggg acatgttata gaagttatga aaagacaacc acatggtcag gctcttgtct 12240

30 gtggtctcta gggctctgca gcagcagtg ctcttcgatt agtataaact ctcttaggct 12300

35 gacacatctg ggtctcaatc cccttgaaa ttcttgggtgc attaaatgaa gccttaccac 12360

40 attactgcgg ttcttctgt aagggggctc ctttttctc cctctcttta aatgaccacc 12420

45 taaaggacag tatattaaca agcaaagtcg attcaacaac agcttcttcc cagtcacttt 12480

50 tttttttctc actgccatca catactaacc ttatactttg atctattctt ttgggttatg 12540

55 agagaaatgt tgggcaactg tttttacctg atggttttaa gctgaactg aaggactggt 12600

60 tcctattctg aaacagtaaa actatgtata atagtatata gccatgcatg gcaaatattt 12660

65 taatatttct gttttcattt cctgttgaa atattatcct gcataatagc tattggaggc 12720

tcctcagtga aagatcccaa aaggattttg gtggaaaact agttgtaatc tcacaaactc 12780

## ES 2 344 679 T3

aacactacca tcaggggttt tctttatggc aaagccaaaa tagctcctac aatttcttat 12840

5 atccctcgtc atgtggcagt atttatttat ttatttggaa gtttgcctat ctttctatat 12900

10 ttatagatat ttataaaaat gtaacccctt tttcctttct tctgtttaaa ataaaaataa 12960

15 aatttatctc agcttctggt agcttatcct cttttagta ctacttaaaa gcatgtcgga 13020

20 atataagaat aaaaaggatt atgggagggg aacattaggg aaatccagag aaggcaaaat 13080

25 tgaaaaaaag attttagaat tttaaaattt tcaaagattt cttcattca taaggagact 13140

caatgatttt aattgatcta gacagaatta ttttaagttt atcaatattg gatttctggt 13200

30 <210> 12

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

40 <400> 12

ttctgtctcg ctgtctccc

19

45 <210> 13

<211> 19

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

55 <400> 13

ccccttccca gtcacattt

19

60 <210> 14

<211> 20

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 344 679 T3

|    |                            |    |
|----|----------------------------|----|
|    | <223> ADN sintético        |    |
|    | <400> 14                   |    |
| 5  | ggggcatcta acataaatgc      | 20 |
|    | <210> 15                   |    |
| 10 | <211> 20                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |    |
| 15 | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
|    | <400> 15                   |    |
| 20 | agccactcag agcagggcac      | 20 |
|    | <210> 16                   |    |
| 25 | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |    |
| 30 | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
|    | <400> 16                   |    |
| 35 | ggtggcggcc gtctagaact a    | 21 |
|    | <210> 17                   |    |
| 40 | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |    |
| 45 | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
|    | <400> 17                   |    |
| 50 | tcagtctggg ccgggcgaag a    | 21 |
|    | <210> 18                   |    |
| 55 | <211> 20                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |    |
| 60 | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
|    | <400> 18                   |    |
| 65 | cacgttcaag gggtcccgt       | 20 |

## ES 2 344 679 T3

|    |                                |    |
|----|--------------------------------|----|
|    | <210> 19                       |    |
|    | <211> 20                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> ADN sintético            |    |
| 10 | <400> 19                       |    |
|    | tctgaaatcc atgcagaggt          | 20 |
| 15 | <210> 20                       |    |
|    | <211> 21                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> ADN sintético            |    |
| 25 | <400> 20                       |    |
|    | gggaggcatt gggataggct c        | 21 |
| 30 | <210> 21                       |    |
|    | <211> 21                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> ADN sintético            |    |
| 40 | <400> 21                       |    |
|    | ctagatgaac ttggcgaagg g        | 21 |
| 45 | <210> 22                       |    |
|    | <211> 30                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> ADN sintético            |    |
| 55 | <400> 22                       |    |
|    | ccggaattcagccactcagagcagggcacg | 30 |
| 60 | <210> 23                       |    |
|    | <211> 52                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
| 65 | <213> Secuencia artificial     |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                                                            |  |    |
|----|------------------------------------------------------------|--|----|
|    | <220>                                                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético                                        |  |    |
| 5  | <400> 23                                                   |  |    |
|    | ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatggt gatgatggat gaacttggcg aa |  | 52 |
| 10 | <210> 24                                                   |  |    |
|    | <211> 20                                                   |  |    |
|    | <212> ADN                                                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                 |  |    |
| 15 | <220>                                                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético                                        |  |    |
| 20 | <400> 24                                                   |  |    |
|    | taatacgact cactataggg                                      |  | 20 |
| 25 | <210> 25                                                   |  |    |
|    | <211> 20                                                   |  |    |
|    | <212> ADN                                                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                 |  |    |
| 30 | <220>                                                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético                                        |  |    |
| 35 | <400> 25                                                   |  |    |
|    | attaaccctc actaaaggga                                      |  | 20 |
| 40 | <210> 26                                                   |  |    |
|    | <211> 20                                                   |  |    |
|    | <212> ADN                                                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                 |  |    |
| 45 | <220>                                                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético                                        |  |    |
| 50 | <400> 26                                                   |  |    |
|    | accacagtcc atgcatcac                                       |  | 20 |
| 55 | <210> 27                                                   |  |    |
|    | <211> 20                                                   |  |    |
|    | <212> ADN                                                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                 |  |    |
| 60 | <220>                                                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético                                        |  |    |
| 65 | <400> 27                                                   |  |    |
|    | tccaccaccc tgttgetgta                                      |  | 20 |

## ES 2 344 679 T3

<210> 28  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 10  
 <400> 28  
  
 Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly  
 15 1 5 10 15  
  
 20 Ala Pro His Gln Cys  
 20  
  
 <210> 29  
 25 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 35 <400> 29  
 Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser  
 1 5 10 15  
 40  
 Pro Gln Tyr His Cys  
 45 20  
  
 <210> 30  
 <211> 26  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> ADN sintético  
  
 <400> 30  
 60 tgaaggtcgg tgtgaacgga ttggc 26  
  
 <210> 31  
 <211> 24  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 344 679 T3

|    |                            |  |    |
|----|----------------------------|--|----|
|    | <220>                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético        |  |    |
| 5  | <400> 31                   |  |    |
|    | catgtaggcc atgaggtcca ccac |  | 24 |
| 10 | <210> 32                   |  |    |
|    | <211> 21                   |  |    |
|    | <212> ADN                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |  |    |
| 15 | <220>                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético        |  |    |
| 20 | <400> 32                   |  |    |
|    | gtaaagaacc ctgtgtattc c    |  | 21 |
| 25 | <210> 33                   |  |    |
|    | <211> 21                   |  |    |
|    | <212> ADN                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |  |    |
| 30 | <220>                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético        |  |    |
| 35 | <400> 33                   |  |    |
|    | ctgccttaag aaatccataa t    |  | 21 |
| 40 | <210> 34                   |  |    |
|    | <211> 20                   |  |    |
|    | <212> ADN                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |  |    |
| 45 | <220>                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético        |  |    |
| 50 | <400> 34                   |  |    |
|    | gaggaatcac agtctcattc      |  | 20 |
| 55 | <210> 35                   |  |    |
|    | <211> 20                   |  |    |
|    | <212> ADN                  |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial |  |    |
| 60 | <220>                      |  |    |
|    | <223> ADN sintético        |  |    |
| 65 | <400> 35                   |  |    |
|    | cttggggagg tgcccgggac      |  | 20 |

## ES 2 344 679 T3

|    |                            |    |
|----|----------------------------|----|
|    | <210> 36                   |    |
|    | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial |    |
|    | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
| 10 | <400> 36                   |    |
|    | tcctcttag aagacaatac a     | 21 |
| 15 | <210> 37                   |    |
|    | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial |    |
|    | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
| 25 | <400> 37                   |    |
|    | gtgtttaaag gcagtattac a    | 21 |
| 30 | <210> 38                   |    |
|    | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial |    |
|    | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
| 40 | <400> 38                   |    |
|    | cagacagaga catccgtgta g    | 21 |
| 45 | <210> 39                   |    |
|    | <211> 21                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial |    |
|    | <220>                      |    |
|    | <223> ADN sintético        |    |
| 55 | <400> 39                   |    |
|    | ccacatgggc caggttcagt c    | 21 |
| 60 | <210> 40                   |    |
|    | <211> 20                   |    |
|    | <212> ADN                  |    |
| 65 | <213> Secuencia artificial |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                                      |  |    |
|----|--------------------------------------|--|----|
|    | <220>                                |  |    |
|    | <223> ADN sintético                  |  |    |
| 5  | <400> 40                             |  |    |
|    | gacggtgaga ctcggaacgt                |  | 20 |
| 10 | <210> 41                             |  |    |
|    | <211> 20                             |  |    |
|    | <212> ADN                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 15 | <220>                                |  |    |
|    | <223> ADN sintético                  |  |    |
| 20 | <400> 41                             |  |    |
|    | tccggaaaat ctggccatac                |  | 20 |
| 25 | <210> 42                             |  |    |
|    | <211> 20                             |  |    |
|    | <212> ADN                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 30 | <220>                                |  |    |
|    | <223> ADN sintético                  |  |    |
| 35 | <400> 42                             |  |    |
|    | taatacgact cactataggg                |  | 20 |
| 40 | <210> 43                             |  |    |
|    | <211> 19                             |  |    |
|    | <212> ADN                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 45 | <220>                                |  |    |
|    | <223> ADN sintético                  |  |    |
| 50 | <400> 43                             |  |    |
|    | gatttaggtg acactatag                 |  | 19 |
| 55 | <210> 44                             |  |    |
|    | <211> 34                             |  |    |
|    | <212> ADN                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 60 | <220>                                |  |    |
|    | <223> ADN sintético                  |  |    |
| 65 | <400> 44                             |  |    |
|    | ataagaatgc ggccgctcag atgaactgg cgaa |  | 34 |

## ES 2 344 679 T3

|    |                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------|----|
|    | <210> 45                                              |    |
|    | <211> 33                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial                            |    |
|    | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
| 10 | <400> 45                                              |    |
|    | atgaattcca ccatgttggg ggccccgcctc agg                 | 33 |
| 15 | <210> 46                                              |    |
|    | <211> 49                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial                            |    |
|    | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
| 25 | <400> 46                                              |    |
|    | atggggccgc ctaatgatga tgatgatgat ggatgaactt ggcgaaggg | 49 |
| 30 | <210> 47                                              |    |
|    | <211> 30                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial                            |    |
|    | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
| 40 | <400> 47                                              |    |
|    | ataccacggc agcacaccagagcgccgag                        | 30 |
| 45 | <210> 48                                              |    |
|    | <211> 30                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial                            |    |
|    | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
| 55 | <400> 48                                              |    |
|    | ataccacggc agcacaccagagcgccgag                        | 30 |
| 60 | <210> 49                                              |    |
|    | <211> 17                                              |    |
|    | <212> PRT                                             |    |
| 65 | <213> Secuencia artificial                            |    |

## ES 2 344 679 T3

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 49

**Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu**

**1**

**5**

**10**

**15**

10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20

<400> 50

**Cys Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg**

25

**1**

**5**

**10**

<210> 51

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> péptido sintético

<400> 51

**Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Cys**

40

**1**

**5**

**10**

**15**

<210> 52

45 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> péptido sintético

<400> 52

55 **Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Cys**

**1**

**5**

**10**

60 <210> 53

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> ADN sintético

## ES 2 344 679 T3

|    |                                                                     |    |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 53                                                            |    |
|    | atgaattcca ccatgttggg ggcgcgcctc agg                                | 33 |
| 5  | <210> 54                                                            |    |
|    | <211> 33                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 10 | <213> Secuencia artificial                                          |    |
|    | <220>                                                               |    |
|    | <223> ADN sintético                                                 |    |
| 15 | <400> 54                                                            |    |
|    | atgcggccgc tatcgaccgc ccctgaccac ccc                                | 33 |
| 20 | <210> 55                                                            |    |
|    | <211> 33                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial                                          |    |
|    | <220>                                                               |    |
|    | <223> ADN sintético                                                 |    |
| 30 | <400> 55                                                            |    |
|    | atgcggccgc tacgggagct cctgtgaaca gga                                | 33 |
| 35 | <210> 56                                                            |    |
|    | <211> 34                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 40 | <213> Secuencia artificial                                          |    |
|    | <220>                                                               |    |
|    | <223> ADN sintético                                                 |    |
| 45 | <400> 56                                                            |    |
|    | atgcggccgc tcacggggtc atccgggccc gggg                               | 34 |
| 50 | <210> 57                                                            |    |
|    | <211> 79                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 55 | <213> Secuencia artificial                                          |    |
|    | <220>                                                               |    |
|    | <223> ADN sintético                                                 |    |
| 60 | <400> 57                                                            |    |
| 65 | aattccacca tgttgggggc cgcctcagg ctctgggtct gtgcttgtgc agcgtctgca 60 |    |
|    | gcatgagcgt cctgcatgc                                                | 79 |

## ES 2 344 679 T3

<210> 58  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 10  
 <400> 58  
  
 aattgcatgc aggacgctca tgctgcagac gctgcacaag gcacagaccc agagcctgag 60  
 15  
  
 gcggggccccc aacatggtgg 80  
 20 <210> 59  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 30  
 <400> 59  
  
 atatgcatgc ctccagctgg ggtggcctga tccac 35  
 35 <210> 60  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 45  
 <400> 60  
  
 tgtatcccaa tgcctccca ctg 23  
 50 <210> 61  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 60  
 <400> 61  
  
 atggatccct agatgaactt ggcgaaggg 29  
 65 <210> 62  
 <211> 29

## ES 2 344 679 T3

|    |                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------|----|
|    | <212> ADN                                             |    |
|    | <213> Secuencia artificial                            |    |
| 5  | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
|    | <400> 62                                              |    |
| 10 | atcatatgta tccaatgcc tccccactg                        | 29 |
|    | <210> 63                                              |    |
| 15 | <211> 31                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
|    | <213> Secuencia artificial                            |    |
| 20 | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
|    | <400> 63                                              |    |
| 25 | atgcggccgc ctagatgaac ttggcgaagg g                    | 31 |
|    | <210> 64                                              |    |
| 30 | <211> 49                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
|    | <213> Secuencia artificial                            |    |
| 35 | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
|    | <400> 64                                              |    |
| 40 | gaattcatat gaaatacccg aacgcttccc cgctgctggg ctccagctg | 49 |
|    | <210> 65                                              |    |
| 45 | <211> 32                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
|    | <213> Secuencia artificial                            |    |
| 50 | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |
|    | <400> 65                                              |    |
| 55 | cccaagcttg cggccgccta gatgaacttg gc                   | 32 |
|    | <210> 66                                              |    |
| 60 | <211> 25                                              |    |
|    | <212> ADN                                             |    |
|    | <213> Secuencia artificial                            |    |
| 65 | <220>                                                 |    |
|    | <223> ADN sintético                                   |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                              |    |
|----|------------------------------|----|
|    | <400> 66                     |    |
|    | aacacccccatagcacggcg gcaca   | 25 |
| 5  | <210> 67                     |    |
|    | <211> 25                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 10 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 15 | <400> 67                     |    |
|    | tgtgccgccg tgctatgggg gtgtt  | 25 |
| 20 | <210> 68                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 30 | <400> 68                     |    |
|    | accccataccagcgcggca cacccg   | 26 |
| 35 | <210> 69                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 40 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 45 | <400> 69                     |    |
|    | cgggtgtgcc gcgctggtat gggggt | 26 |
| 50 | <210> 70                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 55 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 60 | <400> 70                     |    |
|    | cccataccacgggcgcacccggag     | 26 |
| 65 | <210> 71                     |    |
|    | <211> 26                     |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Secuencia artificial  |    |
| 5  | <220>                       |    |
|    | <223> ADN sintético         |    |
|    | <400> 71                    |    |
| 10 | ctccgggtgt gcgccgtgg tatggg | 26 |
|    | <210> 72                    |    |
| 15 | <211> 26                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Secuencia artificial  |    |
| 20 | <220>                       |    |
|    | <223> ADN sintético         |    |
|    | <400> 72                    |    |
| 25 | ataccacggc gggccaccg gagegc | 26 |
|    | <210> 73                    |    |
| 30 | <211> 26                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Secuencia artificial  |    |
| 35 | <220>                       |    |
|    | <223> ADN sintético         |    |
|    | <400> 73                    |    |
| 40 | gcgctccggg tggcccgccg tggat | 26 |
|    | <210> 74                    |    |
| 45 | <211> 25                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Secuencia artificial  |    |
| 50 | <220>                       |    |
|    | <223> ADN sintético         |    |
|    | <400> 74                    |    |
| 55 | ccacggcggc acgcccggag cgccg | 25 |
|    | <210> 75                    |    |
| 60 | <211> 25                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Secuencia artificial  |    |
| 65 | <220>                       |    |
|    | <223> ADN sintético         |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                              |    |
|----|------------------------------|----|
|    | <400> 75                     |    |
|    | cggcgctccg ggcgtgccgc cgtgg  | 25 |
| 5  | <210> 76                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 10 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 15 | <400> 76                     |    |
|    | cggcggcacaccgcgagcggccgagga  | 26 |
| 20 | <210> 77                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 30 | <400> 77                     |    |
|    | tcctcggcgc tcgcgtgtg ccgccg  | 26 |
| 35 | <210> 78                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 40 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 45 | <400> 78                     |    |
|    | cggcacacccgggcccgcgaggacga   | 26 |
| 50 | <210> 79                     |    |
|    | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
| 55 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
| 60 | <400> 79                     |    |
|    | tcgtcctcgg cggcccgggt gtgccg | 26 |
| 65 | <210> 80                     |    |
|    | <211> 26                     |    |

## ES 2 344 679 T3

|    |                              |    |
|----|------------------------------|----|
|    | <212> ADN                    |    |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |
| 5  | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
|    | <400> 80                     |    |
| 10 | accccataccacagcggca cacccg   | 26 |
|    | <210> 81                     |    |
| 15 | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |
| 20 | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
|    | <400> 81                     |    |
| 25 | cgggtgtgcc gctgtggtat gggggt | 26 |
|    | <210> 82                     |    |
| 30 | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |
| 35 | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
|    | <400> 82                     |    |
| 40 | cccataccacggcagcacacccggag   | 26 |
|    | <210> 83                     |    |
| 45 | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |
| 50 | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |
|    | <400> 83                     |    |
| 55 | ctccgggtgt gctgccgtgg tatggg | 26 |
|    | <210> 84                     |    |
| 60 | <211> 26                     |    |
|    | <212> ADN                    |    |
|    | <213> Secuencia artificial   |    |
| 65 | <220>                        |    |
|    | <223> ADN sintético          |    |

## ES 2 344 679 T3

<400> 84

cggcggcacacccagagcgccgagga

26

5

<210> 85

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

15

<400> 85

tcctcggcgc tctgggtgtg ccgccg

26

20

<210> 86

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

30

<400> 86

cggcggcacacctggagcgccgagg

25

35

<210> 87

<211> 25

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

45

<400> 87

cctcggcgct ccaggtgtgc cgccg

25

50

55

60

65